VALIDACIÓN DEL METODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COCAÍNA, HEROÍNA Y *Cannabis Sativa* USANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS EN LA FISCALÍA GENERAL DE LA NACIÓN DE LA CIUDAD DE CUCUTA, SECCIONAL NORTE DE SANTANDER.

GINNA ALEXANDRA BOHÓRQUEZ PORRAS

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

Facultad de Ingenierías y Arquitectura

Programa de Ingeniería Química

PAMPLONA, DICIEMBRE DE 2017

VALIDACIÓN DEL METODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COCAÍNA, HEROÍNA Y *Cannabis Sativa* USANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS EN LA FISCALÍA GENERAL DE LA NACIÓN DE LA CIUDAD DE CUCUTA, SECCIONAL NORTE DE SANTANDER.

.

GINNA ALEXANDRA BOHÓRQUEZ PORRAS

Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de: INGENIERÍA QUÍMICA.

Director:

M.Sc. Alvaro Eulalio Villamizar Villamizar

Codirector:

Ing. Jose Manuel Mendez Hernandez

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

Facultad de Ingenierías y Arquitectura

Programa de Ingeniería Química.

PAMPLONA, DICIEMBRE DE 2017.

DEDICATORIA

A Dios primero que todo por la sabiduría dada para la toma de mis decisiones

Por todo el apoyo, patrocinio y confianza que me permitió ser y explorar, a lo largo de mi carrera profesional, a mis padres Alexander Bohórquez y Jaqueline Porras.

A todos los profesores, amigos y familiares que fueron un gran apoyo en todos los momentos vividos y que sin ellos no sería agradable el recibir este título debido a sus enseñanzas impartidas.

¡La disciplina vence la inteligencia!

RESUMEN DEL PROYECTO

Los narcóticos o estupefacientes son sustancias que al ser ingeridas causan alucinaciones, cambian la conciencia, el ánimo de las personas y en grandes cantidades pueden causar hasta la muerte. Debido al riesgo que aportan los narcóticos son considerados ilegales; es por esto que diferentes entidades encargadas de combatir este fenómeno realizan análisis químicos mediante la aplicación de métodos estandarizados con el fin de identificar estas sustancias.

Teniendo en cuenta la importancia de la identificación de las sustancias psicoactivas; entidades del Estado encargadas de combatir con el fenómeno del narcotráfico tal como la Fiscalía General de la Nación pone a disposición laboratorios de investigación científica que posee el Área de Química para el desarrollo de la identificación de drogas. Este proyecto realizará la validación del método no normalizado, para la identificación de tres sustancias psicoactivas, tales como la cocaína, heroína y el *Cannabis Sativa*, en el laboratorio de la Fiscalía General de la Nación de la ciudad de Cúcuta, seccional de Norte de Santander. El método se basa en marcos legales impartido por la Organización de las Naciones Unidas en el cual se usa un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas para el análisis de las muestras e identificación y posteriormente manejo de datos estadísticos. La finalidad de validar el método no normalizado en la Fiscalía General de la Nación, seccional Norte de Santander es poderlo certificar, para de este modo manejar e implementar de forma confiable las muestras con sus respectivos análisis.

TABLA DE CONTENIDO

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION 18
2. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE 20
2.1 SUSTANCIAS PSICOACTIVAS Y SU CLASIFICACIÓN 20
2.2 CANNABIS 21
2.2.1 Generalidades 21
2.2.2 Identificación de los componentes. 22
2.3 LA COCAINA 24
2.3.1 Generalidades 24
2.3.2 Identificación de los componentes. 25
2.4 LA HEROÍNA. 26
2.4.1. Generalidades 26
2.4.2 Identificación de los componentes. 27
2.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES 29
2.5.1 Elementos del cromatógrafo 29
2.6 CROMATOGRAFO DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS 33
2.7 VALIDACIÓN 34
2.7.1 Selectividad 36
2.7.2 Efecto matriz 36
2.7.3 Precisión 36
2.7.4 Limites 36
2.7.5 Sensibilidad, especificidad, relación de likelihood e indice de youden. 38

2.7.6 Robustez 39
3. OBJETIVOS 40
3.1 Objetivo general 40
3.2 Objetivos específicos 40
4. METODOLOGÍA 41
4.1 ALCANCE 41
4.2 REACTIVOS Y MATERIALES 41
4.3 EQUIPOS E INSTRUMENTOS 42
4.4 MÉTODO DE ANÁLISIS 42
4.5 ENSAYOS PRELIMINARES 44
4.5.1 Ensayo de Tanred 44
4.5.2 Ensayo de Scott 44
4.5.3 Ensayo de Marquis 44
4.5.4 Ensayo de Ácido Nítrico 44
4.5.5 Ensayo de Duquenois 44
4.6 TÉCNICA INSTRUMENTAL 45
4.6.1 Parametros 45
4.6.2 Preparación de soluciones para la determinación cualitativa 46
4.7 VALIDACIÓN DE MÉTODOS CUALITATIVOS NO NORMALIZADOS 46
4.7.1 Pruebas de color 46
4.7.2 Cromatografía de gases con detector selectivo de masas 47
5. RESULTADOS 52
5.1 REVISION DE NOTICIAS CRIMINALES 52

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA COLOMBIA
Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz

5.2 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR 54
5.2.1 Cocaína 55
5.2.2 Heroína 62
5.2.3 *Cannabis Sativa* 71
5.3 CROMATOGRAFIA DE GASES CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS .. 77
5.3.1 Cocaína y heroína 77
5.3.2 Cannabis Sativa 97
6. CONCLUSIONES 111
7. RECOMENDACIONES 114
8. NOMENCLATURA 115
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 116
ANEXOS 120

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de desempeño de calidad..... 35

Tabla 2. Parámetros usados en el GC-MS para muestras con cocaína, adulterantes y opiáceos como analito. 45

Tabla 3. Parámetros usados en el GC-MS para muestras con apariencia de cannabis. 45

Tabla 4. Preparación de la muestra para la determinación cualitativa. 46

Tabla 5. Ejemplo de factores con las condiciones estipuladas..... 49

Tabla 6. Combinación para la realización de ensayos. 50

Tabla 7. Resultados de las pruebas preliminares. 55

Tabla 8. Límite de detección de la prueba preliminar de cocaína. 57

Tabla 9. Efecto matriz de la prueba preliminar de cocaína. 58

Tabla 10. Comparación de prueba preliminar de Tanred vs. Cromatografía de gases-masas para cocaína. 59

Tabla 11. Comparación de prueba preliminar Scott vs. Cromatografía de gases-masas para cocaína..... 59

Tabla 12. Resultados de las pruebas preliminares para la heroína. 63

Tabla 13. Límite de detección de la prueba preliminar de heroína. 66

Tabla 14. Efecto matriz de la prueba preliminar de heroína. 67

Tabla 15. Comparación de prueba preliminar de Marquis vs. Cromatografía de gases-masas para la heroína. 68

Tabla 16. Comparación de prueba preliminar HNO_3 vs. Cromatografía de gases-masas para la heroína. 68

Tabla 17. Resultados de las pruebas preliminares para la *Cannabis Sativa*. 71

Tabla 18. Límite de detección de la prueba preliminar de *Cannabis Sativa*..... 74

Tabla 19. Comparación de prueba preliminar de Duquenois vs. Cromatografía de gases-masas para *Cannabis Sativa*. 75

Tabla 20. Tiempos de retención (min) e iones principales (m/z) de las sustancias de cocaína, adulterantes y heroína. 78

Tabla 21. Tiempos de retención (min) de cada sustancia en la mezcla para la identificación de cocaína y heroína. 82

Tabla 22. Tiempos de retención de las diez réplicas de la mezcla de cocaína, heroína y adulterantes. 84

Tabla 23. Simetría para las diez réplicas de la mezcla de cocaína, heroína y adulterantes. 85

Tabla 24. Platos teóricos para las diez réplicas de la mezcla de cocaína, heroína y adulterantes. 86

Tabla 25. Resolución de las diez réplicas de la mezcla de cocaína, heroína y adulterantes. 87

Tabla 26. Datos para la determinación del Límite de decisión CCα y capacidad de detección CCβ de la cocaína. 88

Tabla 27. Datos para la determinación del Límite de decisión CCα y capacidad de detección CCβ de la heroína. 90

Tabla 28. Datos para la determinación del límite de identificación de la cocaína. 91

Tabla 29. Datos para la determinación del límite de identificación de la heroína. 92

Tabla 30. Factores seleccionados y condiciones validada y alterna en el diseño experimental de robustez para la cocaína y heroína. 93

Tabla 31. Combinaciones de los siete factores para el estudio de robustez para la cocaína y heroína. 93

Tabla 32. Variables de respuesta seleccionadas de la cocaína y heroína. 94

Tabla 33. Efectos estimados para el número de platos teóricos simetría, resolución y tiempo de retención para cocaína. 94

Tabla 34. Efectos estimados para el número de platos teóricos, simetría, resolución y tiempo de retención para heroína. 95

Tabla 35. Comparación de áreas de las réplicas de dos soluciones de materiales de referencia preparados en diferentes fechas para la cocaína y heroína. 96

Tabla 36. Tiempos de retención (min) de cada sustancia en la mezcla para la identificación de *Cannabis Sativa*..... 98

Tabla 37. Tiempos de retención de las diez réplicas de la mezcla de *Cannabis Sativa*. ... 101

Tabla 38. Simetría de las diez réplicas de la mezcla de *Cannabis Sativa*..... 102

Tabla 39. Platos teóricos de las diez réplicas de la mezcla de *Cannabis Sativa*..... 102

Tabla 40. Resolución de las diez réplicas de la mezcla de *Cannabis Sativa*. 103

Tabla 41. Datos para la determinación del Límite de decisión CCα y capacidad de detección CCβ del Δ9-THC..... 104

Tabla 42. Datos para la determinación del límite de identificación de la Δ9-THC. 106

Tabla 43. Factores seleccionados y condiciones validada y alterna en el diseño experimental de robustez del *Cannabis Sativa* 107

Tabla 44. Combinaciones de los siete factores para el estudio de robustez del *Cannabis Sativa*..... 107

Tabla 45. Variables de respuesta seleccionadas del Δ9-THC. 108

Tabla 46. Efectos estimados para el número de platos teóricos simetría, resolución y tiempo de retención para el Δ9-THC. 108

Tabla 47. Comparación de áreas de las réplicas de dos soluciones de materiales de referencia preparados en diferentes fechas para el Δ9-THC. 110

Tabla 48. Variables de respuesta para el número de platos teóricos simetría, resolución y tiempo de retención para cocaína 176

Tabla 49. Variables de respuesta para el número de platos teóricos simetría, resolución y tiempo de retención para heroína. 177

Tabla 50. Variables de respuesta para el número de platos teóricos simetría, resolución y tiempo de retención para Δ9-THC. 193

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lista de las convenciones de fiscalización de estupefacientes de la ONU. 21

Figura 2. Estructura química del THC, según el sistema monoterpenoide (Δ^1-THC) y el dibenzopirano (Δ^9-THC). 22

Figura 3. Estructura molecular del clorhidrato de cocaína a) y la cocaína base b). 25

Figura 4. Estructura molecular de la heroína (diacetilmorfina). 27

Figura 5. Fragmentos de patrones de la heroína. 28

Figura 6. Esquema de un cromatógrafo de gases. 29

Figura 7.Camara de ionización. 34

Figura 8. Grafico del método PCC a)comportamiento ideal, b) comportamiento en situaciones reales. 38

Figura 9. Método de análisis para muestras en estado sólido. 43

Figura 10. Método de análisis para muestras en estado vegetal. 43

Figura 11. Adulterantes y sustancias encontradas en los análisis de muestras de cocaína y heroína en el año 2016 y 2017. 53

Figura 12. Sustancias encontradas en las muestras de cannabis del año 2016 y 2017. 54

Figura 13. Prueba preliminar realizada a la cocaína (Ensayo Tanred y Scott). 56

Figura 14. Prueba preliminar realizada a la heroína (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3). 65

Figura 15. Prueba preliminar realizada al patrón de Δ9-THC (Ensayo de Duquenois). 72

Figura 16. Prueba preliminar realizada a la planta de *Cannabis Sativa* (Ensayo de Duquenois). 73

Figura 17. Cromatograma y espectro de masas de la cocaína. 79

Figura 18. Cromatograma y espectro de masas de la heroína. 80

Figura 19. Curva característica para la determinación del Límite de decisión CCα y capacidad de detección CCβ de la cocaína. 89

Figura 20. Curva característica para la determinación del Límite de decisión CCα y capacidad de detección CCβ de la heroína. 90
Figura 21. Cromatograma de la mezcla de los principales compuestos del *Cannabis Sativa*. 99
Figura 22. Espectro de masas de a) CBD b) Δ9-THC y c) CBN. 100
Figura 23. Curva característica para la determinación del Límite de decisión CCα y capacidad de detección CCβ del Δ9-THC. 105
Figura 24. Prueba preliminar realizada a la amidopirina (Ensayo Tanred y Scott). 120
Figura 25. Prueba preliminar realizada a la fenacetina (Ensayo Tanred y Scott). 120
Figura 26. Prueba preliminar realizada a la procaina (Ensayo Tanred y Scott). 121
Figura 27. Prueba preliminar realizada a la lidocaina (Ensayo Tanred y Scott). 121
Figura 28. Prueba preliminar realizada a la cafeína (Ensayo Tanred y Scott). 122
Figura 29. Prueba preliminar realizada a la tetracaína (Ensayo Tanred y Scott). 122
Figura 30. Prueba preliminar realizada al levamisol (Ensayo Tanred y Scott). 123
Figura 31. Prueba preliminar realizada al diltiazem (Ensayo Tanred y Scott). 123
Figura 32. Prueba preliminar realizada al acetaminofén (Ensayo Tanred y Scott). 124
Figura 33. Prueba preliminar realizada a la hidroxicina (Ensayo Tanred y Scott). 124
Figura 34. Prueba preliminar realizada a la codeína (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3). 125
Figura 35. Prueba preliminar realizada a la morfina (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3). 125
Figura 36. Prueba preliminar realizada a la papaverina (Ensayo Tanred, Scott). 126
Figura 37. Prueba preliminar realizada a la papaverina (Ensayo Marquis y HNO_3). 126
Figura 38. Prueba preliminar realizada a la 6-monoacetilmorfina (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO3). 127
Figura 39. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 80% (Ensayo Tanred y Scott). 128
Figura 40. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 70% (Ensayo Tanred y Scott). 128

Figura 41. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 60% (Ensayo Tanred y Scott). 129
Figura 42. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 50% (Ensayo Tanred y Scott). 129
Figura 43. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 40% (Ensayo Tanred y Scott). 130
Figura 44. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 30% (Ensayo Tanred y Scott). 130
Figura 45. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 20% (Ensayo Tanred y Scott). 131
Figura 46. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 10% (Ensayo Tanred y Scott). 131
Figura 47. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 5% (Ensayo Tanred y Scott). 132
Figura 48. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 10%- aminopirina 90%. 133
Figura 49. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 10%- fenacetina 90%. 133
Figura 50. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 10%- Lidocaína 90%. 134
Figura 51. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 10%- cafeína 90%. 134
Figura 52. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 10%- acetaminofén 90%. 135
Figura 53. Prueba preliminar realizada a la heroína al 80% (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3). 136
Figura 54. Prueba preliminar realizada a la heroína al 70% (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3). 136
Figura 55. Prueba preliminar realizada a la heroína al 60% (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3). 137
Figura 56. Prueba preliminar realizada a la heroína al 40% (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3). 137
Figura 57. Prueba preliminar realizada a la heroína al 30% (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3). 138
Figura 58. Prueba preliminar realizada a la heroína al 20% (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO3). 138
Figura 59. Prueba preliminar realizada a la heroína al 10% (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3). 139

Figura 60. Prueba preliminar realizada a la heroína al 5% (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3). 139
Figura 61. Prueba preliminar realizada a la heroína al 10%- aminopirina 90%. 140
Figura 62. Prueba preliminar realizada a la heroína al 10%- fenacetina 90%. 140
Figura 63. Prueba preliminar realizada a la heroína al 10%- lidocaina 90%. 141
Figura 64. Prueba preliminar realizada a la heroína al 10%- cafeína 90%. 141
Figura 65. Prueba preliminar realizada a la heroína al 10%- acetaminofen 90%. 142
Figura 66. Prueba preliminar realizada a la *Cannabis Sativa* al 80% (Ensayo Duquenois). 143
Figura 67. Prueba preliminar realizada a la *Cannabis Sativa* al 70% (Ensayo Duquenois). 143
Figura 68. Prueba preliminar realizada a la *Cannabis Sativa* al 60% (Ensayo Duquenois). 144
Figura 69. Prueba preliminar realizada a la *Cannabis Sativa* al 40% (Ensayo Duquenois). 144
Figura 70. Prueba preliminar realizada a la *Cannabis Sativa* al 30% (Ensayo Duquenois). 145
Figura 71. Prueba preliminar realizada a la *Cannabis Sativa* al 20% (Ensayo Duquenois). 145
Figura 72. Prueba preliminar realizada a la *Cannabis Sativa* al 10% (Ensayo Duquenois). 146
Figura 73. Prueba preliminar realizada a la *Cannabis Sativa* al 5% (Ensayo Duquenois). 146
Figura 74. Cromatograma y espectro de masas del acetaminofén. 147
Figura 75. Cromatograma y espectro de masas de la fenacetina. 148
Figura 76. Cromatograma y espectro de masas de la cafeína. 149
Figura 77. Cromatograma y espectro de masas de la lidocaína. 150
Figura 78. Cromatograma y espectro de masas de la Aminopirina. 151

Figura 79. Cromatograma y espectro de masas de la Levamisol. 152
Figura 80. Cromatograma y espectro de masas de la procaína. 153
Figura 81. Cromatograma y espectro de masas de la Tetracaína. 154
Figura 82. Cromatograma y espectro de masas de la Codeína. 155
Figura 83. Cromatograma y espectro de masas de la morfina. 156
Figura 84. Cromatograma y espectro de masas de la papaverina. 157
Figura 85. Cromatograma y espectro de masas de la hidroxicina. 158
Figura 86. Cromatograma y espectro de masas de la diltiazem. 159
Figura 87. Cromatograma de la mezcla de cocaína, heroína y otras sustancias. 160
Figura 88. Cromatograma de la cocaína a 20 mg/L. 161
Figura 89. Cromatograma de la cocaína a 50 mg/L. 162
Figura 90. Cromatograma de la cocaína a 75 mg/L. 163
Figura 91. Cromatograma de la cocaína a 100 mg/L. 164
Figura 92. Cromatograma de la cocaína a 150 mg/L. 165
Figura 93. Cromatograma de la cocaína a 300 mg/L. 166
Figura 94. Cromatograma de la heroína a 40 mg/L. 167
Figura 95. Cromatograma de la heroína a 80 mg/L. 168
Figura 96. Cromatograma de la heroína a 100 mg/L. 169
Figura 97. Cromatograma de la heroína a 150 mg/L. 170
Figura 98. Cromatograma de la heroína a 300 mg/L. 171
Figura 99. Cromatograma de la heroína a 600 mg/L. 172
Figura 100. Cromatograma de la heroína a 700 mg/L. 173
Figura 101. Cromatograma de la heroína a 750 mg/L. 174
Figura 102. Cromatograma de la heroína a 800 mg/L. 175
Figura 103. Cromatograma del ensayo 2 para el análisis de robustez de la cocaína y heroína. 178

Figura 104. Cromatograma del ensayo 3 para el análisis de robustez de la cocaína y heroína. 179
Figura 105. Cromatograma del ensayo 4 para el análisis de robustez de la cocaína y heroína. 180
Figura 106. Cromatograma del ensayo 5 para el análisis de robustez de la cocaína y heroína. 181
Figura 107. Cromatograma del ensayo 6 para el análisis de robustez de la cocaína y heroína. 182
Figura 108. Cromatograma del ensayo 7 para el análisis de robustez de la cocaína y heroína. 183
Figura 109. Cromatograma del ensayo 8 para el análisis de robustez de la cocaína y heroína. 184
Figura 110. Cromatograma realizado el 2017-11-20 para el análisis de estabilidad de la cocaína y heroína..... 185
Figura 111. Cromatograma del Δ9-THC a 10 mg/L. 186
Figura 112. Cromatograma del Δ9-THC a 20 mg/L. 187
Figura 113. Cromatograma del Δ9-THC a 40 mg/L. 188
Figura 114. Cromatograma del Δ9-THC a 50 mg/L. 189
Figura 115. Cromatograma del Δ9-THC a 60 mg/L. 190
Figura 116. Cromatograma del Δ9-THC a 100 mg/L. 191
Figura 117. Cromatograma del Δ9-THC a 300 mg/L. 192
Figura 118. Cromatograma del ensayo 2 para el análisis de robustez del Δ9-THC. 194
Figura 119. Cromatograma del ensayo 3 para el análisis de robustez del Δ9-THC. 195
Figura 120. Cromatograma del ensayo 4 para el análisis de robustez del Δ9-THC. 196
Figura 121. Cromatograma del ensayo 5 para el análisis de robustez del Δ9-THC. 197
Figura 122. Cromatograma del ensayo 6 para el análisis de robustez del Δ9-THC. 198
Figura 123. Cromatograma del ensayo 7 para el análisis de robustez del Δ9-THC. 199

Figura 124. Cromatograma del ensayo 8 para el análisis de robustez del Δ9-THC. 200
Figura 125. Cromatograma realizado el 2017-11-20 para el análisis de estabilidad del Δ9-THC. 201

Formando líderes *para la* ***construcción*** *de un nuevo* ***país en paz***

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

Colombia desde hace años presencia el flagelo del narcotráfico con sus múltiples estigmatizaciones: violencia, tráfico e insumos químicos para la producción de las sustancias psicoactivas; es por ello que la Oficina contra la Droga y el Crimen de la Organización de las Naciones Unidas [UNODC] realizó un informe estudiando los consumidores de drogas ilegales, donde se plasmó que los consumidores ascendían de 185 millones de personas a 200 millones, lo que significa que el 5% de la población mundial entre 15 y 64 años ha consumido drogas ilegales, teniendo mayor prevalencia *el cannabis* (4%), las anfetaminas (0,6%), los opiáceos (0,4%), la cocaína (0,3%) y el éxtasis (0,2%)[1].

Según los últimos estudios publicados por el Observatorio de Drogas de Colombia, se analiza que la responsable del 73.4% de los cultivos de coca es la región Andina, siendo el país con mayor cantidad de hectáreas cultivadas, superando a Perú y Bolivia[2]. Por otro lado, el uso de cannabis se ha incrementado durante los últimos 20 años, semejante al consumo de tabaco, especialmente entre los adolescentes y adultos jóvenes [3]. Dada la condición donde la sociedad colombiana es víctima del flagelo del narcotráfico, se hace indispensable la identificación de manera eficaz de las sustancias narcóticas con el fin de detallar cada sustancia y realizar el análisis cualitativo para su incautación.

La Universidad de Pamplona cuenta con programas que desarrollan profesionales en diversas áreas, donde conocimientos en el área de química imparten la capacidad de análisis, el desarrollo de investigación, el manejo de instrumentación, conocimientos matemáticos y estadísticos; los cuales son determinantes para el desarrollo del profesional.

La Fiscalía General de la Nación, dispone de siete laboratorios de investigación científica ubicados en Barranquilla, Bucaramanga, Buga, Bogotá, Cali, Medellín y Pereira, pero dada el aumento de producción de drogas en el departamento de Norte de Santander, fue necesario

la apertura de un laboratorio ubicado en la ciudad de Cúcuta del departamento de Norte de Santander, el cual está apoyado con alta tecnología, permitiendo de este modo la agilización de dictámenes e informes de laboratorio requerido por las autoridades, con el fin de establecer la identificación de las sustancias psicoactivas. No obstante, para realizar la identificación de dichas sustancias, es necesario que los métodos realizados se encuentren validados con el fin de verificar que los requisitos especificados son adecuados y así presentar en juicio la confiabilidad de los análisis aplicados.

Es por ello que se plantea desarrollar la validación del método en el laboratorio del área de química de la Fiscalía General de la Nación de Cúcuta, seccional Norte de Santander, de acuerdo a los métodos no normalizados establecidos y acreditados por la Fiscalía General de la Nación para la identificación de la cocaína, heroína y *Cannabis Sativa*, usando el cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas, donde se aplicará todo el conocimiento adquirido en el plan de estudios de Ingeniería Química de la Universidad de Pamplona, dando un fuerte apoyo en la gestión de la validación para su posterior acreditación.

2. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1 SUSTANCIAS PSICOACTIVAS Y SU CLASIFICACIÓN

Las sustancias psicoactivas (PSA) se definen como sustancias de origen natural o sintético, que al ser introducidas al organismo por cualquier vía, ya sea oral, endovenosa, inhalación o digestión, causan alteración en el sistema nervioso central, la cual trae como consecuencia cambios temporales en la percepción, en el estado de ánimo y comportamiento [4].

La clasificación de las sustancias psicoactivas son diversas debido al enfoque, es decir su clasificación puede ser según su origen, su estructura química, su acción farmacológica o el medio sociocultural sea legal o no legal[5].

La clasificación de las sustancias es un punto clave en la fiscalización internacional de drogas, determinando así, los controles y la intensidad con la que se deben ejercer. El primer tratado internacional que incluyó el principio de la clasificación fue la Convención para la Limitación de la Fabricación y Reglamentación de la Distribución de Estupefacientes ('la Convención para la Limitación') de 1931.[6]. Sin embargo, la organización mundial de la salud (OMS) es el organismo encargado del examen científico y médico de las propuestas de clasificación en virtud de la Convención Única de 1961 sobre Estupefacientes y del Convenio sobre Sustancias Sicotrópicas de 1971, y un tercer convenio que con los anteriores dos, influyen en el marco de control de drogas, el cual es la Convención de Trafico de 1988; estos de igual forma corresponden al proceso de fiscalización de drogas de las Organización de las Naciones Unidas contra la Droga y el delito (UNODC) en el proceso de clasificación [7];dicha clasificación es la siguiente:

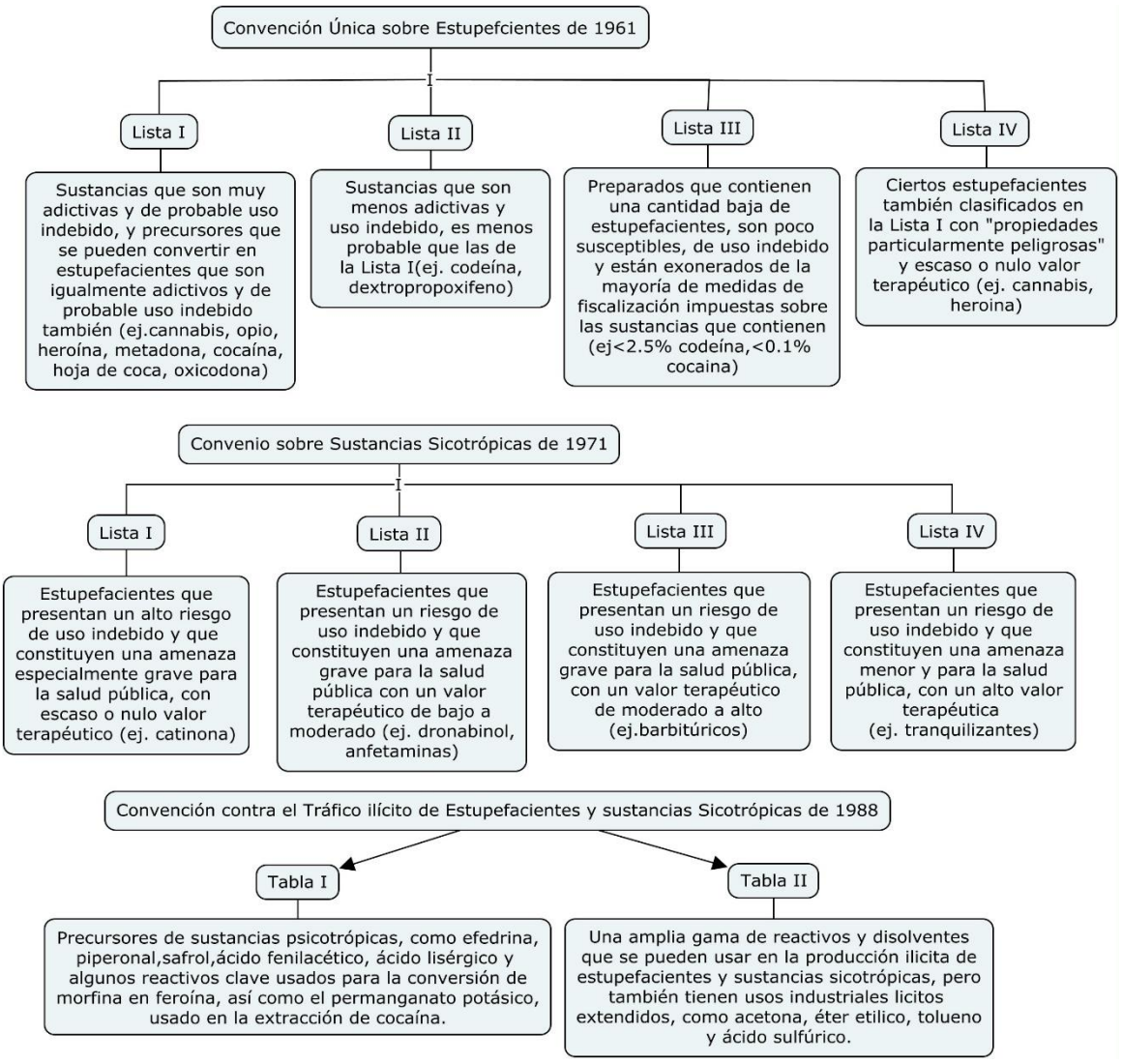


Figura 1. Lista de las convenciones de fiscalización de estupefacientes de la ONU.

Fuente: Hallam, C., D. Bewley-Taylor, and M. Jelsma, *transnational institute* [7].

2.2 CANNABIS

2.2.1 Generalidades

La marihuana es según Gaoni y Mechoulam (1964), una planta hérbacea, angioesperma, dicotiledónea del orden de las urticales y de la familia de las *canabáceas*. El nombre de la planta es "*Cannabis Sativa*"[8].

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA COLOMBIA
Formando líderes** para la **construcción** de un nuevo **país en paz

El inicio del *Cannabis Sativa* fue en Asia central y del sur, donde hay evidencias de humo del cannabis que datan del tercer milenio. En el noroeste de la Región Autónoma de Uigur en Xinjiang, China, se encontró en el 2003 fragmentos de hoja y semillas de cannabis al lado de un chamán momificado, de unos 2500 a 2800 años de antigüedad[8].

Se ha encontrado que la planta de *Cannabis Sativa* contiene más de 60 cannabinoides naturales, los cuales contienen hidrocarburos aromáticos oxigenados [9]; entre los cannabinoides más abundantes que contienen esta planta esta los de tipo cannabigerol (CBG), cannabicromeno (CBC), cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN) y el componente más activo el Δ9-tetrahidrocannabinol (THC). La presencia de los cannabinoides varía según la variedad del *cannabis* y por lo general se encuentran entre tres o cuatro cannabinoides en concentraciones superiores al 0.1%[10].

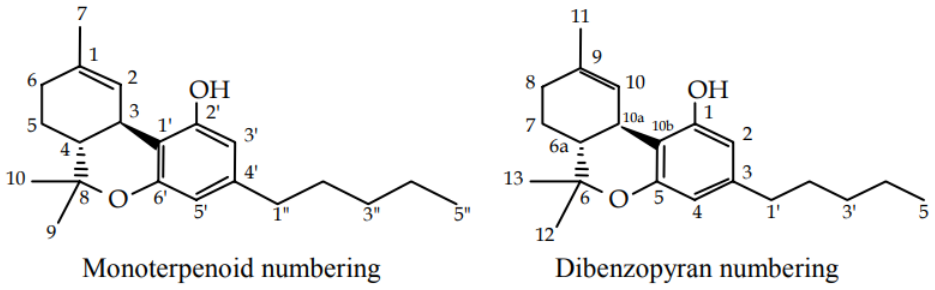


Figura 2. Estructura química del THC, según el sistema monoterpenoide (Δ^1-THC) y el dibenzopirano (Δ^9-THC).

Fuente: Grotenhermen, F., *Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide* [10].

2.2.2 Identificación de los componentes.

Según estudios de la identificación de cannabinoides en muestras de *Cannabis Sativa*, se desarrollan diversos métodos que constan de la preparación de la muestra de *Cannabis Sativa,* para su posterior análisis instrumental. Florian et al.[11] desarrollaron el análisis para

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA COLOMBIA
Formando líderes *para la* ***construcción*** *de un nuevo* ***país en paz***

la determinación del contenido de cannabinoides, tales como CBD, Δ9-THC y CBN en muestras vegetales de *Cannabis Sativa* cultivada en varias regiones de Colombia, donde para la preparación de las muestras vegetales se inició con un secado a 65°C, molienda de las hojas, posteriormente se disolvió en difenilhidramina (DFH) y se realizó un extracción con etanol, aplicando ultrasonido y finalmente se llevó la muestra a 4000 rpm en una centrifuga; para la identificación cualitativa de CBD, THC y CBN se utilizó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y para la cuantificación se hizo uso de un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (GC-FID).

La Fundación CANNA realiza estudios comparativos para la cuantificación e identificación de THC, CBD y CBN [12], donde una gran variedad de metodologías tales como cromatografía en capa fina (CCF), Cromatografía Laminar de Alto Rendimiento (OPLC), Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), Cromatografía de gases (GC) con Espectrometría de Masas (MS), Electrocromatografía Capilar (CEC), método fluoro-inmunológico de resolución en el tiempo, se han utilizado en el manejo de muestras de plantas de *Cannabis Sativa.*

Galand et al.[13] desarrollaron estudios sobre la separación e identificación de los componentes del cannabis por cromatografía laminar de desarrollo múltiple automatizado (AMD) y cromatografía laminar de alto rendimiento (OPLC) en comparación con la técnica de cromatografía de capa fina clásica (CCF), las muestras de cannabis son extraídas con hexano y posteriormente se filtran y se secan para su análisis; los resultados obtenidos fue un incremento en el análisis de varias muestras al mismo tiempo, una alta eficiencia, reproducibilidad de los análisis y un bajo consumo de eluyente, reduciendo así el costo del análisis. Sin embargo, la CCF es un método de bajo costo aprobado por la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito para los controles rutinarios de contenido cannabinoides de origen cannábico.

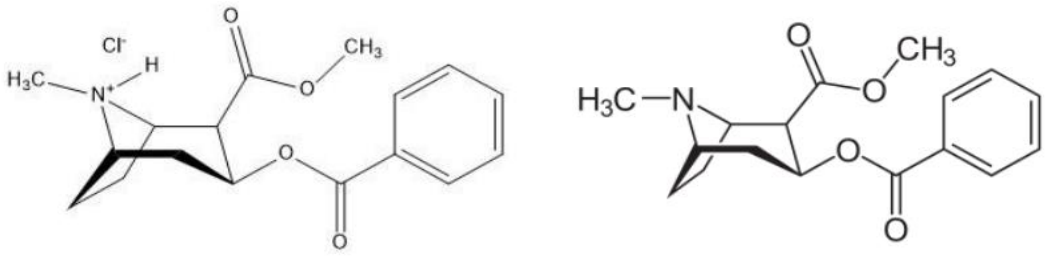
Ademas de realizar diversas investigaciónes sobre la identificacion del cannabis como planta, tambien se encuentran estudios donde su objetivo es identificar dichas sustancias psicoativas en fluidos corporales; Milman et al. [14] realizaron un método de validación para la identificación y cuantificación de los componentes cannabinoides y metabolitos en fluidos orales, usando la técnica de cromatografía de gases con espectrometría de masas, donde se logró una separación eficiente de los compuestos en una extracción simple de fluidos orales.

2.3 LA COCAINA

2.3.1 Generalidades

La cocaína es un alcaloide principal de la planta de Coca, la cual pertenece a un grupo amplio de sustancias vegetales que alteran el sistema nerviosos central, tales como la nicotina, cafeína y morfina [15].En el año 1859 el científico alemán de la universidad de Gotinga, Albert Niemann consiguió aislar por completo el alcaloide. La cocaína primariamente fue usada como analgésico, pero debido a su capacidad como estimulante y euforizante se incrementó su uso y abuso a nivel mundial en el último siglo[16].

La cocaína se comercializa principalmente en dos maneras, el clorhidrato de cocaína y la cocaína base (ver figura 3); la primera, es conocida por su fórmula ($C_{17}H_{22}NO_4\ ^{+}Cl^{-}$). la cual se presenta en polvos cristalinos blanco y su forma más común de consumo es vía nasal e intravenosa; mientras que la cocaína base, también conocida como “crack” ($C_{17}H_{21}NO_4$), presenta en color rosáceo y es obtenido al calentar el clorhidrato de cocaína con agua y bicarbonato para desprotonar el clorhidrato, siendo su forma más común de consumo por inhalación[16].



a) b)

Figura 3. Estructura molecular del clorhidrato de cocaína a) y la cocaína base b).

Fuente: Bocos González, F., Estudio conformacional de la estructura molecular de la cocaína y el "crack" [16].

En la cocaína es común encontrar sustancias químicas que tienen alguna propiedad farmacológica que se asemeja a la droga de abuso y son agregados con el fin de potenciar el efecto de ella, estas sustancias se conocen como adulterantes. En algunos casos los adulterantes pueden llegar a ser más peligrosos que la droga de abuso propiamente, entre estos los más destacados son la cafeína, lidocaína y levamisol [17, 18].

2.3.2 Identificación de los componentes.

La cocaína es una de las drogas de abuso más utilizadas en la actualidad y normalmente se presenta para su consumo de manera impura, esto es atribuible a que se encuentra en mezcla con sustancias que se les conoce como adulterantes. Garzón et al. [19] estudiaron el perfil cromatográfico de muestras de clorhidrato de cocaína producidas e incautadas en Colombia, donde se realizó análisis de pureza y un análisis cualitativo de adulterantes, diluyentes y solventes residuales ocluidos; en la preparación de las muestras, se tomaron 10 mg de muestra en 2 ml de etanol, utilizando para su identificación un GC-MS; para su análisis cuantitativo se preparó la curva de calibración en el rango de 100 a 700 ppm de cocaína y se cuantificó mediante el análisis en un GC-FID. Dichos métodos fueron previamente validados por la Fiscalía General de la Nación, el Departamento Administrativo de Seguridad, el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses y la Policía Nacional, dentro del proyecto ADCOL95/C58 de las Naciones Unidas y el Estado Colombiano [20].

Morello y Meyers [21] implementaron en 1995 la técnica de Headspace-Cromatografía de gases con detector selectivo de ionización de llama (HS-GC-FID) para la identificación y cuantificación de solventes residuales en clorhidrato de cocaína y heroína, esta técnica consistió en añadir a la muestra 10 mL de solución acuosa de sulfato de sodio en un vial, donde seguidamente se agitó y se analizó por GC-FID el efluente del espacio de cabeza.

Casale [22] estudió la detección de compuestos como la ecgonina en la cocaína, para esto implementó los ensayos de GC-MS, espectroscopia infrarroja (IR) y resonancia magnética nuclear (NMR), donde la muestra fue tratada con cloroformo y se sometió a calentamiento a 80°C, se dejó enfriar para luego realizar los respectivos ensayos de GC-MS, IR y NMR; los cuales demostraron la presencia de las sustancias estudiadas en las muestras de cocaína de interés.

La cocaína puede ser detectada de igual forma en fluidos y partes del cuerpo, Bessa et al. [23] estudiaron la detección de cocaína y marihuana en muestras de cabello de mujeres embarazadas, estos análisis se realizaron usando cromatógrafo de gases con espectrometría de masas (GC-MS), donde los resultados fueron significativos para la presencia de cocaína y marihuana.

2.4 LA HEROÍNA.

2.4.1. Generalidades

Los opiáceos son sustancias derivadas de la planta del opio, las cuales se han utilizado para aliviar el dolor, debido a sus efectos analgésicos. Los opiáceos se dividen en:

- Naturales: Opio, morfina y codeína.
- Semisintéticos: Heroína.
- Sintéticos: Metadona, petidina y tilidina.

La heroína o diacetilmorfina ($C_{21}H_{23}NO_5$) (ver figura 4), es un producto semisintético derivado de la morfina mediante un proceso de acetilización, el cual consiste en mezclar la morfina con anhídrido acético, se depura y precipita la mezcla obteniéndose finalmente la heroína. Esta se presenta en estado puro, como un polvo cristalino, blanco e inodoro, aunque su aspecto puede ser marrón si su pureza es menor[24].

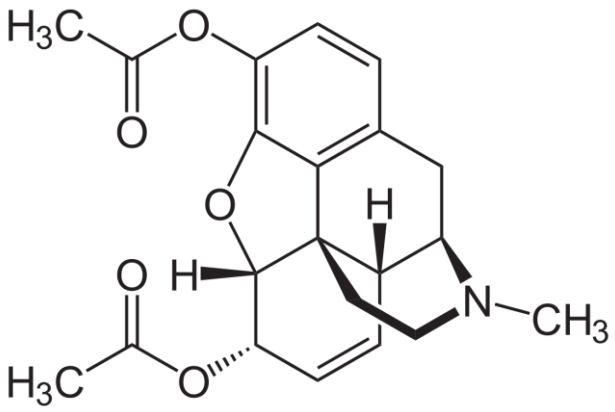


Figura 4. Estructura molecular de la heroína (diacetilmorfina).

Fuente: Rodríguez, R.E., et al., *Les molècules que modulen el dolor* [25].

2.4.2 Identificación de los componentes.

Uno de los primeros análisis realizados para la determinación de alcaloides, fue la espectroscopía de absorción. En 1855, William N. Hartley utilizó el espectrógrafo de cuarzo original para realizar un estudio en el que reportó el primer espectro ultravioleta en compuestos narcóticos, describiendo así, los espectros de 32 alcaloides, entre los que se encontraban la morfina, codeína, tebaína, papaverina, diacetilmorfina, entre otros[26].

Brenneisen and Hasler (2002) usaron GC-MS para estudiar la pirolisis de la heroína y obtuvieron 72 productos de pirolisis, pero dicho estudió demostró que al calentar muestras de heroína desde 250 a 400°C se produjo la degradación de la diamorfina, mientras que la

morfina, codeína, acetilcodeína, papaverina y cafeína permanecieron estables ante el calentamiento [27].

La cromatografía liquida emplea técnicas para estudiar los perfiles de los componentes de la heroína como lo es la cromatografía liquida de alta eficiencia o por sus siglas en ingles (HPLC) y la cromatografía liquida de ultra-rendimiento acoplado a espectrómetro de masas o por sus siglas en ingles (UPLC-MS/MS); dichas técnicas eliminan la absorción e inestabilidad ante el calentamiento y problemas de transesterificación. Sin embargo, la cromatografía liquida presenta limitaciones, tales como baja resolución y alto consumo de solvente [28].

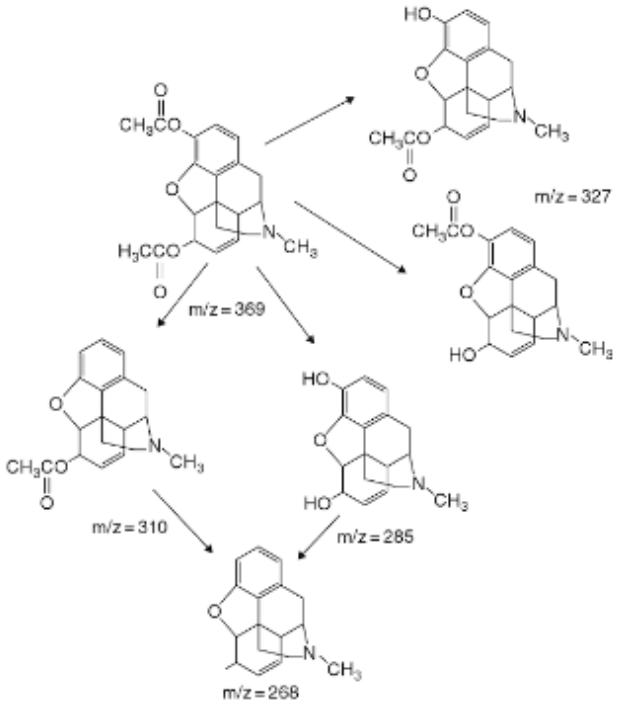


Figura 5. Fragmentos de patrones de la heroína.

Fuente: Siegel, J., *Forensic chemistry: fundamentals and applications* [27].

Formando líderes *para la* ***construcción*** *de un nuevo* ***país en paz***

2.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía de gases (GC) es un método analítico que determina los componentes químicos presentes y la concentración existente en una mezcla, dicha técnica analítica de separación ha experimentado un gran desarrollo desde sus inicios en los años cincuenta; es definida como un método físico de separación que consiste en pasar la muestra a través de una fase estacionaria con la ayuda de la fase móvil; dichos componentes de la mezcla tienen propiedades particulares que permite su interacción en forma diferente entre la fase estacionaria y móvil logrando como consecuencia una separación en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente [29].

2.5.1 Elementos del cromatógrafo

La cromatografía de gases se lleva a cabo en un instrumento denominado cromatógrafo, el cual consta de diferentes componentes tales como gas portador, sistema de inyección de la muestra, columna cromatográfica que se encuentra en horno termostatizado, sistema de detección y de registro[30].

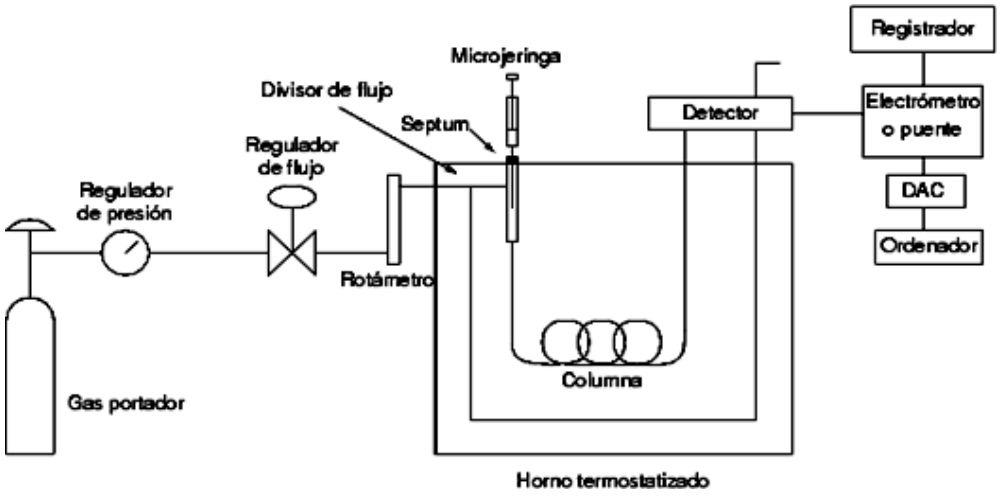


Figura 6. Esquema de un cromatógrafo de gases.

Fuente: SKOOG, Douglas. Principios de análisis instrumental [30].

Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz

2.5.1.1 Gas portador

El gas portador tiene como función principal ser el transporte de la muestra y ser la creación de una matriz adecuada para el detector. La elección de un gas portador depende del sistema de detección que se acopla al cromatógrafo, usualmente se emplean gases como el helio, nitrógeno, argón, hidrogeno o dióxido de carbono. El gas portador debe reunir ciertos criterios tales como[30]:

- Debe ser inerte para evitar interacciones (tanto con la muestra como con la fase estacionaria).
- Debe ser capaz de minimizar la difusión gaseosa.
- Fácilmente disponible y puro.
- Económico.
- Adecuado al detector utilizado.

2.5.1.2 Sistema de inyección

Los sistemas de inyección de muestras para cromatografía de gases, permiten la introducción de la muestra en la corriente del gas portador; su principal misión es la vaporización de la muestra a analizar e incorporarla a la corriente de gas portador que se dirige hacia la columna. La vaporización e introducción de las muestras en el sistema, debe realizarse cumpliendo una serie de requisitos [30].:

- La vaporización de la muestra debe ser lo más rápida posible.
- La vaporización debe realizarse sin discriminar ningún componente de la muestra.
- La muestra debe llegar a la columna como una banda lo más fina posible

El método de inyección de muestras liquidas y gaseosas, implica el uso de una microjeringa que inyecta la muestra líquida o gaseosa a través de un diafragma o "*septum*" de goma de silicona en una cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de la columna. La cámara de muestra normalmente está a unos 50ºC por encima del punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra [31].

En cromatografía de gases, se encuentran diversos tipos de inyectores, básicamente hay 2 tipos de inyectores, uno son los inyectores para columnas empaquetadas, los cuales admiten

cantidades relativamente altas de muestras, el volumen a inyectar es de unos 20 µL. Un inyector está formado por un bloque metálico, buen conductor del calor, provisto de un sistema de calentamiento, un termostato capaz de mantener su temperatura constante y un aislamiento térmico adecuado [31].

Otro tipo de inyección es la implementada en columnas capilares, la cual es usada cuando se necesita una reducción del volumen de la muestra, generalmente son volúmenes de muestras menores de 1 µL; el volumen depende del tipo de columna capilar, ya que según el tipo, se determina si se utiliza todo el volumen de muestra inyectado, debido a la existencia de columnas con distinto diámetro interno. Para obtener menor cantidad de volumen, se utiliza un divisor de flujo (la inyección se conoce como modo *Split)* a la entrada de la columna que desecha parte del analito introducido. Si se utiliza todo el volumen de muestra la inyección es de tipo *Splitless*, donde la inyección de la muestra completa, incluye el disolvente, esta se inyecta en la columna tubular abierta, a través de un vaporizador instantáneo caliente. El modo *Splitless*, se emplea para determinar concentraciones pequeñas o trazas [32].

2.5.1.3 Columnas

En cromatografía de gases, se usan dos tipos generales de columnas, las rellenas o empaquetadas y las abiertas o capilares. Las columnas cromatográficas varían desde menos de 2 m hasta 50 m de longitud, están construidas con acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón. Con la finalidad de poder colocarse en el interior de un horno termostatizado, normalmente se configuran como helicoides con diámetros de 10 cm a 30 cm [32].

Las columnas abiertas o columnas capilares, son de dos tipos básicos, denominados columna abierta de pared recubierta (WCOT), las cuales la pared interna está recubierta de una fina fase estacionaria, y la columna abierta recubierta con soporte (SCOT), en la cual la superficie interna está revestida de una capa delgada de un material de soporte [30].

2.5.1.4 Hornos

La temperatura es una variable importante en el desarrollo del análisis de cromatografía de gases, por lo cual la columna se introduce dentro de un horno de temperatura controlada. Para obtener una temperatura optima en la columna, se es necesario conocer el punto de ebullición de la muestra y el grado de separación requerido; cuando se presentan muestras con componentes que presentan un intervalo amplio de temperaturas de ebullición, es conveniente emplear una programación de temperatura, donde se aumenta la temperatura de la columna de forma continua o por etapas, al mismo tiempo que se realiza separación [32].

2.5.1.5 Detector

Una vez que los componentes han sido separados por la columna, es necesario disponer a la salida un sistema de detección, capaz de señalar la elución de cada componente y ofrecer al mismo tiempo, una señal proporcional a la cantidad de substancia que pasa a través de él. El detector ideal para cromatografía de gases tiene las siguientes características [32]:

- Adecuada sensibilidad.
- Buena estabilidad y reproducibilidad.
- Respuesta lineal para los solutos.
- Intervalos de temperaturas de trabajo comprendido desde la temperatura ambiente hasta al menos 400 ºC.
- Tiempo de respuesta corto que sea independiente del caudal.
- Alta fiabilidad y manejo sencillo. Hasta el punto de que el detector debería estar a prueba de la impericia de operadores inexpertos.
- Respuesta semejante para todos los solutos o, por el contrario, una respuesta selectiva y altamente predecible para uno o más tipos de solutos.
- No sea destructivo con la muestra.

Dentro de los detectores encontramos diversos tipos, tales como: detector de ionización de llama, de conductividad térmica, de captura de electrones, de emisión atómica, de espectrómetro de masas, entre otros. Sin embargo no hay algún detector que puede tener todas las características descritas anteriormente[32].

2.6 CROMATOGRAFO DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La cromatografía de gases es una de las principales técnicas analíticas para la separación de compuestos volátiles por su rápido análisis, resolución, fácil operación y excelentes resultados cuantitativos. Desafortunadamente la CG no puede confirmar la identidad o estructura de cada pico. Los tiempos de retención son característicos de cada compuesto pero no son únicos. Tanto el sistema cromatográfico como el espectroscópico están calentados (200 – 300°C), ambos trabajan con compuestos en estado gaseoso y ambos requieren pequeños tamaños de muestra, por lo que los hace compatibles [33].

Las moléculas del analito deben ser primero ionizadas para ser atraídas o repelidas por un apropiado campo magnético o eléctrico. La fuente de ionización es calentada y bajo vacío la mayoría de las muestras son fácilmente vaporizadas e ionizadas. Los electrones de alta energía golpean las moléculas neutras del analito, causando la ionización (usualmente pierde un electrón) y fragmentación. Esta técnica de ionización produce en su mayoría exclusivamente iones positivos (ver ecuación 1) [34]:

$$M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^- \quad (1)$$

Las moléculas neutras al ser bombardeadas por una corriente de electrones, se convierten en iones que son clasificados de acuerdo a la relación masa/carga (m/z) conocida como masa específica, en la mayoría de los casos cada ion lleva una sola carga por lo cual se dice que se clasifica según su masa [35] (Ver figura 7).

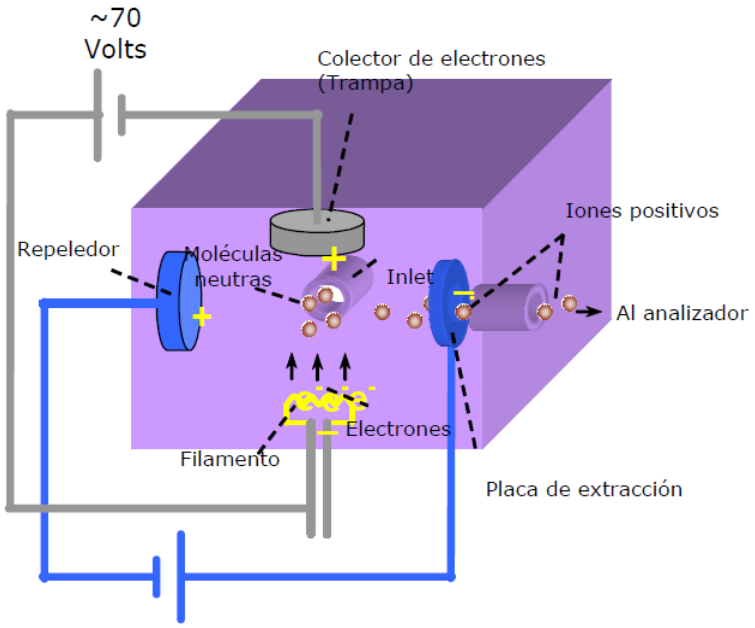


Figura 7.Camara de ionización.

Fuente: UNODC. Curso de Actualización de Protocolo de PPH[35].

2.7 VALIDACIÓN

Un método debe ser validado cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para cumplir con los requisitos exigidos; de igual forma el alcance de la validación depende de la naturaleza de los cambios realizados y de las circunstancias en que el método se va a utilizar [36].

En el método analítico es indispensable el uso de atributos medibles, los cuales son ajustados por parámetros, dichos parámetros dependen del tipo de método; de esta forma, los métodos analíticos de tipo cuantitativo contiene parámetros que se establecen en base a fundamentos estadísticos; mientras que los métodos analíticos de tipo cualitativo están basados en respuestas binarias, es decir, de tipo SI/NO. Estos sistemas se denominan sistemas de

screening o de cribado y se expresan en términos probabilísticos [37]. Para el desarrollo de estos parámetros es necesario conocer las siguientes definiciones:

- **Verdadero positivo (VP):** cuando el método evaluado da resultado positivo para una muestra que es positiva.
- **Falso positivo (FP):** cuando el método evaluado da una respuesta positiva para una muestra que es negativa
- **Verdaderos negativos (VN):** cuando el método evaluado da una respuesta negativa para la muestra que es negativo.
- **Falso negativo (FN):** cuando el método evaluado da una respuesta negativa para una muestra que es positiva.

La tabla 1 muestra los parámetros considerados para cada tipo de análisis; los cuales dependen de la naturaleza del problema analítico, y del tipo de método utilizado [38].

Tabla 1. Parámetros de desempeño de calidad.

Cuantitativo	**Cualitativo**
Selectividad/interferencias	Selectividad/interferencias
Límite de detección y de cuantificación	Límite de decisión y capacidad de detección
Sensibilidad y especificidad	Sensibilidad y especificidad
Rango y linealidad	Eficiencia, índice de Youden y radio de Likelihood
Exactitud, veracidad y precisión.	Veracidad (relación de probabilidad diagnóstica RPD)
Incertidumbre	Tasa de falsos positivos y falsos negativos
Robustez	Robustez
Estabilidad*	Estabilidad

*No se incluye en las pruebas de color

Fuente: López, M.I, [38].

Formando líderes** para la **construcción** de un nuevo **país en paz

2.7.1 Selectividad

Es la que evalúa la capacidad del método para identificar y cuantificar el analito ó los analitos de interés, ya sea puro o en una mezcla [39].

2.7.2 Efecto matriz

Consiste en estudiar el impacto de cualquier componente interferente y demostrar que el método funciona en presencia de sustancias que se encuentran comúnmente en muestras de drogas incautadas, como lo son, impurezas, subproductos, precursores y adulterantes [39].

2.7.3 Precisión

Las medidas de precisión se suelen expresar en términos de imprecisión y se calcula como una desviación estándar de los resultados de los ensayos realizados, por lo que una mayor imprecisión se refleja en una desviación estándar. La precisión determina la repetibilidad y reproducibilidad de todos los métodos de rutina [40]. Las condiciones bajo las cuales se realizan estas determinaciones son [39]:

- Para el análisis cualitativo, ejecute el método cualitativo un mínimo de diez veces.
- Para el análisis cuantitativo ejecutar el método cuantitativo un mínimo de diez veces.
- Los criterios de validación para los métodos no rutinarios pueden diferir de lo indicado anteriormente.

2.7.4 Limites

El método de desarrollo de características de curva o por sus siglas en ingles *performance characteristic curve* (PCC), estima parámetros que provisionan información cuantitativa en métodos analíticos cualitativos; el PCC determina los parámetros de límite de decisión (CCα) y capacidad de detección (CCβ), los cual son obtenidos por la representación de la probabilidad de los positivos P(x) versus la concentración correspondiente. Cabe destacar, que el comportamiento real es diferente al ideal, por lo cual se obtiene una curva PCC

sigmoidea, dibujándose dos líneas horizontales en 5% y 95%, y se traza una línea vertical en los puntos de inflexión [38]. De modo que se establece que:

CCα (límite de decisión): Se define como la probabilidad de que la muestra probada sea compatible o positiva, a pesar de que se ha obtenido una medición no conforme (decisión falsa no conforme) [41]. El CCα es obtenido a partir de la intersección entre la línea inferior horizontal que corresponde a la probabilidad de cometer un error FP (falso positivo) que suele establecerse del 5% y la curva sigmoidea.

CCβ (capacidad de detección): Es la cantidad más pequeña de una sustancia que pueda detectarse, identificarse y/o cuantificarse de forma fiable en una muestra con una certeza estadística de 1-β [41]. Se obtiene a partir de la intersección entre la línea horizontal superior que corresponde a la probabilidad de cometer un error FN (falso negativo) de 5% (P (x) =95% = 1- FN) y la curva sigmoidea.

Región de falta de fiabilidad: es la región compuesta ente los dos límites anteriormente definidos. (Ver Figura 8)

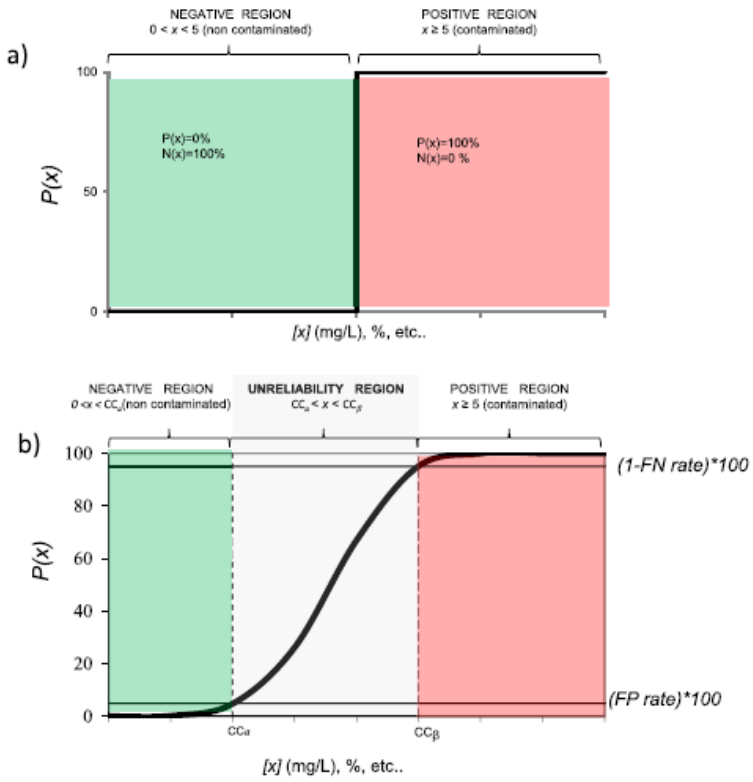


Figura 8. Grafico del método PCC a)comportamiento ideal, b) comportamiento en situaciones reales.

Fuente: López, M.I, [38].

2.7.5 Sensibilidad, especificidad, relación de likelihood e indice de youden.

La **sensibilidad** es la capacidad o habilidad del sistema de *screening* de detectar muestras positivas cuando realmente son positivas (ver ecuación 2). De forma similar, la **especificidad** se define como la capacidad o habilidad del sistema de *screening* de detectar muestras negativas cuando realmente son negativas (ver ecuación 3) [37].

$$\boldsymbol{Sensibilidadad} = \frac{\mathbf{VP}}{\boldsymbol{VP+FN}} \qquad (2)$$

$$\boldsymbol{Especificidad} = \frac{\mathbf{VN}}{\boldsymbol{VN+FP}} \qquad (3)$$

Una vez definida la sensibilidad y especificidad, se combinan estos parámetros en tasas de probabilidad. De aquí se obtiene la relación de likelihood (ver ecuación 4), la cual es definida por la relación de la probabilidad de los resultados que son verdaderos positivos entre la probabilidad de los resultados positivos pero que en realidad son negativos, es decir determina la probabilidad de falsos positivos [42].

$$\boldsymbol{Relación\ de\ likelihood} = \frac{\boldsymbol{Sensibilidad}}{\mathbf{1-Especificidad}} \tag{4}$$

Cuando una prueba de diagnóstico se basa en una medición continua, se puede investigar un rango de diferentes umbrales de decisión o valores de corte para decidir qué valor se debe discriminar en el resultado final [42]. En las pruebas es deseable elegir una que tenga valores altos tanto para la sensibilidad como para la especificidad. Sin embargo, si no se realiza un juicio entre los dos, entonces el índice de Youden (ver ecuación 5) se puede utilizar para elegir un límite apropiado [43].

$$\boldsymbol{Índice\ de\ Youden} = \mathbf{Sensibilidad + Especificidad - 1} \tag{5}$$

El valor máximo que el índice de Youden puede alcanzar es 1, cuando la prueba es perfecta, y el valor mínimo suele ser 0, cuando la prueba no tiene valor de diagnóstico, es decir no sería válido realizar la prueba [42].

2.7.6 Robustez

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para permanecer inalterado por variaciones pequeñas de distintas variables del método. Para evaluar este parámetro se realiza el procedimiento de Youden y Steiner, que permite analizar hasta siete variables con ocho determinaciones [44].

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Validar el método no normalizado para la identificación de *Cannabis Sativa*, cocaína y heroína mediante cromatografía de gases con detector selectivo de masas en el laboratorio de Química de la Fiscalía General de la Nación en la ciudad de Cúcuta, seccional de Norte de Santander.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar los análisis de pruebas preliminares de identificación homologada para las sustancias psicoactivas *Cannabis Sativa*, cocaína y heroína.
- Verificar el método no normalizado en las condiciones del laboratorio de química de la ciudad de Cúcuta establecidas para la identificación del *Cannabis Sativa,* cocaína y heroína utilizando la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Desarrollar los criterios de calidad analítica demandados por la institución para la elaboración de la validación del método de identificación del *Cannabis Sativa*, cocaína y heroína.

4. METODOLOGÍA

4.1 ALCANCE

El objeto a ensayar en este método corresponde a soluciones de patrones certificados y materiales de referencia caracterizados. De igual forma, el método se implementa en muestras incautadas por las autoridades y que son sometidas a fiscalización.

4.2 REACTIVOS Y MATERIALES

- Cocaína HCl lote 156.1B0.1 patrón de Lipomed;
- Heroína lote 29.3B35.1 patrón de Lipomed,
- Aminopirina caracterizado 20170525;
- Fenacetina caracterizado 20170525;
- Procaína caracterizado 20170525;
- Lidocaína caracterizado 20170525;
- Cafeína caracterizado 20170525;
- Tetracaína caracterizado 20170525;
- Levamisol caracterizado 20170525;
- Diltiazem caracterizado 20170525
- Acetaminofen caracterizado 20170525
- Hidroxicina caracterizado 20170525;
- Codeina caracterizado 20170525;
- Papaverina caracterizado 20170525;
- Morfina lote 40K1192 patrón de Sigma;
- Cannabinol lote 377.1B17.1 patrón de Lipomed;
- Cannabidiol lote 303.1B21.0 patrón de Lipomed;
- Δ9-THC lote 135.1B72.0 patrón de Lipomed;

- 6- monoacetilmorfina caracterizado 20170525;
- Tebaína caracterizado 20170525;
- Etanol lote SZBD3080V de SIGMA.

4.3 EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas. Marca Shimadzu modelo QP2010 ULTRA. Software de procesamiento de datos GCMS Solution versión 4.11, espectroteca Willey undécima edición.
- Columna capilar, DB 5 MS. Fase: 5% fenil-metilpolisiloxano, longitud: 30 metros, diámetro interno: 0,250 mm, espesor de película 0.25µm.
- Balanza analítica marca DISCOVERY OHAUS.
- Tres balónes aforado de 5 ml.
- Micropipeta de 100 µl a 1000 µl.

4.4 MÉTODO DE ANÁLISIS

Dentro de las muestras incautadas se procedió a realizar sus respectivos análisis, según el estado en el que se encuentra la muestra siguiendo el proceso mostrado en las figuras 9 y 10.

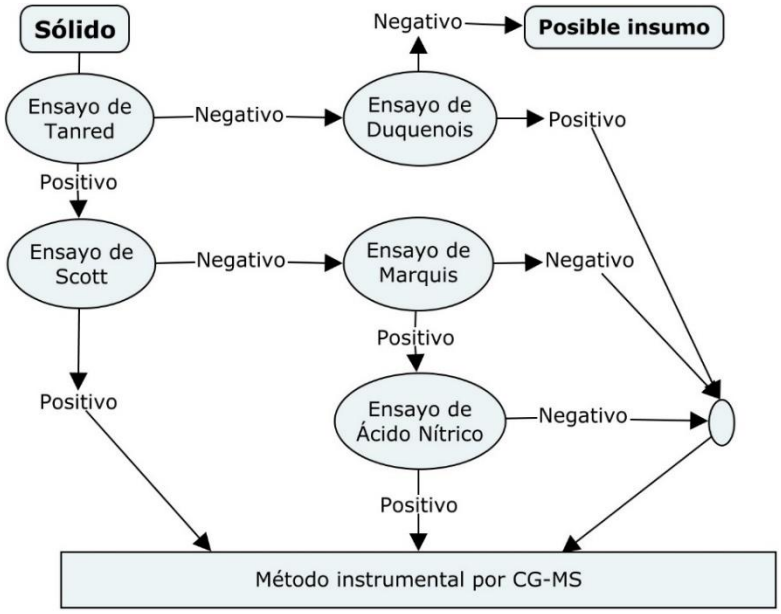


Figura 9. Método de análisis para muestras en estado sólido.

Fuente: Tomado de la guía de análisis de estupefacientes y sustancias controladas de la Fiscalía General de la Nación.

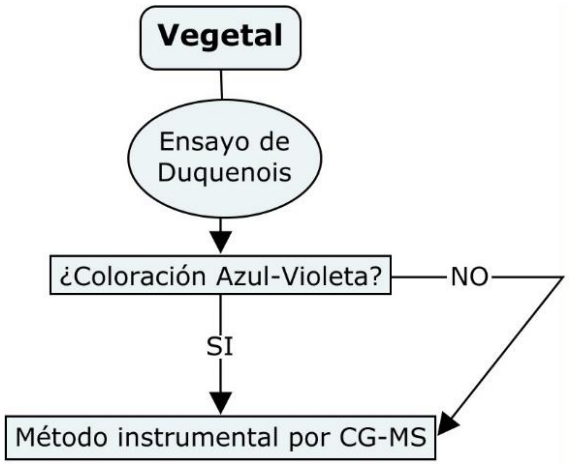


Figura 10. Método de análisis para muestras en estado vegetal.

Fuente: Tomado de la guía de análisis de estupefacientes y sustancias controladas de la Fiscalía General de la Nación.

4.5 ENSAYOS PRELIMINARES

4.5.1 Ensayo de Tanred

Se colocó sobre una placa de pruebas una pequeña cantidad de muestra, seguidamente se agregó de dos a cuatro gotas de agua y se adicionó de una a tres gotas de reactivo Tanred. La formación de un precipitado amarillo de apariencia lechosa, indica positivo para identificación preliminar de alcaloides.

4.5.2 Ensayo de Scott

Se adicionó sobre una placa de prueba la muestra a analizar, posteriormente se agregó de dos a tres gotas del reactivo Scott. La aparición inmediata de un color azul, indica prueba positiva para la identificación preliminar de cocaína y derivados.

4.5.3 Ensayo de Marquis

En la placa de pruebas se adicionó una pequeña cantidad de muestra y luego se agregó dos gotas de reactivos Marquis. La formación de una coloración violeta indica prueba positiva para la identificación preliminar de opio y derivados.

4.5.4 Ensayo de Ácido Nítrico

Se adicionó sobre una placa de pruebas una pequeña cantidad de muestra, posteriormente se agregó 3 gotas de reactivo de ácido nítrico. La observación de un color amarillo que vira lentamente a verde indica prueba positiva para la identificación preliminar de Heroína. El color naranja que vira rápidamente a rojo y luego lentamente a amarillo indica prueba positiva para la identificación preliminar de morfina. El color naranja que vira lentamente a amarillo indica la prueba positiva para la identificación preliminar de codeína.

4.5.5 Ensayo de Duquenois

Se agregó material vegetal en un tubo de ensayo, seguidamente se adicionó 10 gotas del reactivo Duquenois, se agitó por un minuto y se agregó otras 10 gotas de ácido clorhídrico.

La aparición de un color en la gama del azul al violeta oscuro en la parte inferior del tubo, indica prueba positiva para la identificación preliminar de cannabis y derivados.

4.6 TÉCNICA INSTRUMENTAL

4.6.1 Parametros

Tabla 2. Parámetros usados en el GC-MS para muestras con cocaína, adulterantes y opiáceos como analito.

Analito	Cocaína, adulterantes y opiáceos.
Columna	Capilar Fase 1-MS o Fase 5- Longitud 30 m Diámetro interno O,25 mm.
Gas de arrastre	Helio- 1.5 mL/min.
Temperaturas	Programa del horno 180°C mantener por 1 min Rampa 15°C/min hasta 230°C, mantener por 5 min. Rampa 30°C/min hasta 310°C, mantener por 4 min.
Parámetro de inyección	Modo Split, volumen 0.2 µL.
Modo	SCAN (30 uma a 450 uma)

Tabla 3. Parámetros usados en el GC-MS para muestras con apariencia de cannabis.

Analito	Δ9-THC, cannabinol, cannabidiol.
Columna	Capilar Fase 1-MS o Fase 5- Longitud 30 m Diámetro interno O,25 mm.
Gas de arrastre	Helio- 1.5 mL/min.
Temperaturas	Programa del horno 200°C mantener por 0,5 min Rampa 30°C/min hasta 260°C, mantener por 4.5 min.
Parámetro de inyección	Modo Split, volumen 0.2 µL.
Modo	SCAN (40 uma a 320 uma)

Fuente: Tomado de la guía de análisis de estupefacientes y sustancias controladas de la Fiscalía General de la Nación.

4.6.2 Preparación de soluciones para la determinación cualitativa

Según el tipo de analito a analizar se preparó la muestra, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 4. Preparación de la muestra para la determinación cualitativa.

Analito	**Cantidad a pesar**	**Volumen Etanol**
Cocaína y derivados	0.5 mg a 1.5 mg	1 mL a 1.5 mL
Opiáceo	3 mg a 6 mg	1 mL a 1.5 mL
Cannabis y sus productos	5 mg a 15 mg	1 mL a 2 mL

Fuente: Tomado de la guía de análisis de estupefacientes y sustancias controladas de la Fiscalía General de la Nación.

En la extracción de vegetales, tales como hojas de coca o cannabis se procede a transferir al vial el líquido extraído después de haber agregado etanol como disolvente. Posteriormente se tapó el vial y se realizó el respectivo análisis con el método instrumental de GC-MS.

4.7 VALIDACIÓN DE MÉTODOS CUALITATIVOS NO NORMALIZADOS

La Fiscalía General de la Nación implementa la Norma NTC-ISO/IEC 17025, la cual establece los lineamientos para la validación y verificación de los métodos usados en los grupos de Química; es por ello que para la realización de la validación se siguen las directrices definidas por la entidad, las cuales son plasmadas en la guía de validación y verificación de métodos de ensayo del grupo de química; dichas guías establecen lo siguiente:

4.7.1 Pruebas de color

4.7.1.1 Selectividad.

Se analizó por triplicado materiales de referencias y se reporta el color o precipitado obtenido en el tiempo previsto, teniendo en cuenta las siguientes sustancias:

- Otras drogas pertenecientes al grupo de interés.

- Precursores o impurezas provenientes de la extracción o síntesis del analito de estudio.
- Adulterantes, diluyentes o excipientes identificados previamente en las muestras de rutina.
- Drogas propias de otros grupos.
- Mezclas del analito de interés con los adulterantes más frecuentes.

4.7.1.2 Límite de detección.

- Muestras sólidas: Se seleccionó un blanco (sílica) y se agregó material de referencia del analito a niveles decrecientes de concentración[38].
- En la determinación de los efectos de matriz se preparó una mezcla del analito de interés a la concentración establecida como límite de detección con la sustancia que no dio un resultado positivo para la pruebas a evaluar.
- Muestras vegetales: Se seleccionó un blanco (tabaco) y se agregó material de referencia del analito a niveles decrecientes de concentración hasta que no se detecte el analito usando el reactivo de Duquenois [38].

4.7.1.3 Sensibilidad, especificidad, eficiencia, índice de younden, relación de likelihood.

Se clasificó los resultados históricos de los análisis efectuados para el analito de interés durante un periodo de 3 meses, seguidamente se consolidó los resultados obtenidos comparando el resultado de la prueba preliminar contra el método de CG-MS, estableciendo los valores de VP, FN, VN y FP (ver apartado 2.7) y finalmente se calculó de las características de comportamiento con las formulas descritas (ver apartado 2.7.5).

4.7.2 Cromatografía de gases con detector selectivo de masas

4.7.2.1 Selectividad.

Se preparó una solución de una mezcla de materiales de referencias y se analizaron por decuplicado en las condiciones específicas del método, donde en el modo de barrido de iones (SCAN), el espectro de masa se usó junto con el tiempo de retención para identificar y confirmar la presencia de drogas. De este modo, se comparó el analito con un patrón que se analizó anteriormente en condiciones idénticas o con los patrones archivados en la biblioteca.

Para este parámetro de desempeño de calidad se tomaron en cuenta factores tales como; tiempo de retención de la sustancia, simetría, resolución de los picos y el número de platos teóricos.

4.7.2.2 Límite de detección y límite de identificación.

Con la sustancia de interés se preparó mínimo 5 niveles de concentración decrecientes, donde se le realizó su respectivo análisis por decuplicado a cada nivel de concentración. Con los datos obtenidos se construyó una curva de respuesta de porcentaje de positivos contra concentración, en el cual para los porcentajes positivos se tomó como criterio de aceptación tres veces la señal ruido y de este modo se estableció el CCα, CCβ y la región de fiabilidad[38].

El límite de identificación se determinó con los datos obtenidos anteriormente, donde el límite corresponde al de menor concentración detectado en comparación con la espectroteca, se debe tener en cuenta que el porcentaje de comparación es mayor o igual al 90%.

4.7.2.3 Estabilidad

A una mezcla de material de referencia preparada se le realizó un análisis por decuplicado y se hace el mismo procedimiento en un periodo de tiempo posterior. Se determinó si hay variación en el área de los picos, aparición de nuevos picos y disminución en el porcentaje de comparación con la espectroteca.

4.7.2.4 Robustez

En el desarrollo de este parámetro se preparó una solución de analito con concentración conocida, posteriormente se seleccionó siete factores a variar durante el análisis; de este modo, se procedió a analizar la solución bajo las condiciones del método validado y se continuó el análisis cambiando paulatinamente cada condición alterna de los factores establecidos. A continuación se presenta el siguiente ejemplo:

Tabla 5. Ejemplo de factores con las condiciones estipuladas.

Factor	Condición Validada (X)	Condición alterna (x)
Factor 1: Temperatura puerto de inyección (˚C)	A= 280	a= 275
Factor 2: Tiempo de calentamiento rampa (min)	B= 4	b= 0
Factor 3: Tiempo de calentamiento rampa inicial (min)	C =1	c= 0
Factor 4: Analista 1	D= Analista 1	d= Analista 2
Factor 5: Analista 2	E= Analista 1	e= Analista 3
Factor 6: Condiciones ambientales	F= Aire acondicionado ON	f= Aire acondicionado Off
Factor 7: Cambio de columna	G= 30m*0,25mm*0,1um	g = 30m*0,25mm*0,25um

Fuente: Tomado de la guía de análisis de estupefacientes y sustancias controladas de la Fiscalía General de la Nación.

Una vez establecidos los factores y las condiciones a alternar se realiza las posibles combinaciones de la siguiente manera:

Tabla 6. Combinación para la realización de ensayos.

Factor/ Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8
Factor 1 (A,a)	A	A	A	A	a	a	a	a
Factor 2 (B,b)	B	B	b	b	B	B	b	B
Factor 3 (C,c)	C	c	C	c	C	c	C	C
Factor 4 (D,d)	D	D	d	d	d	D	D	D
Factor 5 (E,e)	E	e	E	e	e	E	e	E
Factor 6 (F,f)	F	f	f	F	F	f	f	F
Factor 7 (G,g)	G	g	g	G	g	G	G	g
Promedio de los resultados de la variable de respuesta	s	t	u	v	w	x	y	z

Fuente: Tomado de la guía de análisis de estupefacientes y sustancias controladas de la Fiscalía General de la Nación.

Se procede a calcular el promedio de la variable de respuesta de las réplicas para cada uno de los ocho ensayos para obtener s, t, u, v, w, x, y. Luego se determina la influencia de cada variable empleando las siguientes formulas:

$$\Delta(A,a) = \frac{s+t+u+v}{4} - \frac{w+x+y+z}{4} \tag{6}$$

$$\Delta(B,b) = \frac{s+t+w+x}{4} - \frac{u+v+y+z}{4} \tag{7}$$

$$\Delta(C,c) = \frac{s+u+w+y}{4} - \frac{t+v+x+z}{4} \tag{8}$$

$$\Delta(D,d) = \frac{s+t+y+z}{4} - \frac{u+v+w+x}{4} \tag{9}$$

$$\Delta(E,e) = \frac{s+u+x+z}{4} - \frac{t+v+w+y}{4} \tag{10}$$

$$\Delta(F, f) = \frac{s + u + x + z}{4} - \frac{t + v + w + y}{4} \quad (11)$$

$$\Delta(G, g) = \frac{s + v + w + z}{4} - \frac{t + u + x + y}{4} \quad (12)$$

Se deben establecer las siete comparaciones posibles, es decir las diferencias entre la variable de mayor valor versus la de menor valor:

Δ(A-a), Δ(B-b), Δ(C-c), Δ(D-d), Δ(E-e), Δ(F-f) y Δ(G-g)

De este modo se puede conocer el efecto de cada variable. En este sentido, cuanto mayor sea la diferencia de los resultados entre el valor mayor y el valor menor |Δ(X-x)|, mayor influencia tendrá dicha variable en el método analítico.

Como criterio de aceptación para la robustez del método se considera que la diferencia entre el valor alto y el valor bajo sea inferior a √2 de la desviación estándar de la precisión del método (S), es decir:

$$|\Delta(X\text{-}x)| < \sqrt{2}\, S$$

Se comparan los valores absolutos de las influencias de los factores con el estimador de comparación. Aquellos factores con valores mayores al estimador se consideran críticos y no deben modificarse durante el análisis de las muestras.

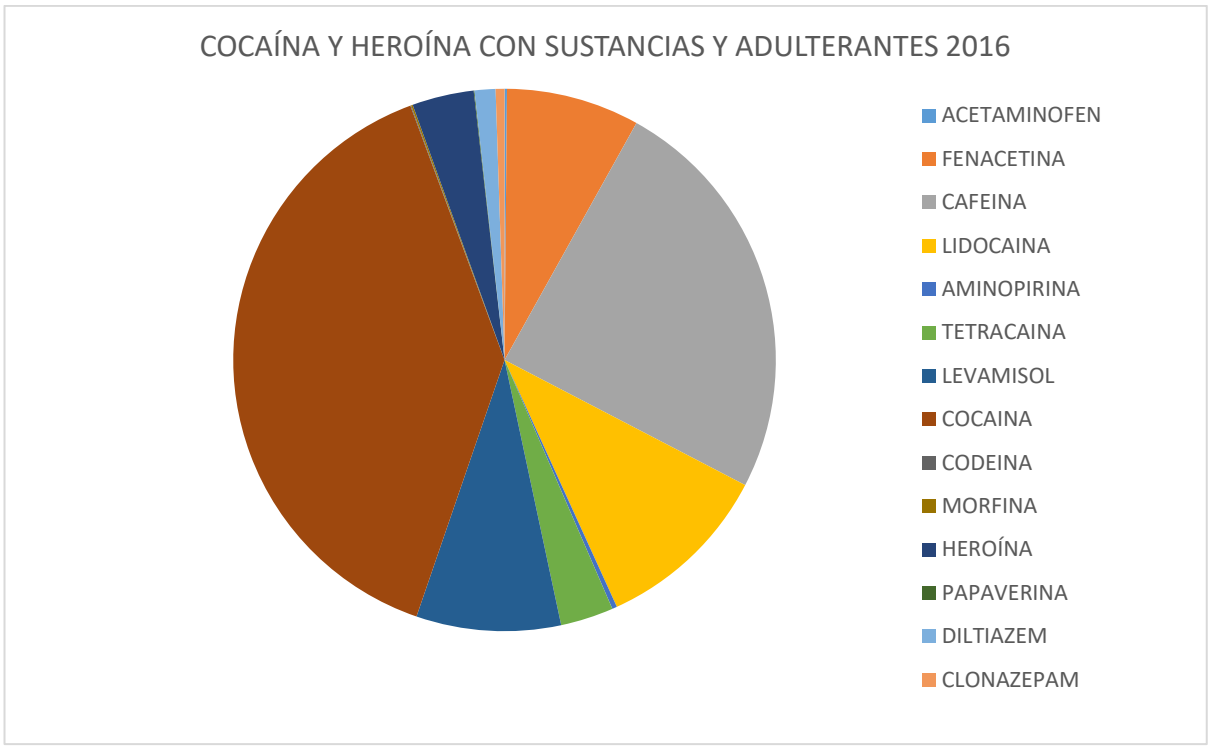
5. RESULTADOS

5.1 REVISION DE NOTICIAS CRIMINALES

El laboratorio de Química de la Fiscalía General de la Nación, de la ciudad de Cúcuta, seccional Norte de Santander se abrió en el mes de Abril del año 2016, por lo cual se realizó una revisión de las 1614 muestras analizadas en el año 2016 (ver figura 11), dentro de las cuales se encuentran muestras de cocaína, heroína y cannabis; de este modo se reportó que los principales adulterantes mezclados con la cocaína y sustancias que son extraídas de la planta del opio hallados en muestras heroína fueron: acetaminofén, fenacetina, cafeína, lidocaína, aminopirina, tetracaína, levamisol, codeína, morfina, papaverina, diltiazem y clonazepam. En el 2017 se analizaron 2011 muestras de cocaína, heroína y cannabis. En las muestras de cocaína y heroína se reportaron los mismos adulterantes encontrados en el 2016 pero además de estos se encontraron sustancias como el fitol y el ácido palmítico (ver figura 11).

La realización de las estadísticas de las 3625 muestras analizadas entre los años 2016 y 2017, determinó la base de los adulterantes más comunes en las muestras de cocaína, analizadas en el laboratorio de química de la Fiscalía General de la Nación en Cúcuta; de este modo se indicaron que el acetaminofén, la fenacetina, cafeína, lidocaína, aminopirina, tetracaína, levamisol, y muy pocas muestras se encontraron en combinación con el diltiazem y papaverina. Las muestras de heroína analizadas reportaron como principales adulterantes la cafeína y muy pocas con diltiazem, sin embargo se encontraron sustancias provenientes de la planta del opio como la codeína y morfina.

En las muestras de cannabis que fueron analizadas, se hallaron en su gran mayoría el Δ9-THC y cannabidiol, de igual forma se encontró el compuesto cannabinol debido a la degradación de la planta (ver figura 12).



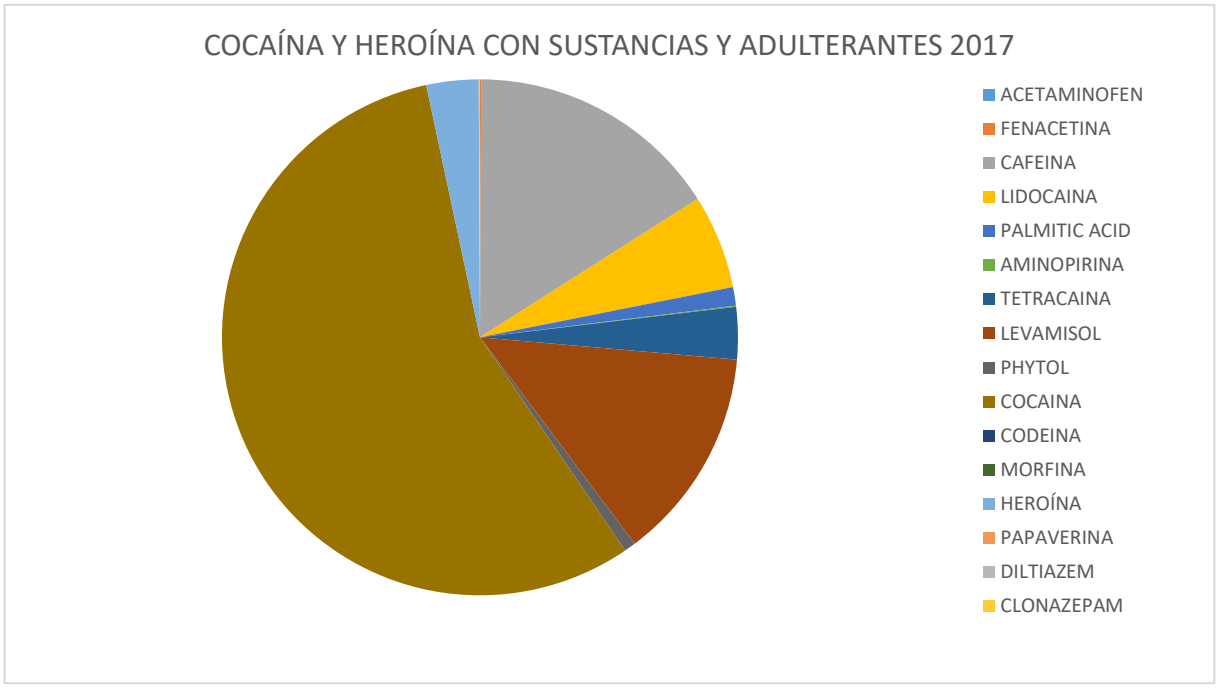


Figura 11. Adulterantes y sustancias encontradas en los análisis de muestras de cocaína y heroína en el año 2016 y 2017.

Fuente: Realizada por el autor.

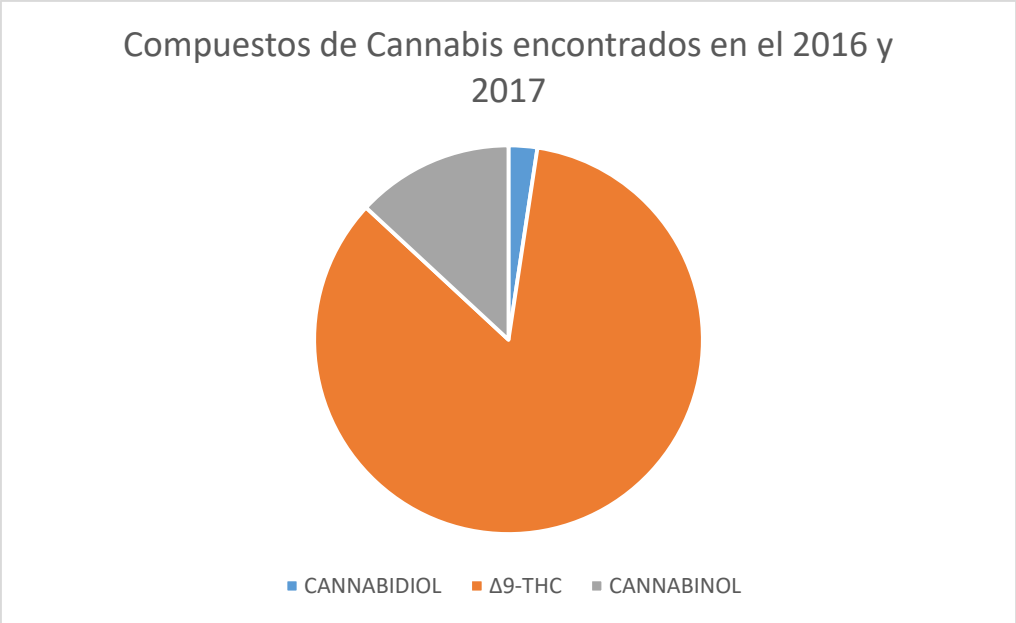


Figura 12. Sustancias encontradas en las muestras de cannabis del año 2016 y 2017.

Fuente: Realizado por el autor.

5.2 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR

Las pruebas preliminares son el primer paso para identificar una o más sustancias en el lugar de los hechos, aportando así a las autoridades elementos de prueba de la investigación. Con el fin de unificar criterios para todas las entidades del Estado se desarrolló en todo el país la Prueba de Identificación Preliminar Homologada (PIPH), de acuerdo con el proyecto ADCOL 98/C58 firmado por la UNODC y la Fiscalía General de la Nación, para la identificación preliminar de sustancias y drogas sometidas a fiscalización por el Consejo Nacional de Estupefacientes y aprobada por el Consejo de Policía Judicial según Acuerdo No. 002 de 1999 [45].

5.2.1 Cocaína

5.2.1.1 Selectividad.

Para la determinación de selectividad, se realizó por triplicado materiales de referencia en óptimas condiciones especificadas para la prueba, de igual forma se tuvo en cuenta los precursores o impurezas provenientes de la extracción o síntesis del analito y adulterantes o diluyentes identificados previamente en las muestras de rutina (ver apartado 5.1); sin embargo, no fue posible realizar las PIPH a todas las sustancias y adulterantes mencionados en los informes emitidos por la entidad, debido a que no se tenía la disponibilidad de todas estas sustancias en el laboratorio; así que las sustancias analizadas fueron aminopirina, fenacetina, procaína, lidocaína, cafeína, tetracaina, levamisol, diltiazem, papaverina, acetaminofén e hidroxicina que son sustancias previamente caracterizadas, junto con el patrón de cocaína.

Tabla 7. Resultados de las pruebas preliminares.

Muestra	**Ensayo Tanred**		**Ensayo Scott**	
	Resultados positivos	Resultados negativos	Resultados positivos	Resultados negativos
Aminopirina	3	0	0	3
Fenacetina	0	3	0	3
Procaína	3	0	0	3
Lidocaína	3	0	0	3
Cafeína	0	3	0	3
Tetracaina	3	0	3	0
Levamisol	3	0	3	0
Diltiazem	3	0	3	0
Acetaminofen	0	3	0	3
Hidroxicina	3	0	3	0
Cocaína	3	0	3	0

Fuente: Realizado por el autor.

Las fotografías de los resultados consolidados en la tabla 7 se encuentran en el **Anexo 1.**

Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz

La prueba de Tanred fue selectiva para la determinación de cocaína dado el precipitado lechoso presentado (ver figura 13) y de igual forma se mostró positivo para los adulterantes de aminopirina, procaina, lidocaína, tetracaina levamisol, diltiazem e hidroxicina.

La prueba de Scott se realiza utilizando una solución de tiocianato de cobalto en medio ácido, que en presencia de cocaína, produce un complejo de cobalto II de coloración azul (ver ecuación 6) [46].

$$Co^{2+} + 4SCN^{-} + 2B: \leftrightarrow [Co(SCN)4B2]^{2-} \quad (6)$$

(Color Rosa) (Color azul)

Este complejo que presenta coloración azul, fue observado en los análisis realizados, por lo cual se indica que el ensayo Scott es selectivo para la identificación de cocaína debido al resultado positivo y para las sustancias de tetracaina, levamisol, diltiazem e hidroxicina, reportaron de la misma forma positivo.

Figura 13. Prueba preliminar realizada a la cocaína (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el autor.

La reacción preliminar permite la identificación del analito de interés, lo cual demuestra que el desarrollo de estas pruebas es selectiva pero no específica para él, por lo que no permite llegar a la identificación definitiva, es por ello que se debe incurrir al análisis instrumental. Los resultados de la prueba preliminar son repetibles para las muestras analizadas, ya que en la elaboración del ensayo por triplicado dio el mismo resultado para cada muestra.

5.2.1.2 Límite de detección.

En el desarrollo del análisis del límite de detección se utilizaron diferentes cantidades de muestra de cocaína cuantificada previamente en mezcla con silica, la cual actúa como blanco en este ensayo y se repitió tres veces para cada concentración aplicando el reactivo de Tanred y Scott. Para calcular el límite de detección de la prueba se escoge la cantidad mínima en la cual los resultados fueron positivos en todas las repeticiones (ver tabla 8).

Tabla 8. Límite de detección de la prueba preliminar de cocaína.

Cantidad	**Ensayo Tanred**		**Ensayo Scott**	
Muestras de 40 mg de mezcla de cocaína y sílica	Resultados Positivos	Resultados Negativos	Resultados Positivos	Resultados Negativos
80 % de cocaína	3	0	3	0
70 % de cocaína	3	0	3	0
60 % de cocaína	3	0	3	0
50 % de cocaína	3	0	3	0
40 % de cocaína	3	0	3	0
30 % de cocaína	3	0	3	0
20 % de cocaína	3	0	3	0
10 % de cocaína	3	0	3	0
5 % de cocaína	3	0	0	3

Fuente: Realizado por el autor.

Las fotografías de los resultados consolidados en la tabla 8 se encuentran en el **Anexo 2.** De esta manera las pruebas preliminares realizadas para la cocaína demuestra que el límite de detección esta dado cuando la cocaína se encuentra en una mezcla al 10%, es decir para una pequeña cantidad de 40 mg, donde se tiene 4 mg de cocaína y 36 mg de silica los ensayos de Tanred y Scott son positivos. Después de realizar el ensayo con cocaína al 5%, no se realizan pruebas con menores cantidades ya que se consideran muy pequeñas y no son las acostumbradas en este tipo de análisis.

Efecto matriz: En el desarrollo de este parámetro se procedió a preparar una mezcla de cocaína a la concentración establecida como límite de detección con las sustancias que no dieron positivo en los ensayos de selectividad. Por consiguiente se preparó 5 mezclas, las cuales fueron: cocaína al 10% en mezcla con aminopirina, cocaína al 10% en mezcla con fenacetina, cocaína al 10% en mezcla con lidocaína, cocaína al 10% en mezcla con cafeína y cocaína al 10% en mezcla con acetaminofén; estas sustancias fueron seleccionadas porque fueron los adulterantes más comunes que se analizaron con la cocaína según los informes reportados entre el año 2016 y 2017. Los resultados reportados fueron los siguientes:

Tabla 9. Efecto matriz de la prueba preliminar de cocaína.

Muestra	**Ensayo Tanred**		**Ensayo Scott**	
	Resultados positivos	Resultados negativos	Resultados positivos	Resultados negativos
Cocaína 10%-aminopirinia 90%	3	0	0	3
Cocaína 10%-Fenacetina 90%	3	0	0	3
Cocaína 10%-Lidocaína 90%	3	0	0	3
Cocaína 10%-Cafeína 90%	3	0	0	3
Cocaína 10%-Acetaminofén 90%	0	3	0	3

Fuente: Realizado por el autor.

Las fotografías de los resultados consolidados en la tabla 9 se encuentran en el **Anexo 3.** Las muestras analizadas reportaron que la cocaína al 10% puede ser enmascarada por los adulterantes investigados, es decir los adulterantes tales como, la fenacetina, aminopirina, lidocaína y cafeína proporcionan en mezcla con la cocaína un falso negativo en el ensayo de Scott a la concentración de límite de detección de dicha sustancia. El acetaminofén en mezcla con la cocaína al 10% dan falsos negativos para los ensayos de Tanred y Scott, por lo que se determina que estos ensayos pueden presentar fluctuaciones en la identificación de la cocaína cuando es mezclada con los adulterantes estudiados, es por ello que se recomienda rectificar el resultado con el análisis instrumental como una verificación necesaria de los resultados,

5.2.1.3 Sensibilidad, especificidad, índice de younden, relación de likelihood.

Para este estudio se consolidaron los resultados del laboratorio durante el periodo 2016-04-14 a 2017-08-03 impartida por los informes de laboratorio de la Fiscalía General de la Nación de la ciudad de Cúcuta, seccional de Norte de Santander. Con estos resultados se construyen las siguientes tablas.

Tabla 10. Comparación de prueba preliminar de Tanred vs. Cromatografía de gases-masas para cocaína.

		Cromatografía Gases-Masas	
		Positivo	Negativo
Pruebas preliminares	Positivo	1430	7
	Negativo	5	14

Fuente: Realizado por el autor.

Tabla 11. Comparación de prueba preliminar Scott vs. Cromatografía de gases-masas para cocaína.

		Cromatografía Gases-Masas	
		Positivo	Negativo
Pruebas preliminares	Positivo	1435	7
	Negativo	6	8

Fuente: Realizado por el autor.

Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz

Con los resultados de las tabla 10 y la tabla 11 se calcula la sensibilidad y especificidad de las pruebas preliminares de Tanred y Scott, evaluadas contra el método de cromatografía de gases con espectrómetro de masas.

Sensibilidad

Dado que la sensibilidad es la capacidad del método cualitativo para determinar las muestras que realmente son positivas, con los resultados consolidados del año 2016 hasta agosto del 2017 se determinó la sensibilidad para la prueba Tanred según a ecuación 2, de la siguiente manera:

$$Sensibilidad\ para\ Tanred = \left(\frac{1430}{1430 + 5}\right) = 0.9965$$

De igual forma se determinó la sensibilidad para la prueba Scott, dando el siguiente resultado:

$$Sensibilidad\ para\ Scott = \left(\frac{1435}{1435 + 6}\right) = 0.9958$$

Estos resultados expresa que de 1456 muestras estudiadas de los informes de PIPH en comparación con el cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas, el ensayo de Tanred es la prueba más selectiva y sensible con un valor 99.65%, sin embargo, el ensayo Scott tiene un valor de sensibilidad de 99.58%, el cual es muy cercano al ensayo de Tanred, demostrando que estos ensayos son sensibles para la identificación de muestras positivas de cocaína.

Especificidad

La especificidad es la capacidad de las prueba de tamizaje para identificar las muestras negativas del total de las muestras recibidas. Según la ecuación 3 y con los datos obtenidos

de los ensayos de Tanred y Scott estipulados en las tablas 8 y 9, se obtuvieron los siguientes resultados de especificidad:

$$Especifidad\ para\ Tanred = \left(\frac{14}{14+7}\right) = 0.6667$$

$$Especificidad\ para\ Scott = \left(\frac{8}{8+7}\right) = 0.5333$$

Estos datos determinan que las pruebas PIPH tienen una buena sensibilidad pero no permite ser específicas para la identificación de cocaína, por lo cual se logra una identificación preliminar para posteriormente realizar un análisis cromatografico y de este modo reportar resultados corroborados.

Relación de likelihood

Según la ecuación 4 se determinó la relación de likelihood para los ensayos de Tanred y Scott, los cuales fueron:

$$Relación\ de\ likelihood\ para\ Tanred = \left(\frac{0.9965}{1-0.6667}\right) = 2.99$$

$$Relación\ de\ likelihood\ para\ Scott = \left(\frac{0.9958}{1-0.5333}\right) = 2.13$$

La relación de Likelihood o de verosimilitud indica la probabilidad de la identificación de muestras positivas por las pruebas preliminares, por lo cual se interpreta que la prueba de Tanred es 3 veces más verosímil para la identificación de muestras con presencia de cocaína y la prueba de Scott tiene 2,13 veces más probabilidad de identificación de muestras positivas. De este modo, un test diagnóstico es de mayor utilidad en la medida en que la

relación de Likelihood sea de mayor magnitud, puesto que permite confirmar con certeza la presencia de muestras positivas.

Indice de youden

De la misma forma en la que se manejaron los parámetros anteriores, con los datos de sensibilidad y especificidad se estableció el índice de youden con la ecuación 5, para los ensayos de Tanred y Scott.

$$Indice\ de\ Youden\ para\ Tanred = 0.9965 + 0.6667 - 1 = 0.6632$$

$$Indice\ de\ Youden\ para\ Scott = 0.9958 + 0.5333 - 1 = 0.5291$$

El índice de youden fue sugerido por William J. Youden en 1950 como una manera de resumir el rendimiento de una prueba de diagnóstico [47]. Su valor puede ser de 0 a 1, donde un valor de 1 indica que no hay falsos positivos o falsos negativos, es decir la prueba es perfecta, por otro lado, cuando una prueba da la misma proporción de resultados positivos y negativos, se indica un valor de cero, denotando así, que la prueba sería inútil aplicarla [48]. De modo que con los resultados se observa que los índices de youden para la prueba de Tanred y Scott son 0.6632 y 0.5291 respectivamente, lo que indica que no es una prueba perfecta pero si es válida su realización, debido a que la sensibilidad de las pruebas tanto de Tanred como Scott son muy cercanas a 1, lo cual indica que las pruebas son buenas para reconocer las muestras que son realmente positivas. Sin embargo, al reconocer que no son pruebas específicas se recomienda la continuación de la identificación de las sustancias psicoactivas con el análisis de cromatografía de gases.

5.2.2 Heroína

5.2.2.1 Selectividad.

Para el desarrollo de este parámetro se procedió a analizar por triplicado materiales de referencia en óptimas condiciones especificadas para la prueba, de igual forma se tuvo en cuenta los precursores o impurezas provenientes de la extracción o síntesis del analito y adulterantes o diluyentes identificados previamente en las muestras de rutina (ver apartado 5.1).

Las sustancias analizadas provenientes de la planta del opio y los adulterantes encontrados con la heroína según las noticias criminales fueron: codeína, morfina y papaverina, el 6-monoacetilmorfina se tomó como sustancia extra para análisis debido a su disponibilidad en el laboratorio. A dichas sustancias se les realizó las pruebas de Tanred, seguido de la prueba Scott, continuando con la prueba Marquis y finalizando con la prueba de ácido nítrico (ver tabla 12).

Tabla 12. Resultados de las pruebas preliminares para la heroína.

Muestra	**Ensayo Tanred**		**Ensayo Scott**		**Ensayo Marquis**		**Ensayo HNO3**	
	+	**-**	**+**	**-**	**+**	**-**	**+**	**-**
Codeína	3	0	0	3	3	0	3	0
Morfina	3	0	0	3	3	0	3	0
Papaverina	3	0	0	3	3	0	3	0
6-monoacetilmorfina	0	3	0	3	3	0	3	0
Heroína	3	0	0	3	3	0	3	0

Fuente: Realizado por el autor.

Las fotografías de los resultados consolidados en la tabla 12 se encuentran en el **Anexo 1.**

La prueba de Tanred fue selectiva para la determinación de heroína dado que se presentó el precipitado lechoso (ver figura 14) y de igual forma se mostró positivo para las sustancias de codeína, morfina y papaverina. Por otro lado, la prueba Scott reportó resultado negativo para todas las sustancias exceptuando la 6-monoacetilmorfina; sin embargo, como se aprecia en

el Anexo 1 (ver figura 36) se puede observar que el ensayo de Scott para la papaverina se ve una coloración azul lo que indica positivo a simple vista, pero cabe destacar que esta coloración no se da inmediatamente, dando como resultado final negativo ya que la coloración azul se presenta a los tres segundos después de haber agregado el reactivo y no al instante.

La prueba de Marquis fue selectiva para la identificación de heroína debido a la coloración purpura-violeta que indicó positivo y de igual forma para las sustancias de codeína, morfina, 6-monoacetilmorfina y papaverina. Esta coloración se presenta debido a que dos moléculas de morfina se condensan con dos moléculas de formaldehído en presencia de ácido sulfúrico concentrado para formar el producto dimérico el cual es protonado a la sal de oxoniocarbonio [35].

Finalmente la prueba de ácido nítrico denotó positivo para todas las sustancias analizadas; según el II curso de actualización de protocolo de PPH, se indica color amarillo como positivo en la prueba de ácido nítrico para las sustancias de codeína y papaverina, un color naranja para las sustancias de morfina y 6-monoacetilmorfina y para la heroína se observa un color verde [35].

La reacción preliminar permite la identificación de la heroína, lo cual demuestra que el desarrollo de estas pruebas es selectiva pero no específica para ella, por lo que no permite llegar a la identificación definitiva, es por ello que se debe proceder con el análisis instrumental. Los resultados de la prueba preliminar para la heroína y sustancias afines son repetibles para las muestras analizadas, ya que en la elaboración del ensayo por triplicado dio el mismo resultado para cada sustancia estudiada.

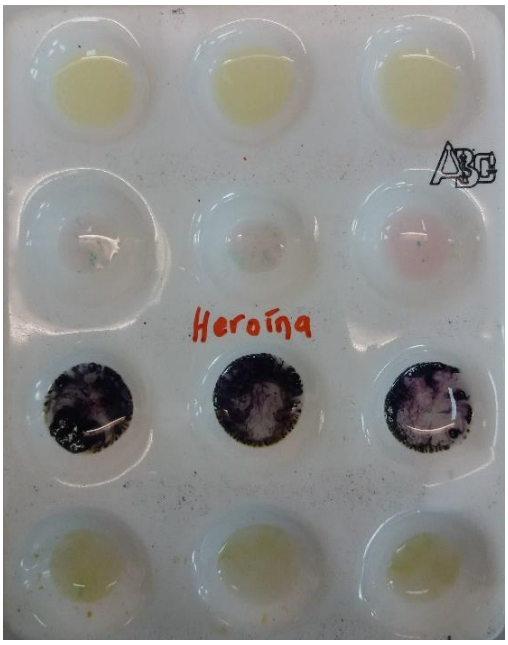


Figura 14. Prueba preliminar realizada a la heroína (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3).

Fuente: Realizado por el autor.

5.2.2.2 Límite de detección.

En el desarrollo del análisis del límite de detección se utilizaron diferentes cantidades de muestra de heroína cuantificada previamente en mezcla con silica (tal como se realizó para la cocaína), la cual actúa como blanco en este ensayo y se realizó el análisis por triplicado para cada concentración aplicando el reactivo de Tanred, Scott, Marquis y HNO_3 según el método de análisis de la entidad. Para calcular el límite de detección de la prueba se escoge la cantidad mínima en la cual los resultados fueron positivos en todas las repeticiones (ver tabla 13).

Tabla 13. Límite de detección de la prueba preliminar de heroína.

Cantidad	Ensayo Tanred		Ensayo Scott		Ensayo Marquis		Ensayo HNO_3	
Muestras de heroína y sílica	+	-	+	-	+	-	+	-
80 % de heroína	3	0	0	3	3	0	3	0
70 % de heroína	3	0	0	3	3	0	3	0
60 % de heroína	3	0	0	3	3	0	3	0
40 % de heroína	3	0	0	3	3	0	3	0
30 % de heroína	3	0	0	3	3	0	3	0
20 % de heroína	3	0	0	3	3	0	3	0
10 % de heroína	3	0	0	3	3	0	3	0
5 % de heroína	3	0	0	3	0	3	3	0

Fuente: Realizado por el autor.

Las fotografías de los resultados consolidados en la tabla 13 se encuentran en el **Anexo 4.**

Con los datos expresados, se determina como límite de detección la mínima cantidad en la cual los resultados fueron positivos en todas las repeticiones. De este modo el límite de detección en las pruebas preliminares para heroína es en una mezcla del 10 %, es decir a esta concentración los 4 ensayos realizados dieron los valores que son estipulados para la identificación de la heroína (ver figura 9).

Después de realizar el ensayo con heroína al 5%, no se realizan pruebas con menores cantidades ya que se consideran muy pequeñas y no son las acostumbradas a analizar en este tipo de análisis.

Efecto matriz: En el desarrollo de este parámetro se procedió a preparar una mezcla de heroína al 10% de concentración la cual fue establecida como límite de detección, con las

sustancias que dieron negativo en los ensayos de selectividad de la cocaína; esto debido a que las sustancias analizadas con la heroína dieron positivas en los ensayos de Tanred, Marquis y HNO3 y negativo en el ensayo de Scott, dichos resultados fueron iguales en el análisis de heroína por lo que no se podría ver un enmascaramiento o presencia de un falso negativo, además según los informes estudiados en el laboratorio de la entidad se observó las presencia de mezclas de heroína con cocaína y sus adulterantes. Los resultados del efecto matriz fueron los siguientes:

Tabla 14. Efecto matriz de la prueba preliminar de heroína.

Muestra	**Ensayo Tanred**		**Ensayo Scott**		**Ensayo Marquis**		**Ensayo HNO_3**	
	+	**-**	**+**	**-**	**+**	**-**	**+**	**-**
Heroína 10%-aminopirina 90%	3	0	0	3	0	3	0	3
Heroína 10%-Fenacetina 90%	3	0	0	3	0	3	0	3
Heroína 10%-Lidocaína 90%	3	0	0	3	3	0	0	3
Heroína 10%-Cafeína 90%	3	0	0	3	0	3	0	3
Heroína 10%-Acetaminofén 90%	0	3	0	3	3	0	0	3

Fuente: Realizado por el autor.

Las fotografías de los resultados consolidados en la tabla 14 se encuentran en el **Anexo 5.**

Las muestras analizadas reportaron que la heroína al 10% puede ser enmascarada por los adulterantes investigados, es decir los adulterantes tales como: la fenacetina, aminopirina, cafeína y acetaminofen proporcionan como respuesta en la mezcla con la heroína, un falso negativo en el ensayo Marquis y adicionalmente a estas sustancias la lidocaína da negativo en el ensayo de HNO_3. Los ensayos de Marquis y HNO_3 son los más selectivos para la identificación de opiáceos, por lo que se determina que estos ensayos pueden presentar fluctuaciones en la identificación de la heroína cuando es mezclada con los adulterantes estudiados, es por ello que se recomienda rectificar el resultado con el análisis instrumental.

5.2.2.3 Sensibilidad, especificidad, índice de younden, relación de likelihood.

Con los informes de la Fiscalía General de la Nación de la ciudad de Cúcuta, seccional de Norte de Santander del periodo 2016-04-14 a 2017-08-03 se construyen las tablas 15 y 16 para los ensayos que son más determinantes para la presencia de opiáceos.

Tabla 15. Comparación de prueba preliminar de Marquis vs. Cromatografía de gases-masas para la heroína.

		Cromatografía Gases-Masas	
		Positivo	Negativo
Pruebas preliminares	Positivo	93	0
	Negativo	0	1

Fuente: Realizado por el autor.

Tabla 16. Comparación de prueba preliminar HNO_3 vs. Cromatografía de gases-masas para la heroína.

		Cromatografía Gases-Masas	
		Positivo	Negativo
Pruebas preliminares	Positivo	93	0
	Negativo	0	1

Fuente: Realizado por el autor.

Con los resultados de las tabla 15 y la tabla 16 se procedió a calcular la sensibilidad y especificidad de las pruebas preliminares de Marquis y HNO_3, evaluadas contra el método de cromatografía de gases con espectrómetro de masas determinando los resultados positivos, negativos, falsos negativos y falsos positivos.

Sensibilidad

Con los resultados consolidados del año 2016 hasta agosto del 2017 se determinó la sensibilidad para la prueba Marquis y HNO_3 según a ecuación 2, de este modo, se estudia la

Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz

capacidad del método cualitativo para determinar las muestras que realmente son positivas de la siguiente manera:

$$Sensibilidad\ para\ Marquis = \left(\frac{93}{93+0}\right) = 1$$

$$Sensibilidad\ para\ HNO3 = \left(\frac{93}{93+0}\right) = 1$$

Entre las muestras estudiadas de los informes de la entidad en los años 2016 y 2017 se encontraron 93 de 94 muestras analizadas que contenían heroína; con estos datos se determinó que los ensayos de Marquis y HNO_3 son pruebas muy sensibles debido a su valor de 1, de esta forma estas pruebas preliminares son de gran ayuda para la identificación de muestras positivas cuando realmente contiene heroína.

Especificidad

La especificidad es el parámetro que identifica las muestras negativas del total de las muestras recibidas. Al aplicar la ecuación de especificidad (ver ecuación 3) a las 94 muestras estudiadas, los resultados obtenidos de especificidad para los ensayos de Marquis y HNO_3 fueron los siguientes:

$$Especifidad\ para\ Marquis = \left(\frac{1}{1+0}\right) = 1$$

$$Especificidad\ para\ HNO3 = \left(\frac{1}{1+0}\right) = 1$$

Los valores de 1 para la especificidad de los ensayos de Marquis y HNO3 indican que las pruebas preliminares son muy específicos, logrando así una identificación de muestras negativas en la totalidad de las muestras.

Relación de likelihood

Para la determinación de la relación de likelihood, se aplicó la ecuación 4 a las muestras de heroína estudiadas según los informes de la entidad para los ensayos Marquis y HNO_3, los cuales fueron:

$$Relación\ de\ likelihood\ para\ Marquis = \left(\frac{1}{1-1}\right) = Se\ indetermina$$

$$Relación\ de\ likelihood\ para\ HNO3 = \left(\frac{1}{1-1}\right) = Se\ indetermina$$

Debido a que los ensayos tienen una buena especificidad y sensibilidad del 100%, la relación de likelihood se indetermina, ya que no se identifican en las muestras de los informes estudiados, falsos negativos o falsos positivos, por lo cual no hay una probabilidad mayor de encontrar más muestras positivas que negativos, si no que se expresa directamente los resultados que al ser comparados con el análisis instrumental dan una buena similitud con los resultados de las pruebas preliminares.

Indice de youden

De la misma forma en la que se manejaron los parámetros anteriores, con los datos de sensibilidad y especificidad se estableció el índice de youden con la ecuación 5, para los ensayos de Marquis y HNO_3.

$$Indice\ de\ Youden\ para\ Marquis\ = 1 + 1 - 1 = 1$$

$$Indice\ de\ Youden\ para\ HNO3 = 1 + 1 - 1 = 1$$

Dado que el índice de youden es de 1 para ambos ensayos, se determina que las pruebas preliminares para la heroína son perfectas, ya que no hay falsos positivos o falsos negativos [48]. Esto es debido a que las pruebas son muy sensibles y específicas, lo cual indica que las pruebas son buenas para reconocer las muestras que son realmente positivas y muestras verdaderamente negativas. Sin embargo, se recomienda la identificación de las sustancias psicoactivas con el análisis de cromatografía de gases acoplado al espectrómetro de masas para realizar la respectiva verificación.

5.2.3 *Cannabis Sativa*

5.2.3.1 Selectividad.

En el desarrollo del parámetro de selectividad se procedió a analizar por triplicado la planta de *Cannabis Sativa*, la cual fue impartida por el laboratorio de Química de la entidad.

Para el reconocimiento del compuesto principal de la planta de *Cannabis Sativa*, se realiza el procedimiento descrito (ver figura 10) por la entidad, donde se realiza el ensayo de Duquenois. A continuación se muestra los resultados del ensayo realizado a la muestra de la planta y el compuesto esencial Δ9-THC.

Tabla 17. Resultados de las pruebas preliminares para la *Cannabis Sativa*.

Muestra	**Ensayo Duquenois**	
	Resultado positivo	Resultado negativo
Cannabis sativa	3	0
Δ9-THC	3	0

Fuente: Realizado por el autor.

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA COLOMBIA

Formando líderes** para la **construcción** de un nuevo **país en paz

La prueba de Duquenois fue selectiva para la determinación del Δ9-THC (ver figura 15), dando como resultado positivo la aparición de un color en la gama del azul al violeta oscuro en la parte inferior del tubo [35].

Figura 15. Prueba preliminar realizada al patrón de Δ9-THC (Ensayo de Duquenois).

Fuente: Realizado por el autor.

La prueba de Duquenois en la planta de *Cannabis Sativa* también dio resultado positivo, en la cual se observó un tono más oscuro que la prueba realizada al Δ9-THC debido al material vegetal (ver figura 16). Con los ensayos realizados donde se usó el reactivo Duquenois se demostró que es selectivo para el principal componente del cannabis, dando así un resultado postivo como prueba preliminar para el analito de interés.

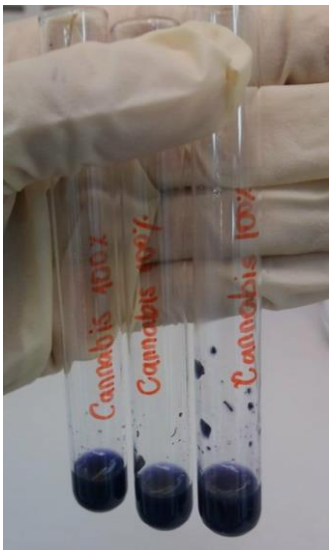


Figura 16. Prueba preliminar realizada a la planta de *Cannabis Sativa* (Ensayo de Duquenois).

Fuente: Realizado por el autor.

5.2.2.2 Límite de detección.

En el desarrollo del análisis del límite de detección se utilizaron diferentes cantidades de muestra de material vegetal de *Cannabis Sativa* cuantificada previamente en mezcla con tabaco, este actúa como blanco en el ensayo de Duquenois. Para la búsqueda del límite de detección se realizó el análisis por triplicado para cada concentración aplicando el reactivo Duquenois según el método de análisis de la entidad (ver figura 10) y de este modo se tomó la cantidad mínima en la cual los resultados fueron positivos en todas las repeticiones (ver tabla 18).

Tabla 18. Límite de detección de la prueba preliminar de *Cannabis Sativa*.

Cantidad	**Ensayo Duquenois**	
Muestras de cannabis y tabaco	Resultado positivo	Resultado negativo
80 % de cannabis	3	0
70 % de cannabis	3	0
60 % de cannabis	3	0
40 % de cannabis	3	0
30 % de cannabis	3	0
20 % de cannabis	3	0
10 % de cannabis	3	0
5 % de cannabis	3	0

Fuente: Realizado por el autor.

Las fotografías de los resultados consolidados en la tabla 18 se encuentran en el **Anexo 6.**

Con los datos expresados se determinó que a una concentración de *Cannabis Sativa* al 5%, el ensayo Duquenois sigue dando positivo, no se trabajó con una concentración menor, dado que el laboratorio no realiza las pruebas preliminares con cantidades pequeñas de muestra, así que se determinó que la prueba preliminar para las muestras de *Cannabis Sativa* son muy selectivas y a diversas cantidades se obtiene un resultado positivo.

Efecto matriz: Este parámetro no se realizó ya que las muestras de cannabis son analizadas solamente en material vegetal y no se ha encontrado antecedentes que sea mezclada con otra sustancia que pueda crear un falso negativo en el desarrollo del análisis**.**

5.2.2.3 Sensibilidad, especificidad, índice de younden, relación de likelihood.

Con los informes de la Fiscalía General de la Nación de la ciudad de Cúcuta, seccional de Norte de Santander del periodo de abril del 2016 a agosto del 2017 se construyó la tabla 19

para el ensayo de Duquenois y se comparó los resultados con el reportado por la técnica instrumental de cromatografía de gases acoplado al espectrómetro de masas.

Tabla 19. Comparación de prueba preliminar de Duquenois vs. Cromatografía de gases-masas para *Cannabis Sativa*.

		Cromatografía Gases-Masas	
		Positivo	Negativo
Pruebas preliminares	Positivo	1811	0
	Negativo	0	0

Fuente: Realizado por el autor.

Con los resultados de las tabla 19 donde se observan el análisis de 1811 muestras de cannabis analizadas, se procedió a calcular la sensibilidad y especificidad de las pruebas preliminares de Duquenois, evaluadas contra el método de cromatografía de gases con espectrómetro de masas determinando los resultados positivos, negativos, falsos negativos y falsos positivos.

Sensibilidad

En la determinación de la sensibilidad para la prueba Duquenois se hace uso de la ecuación 2, de este modo, se estudia la capacidad del método cualitativo para determinar las muestras que realmente son positivas de la siguiente manera:

$$Sensibilidad\ para\ Duquenois = \left(\frac{1811}{1811 + 0}\right) = 1$$

Entre las muestras estudiadas de los informes de la entidad se determinó que el ensayo de Duquenois, es una prueba muy sensible, por lo tanto la aplicación de esta prueba preliminar es indispensable para la identificación de muestras positivas cuando realmente contiene Δ9-THC como componente principal de la planta de *Cannabis Sativa*.

Especificidad

La especificidad es el parámetro que identifica las muestras negativas del total de las muestras recibidas. Al aplicar la ecuación de especificidad (ver ecuación 3) a las 1811 muestras estudiadas, el resultado obtenido de especificidad para el ensayo de Duquenois fue el siguiente:

$$Especifidad\ para\ Duquenois = \left(\frac{0}{0+0}\right) = Se\ indetermina$$

Se observa que la ecuación se indetermina, esto debido a que no han habido muestras de cannabis que al aplicar las pruebas preliminares de Duquenois haya dado un resultado negativo según los informes; por lo cual se indica que esta prueba preliminar no es especifica.

Relación de likelihood

Para la determinación de la relación de likelihood, se aplicó la ecuación 4 a los resultados de las muestras de cannabis estudiadas según los informes de la entidad para el ensayo de Duquenois. La ecuación no se puede realizar debido a que la especificidad hace parte de la ecuación y esta se encuentra indeterminada, por lo cual, no se puede establecer que probabilidad de positivos se tendrá para el desarrollo de la prueba preliminar de Duquenois, sino que simplemente con el resultado de sensibilidad se sabe que al ser aplicado el reactivo Duquenois a las plantas incautadas de cannabis, darán positivo debido a la alta sensibilidad del análisis.

Indice de youden

De la misma forma de cómo fue tratada la relación de likelihood, no se puede calcular el índice de youden debido a la indeterminación de la especificidad.

Las muestras de la planta de *Cannabis Sativa* son reconocidas en su apariencia y en su olor característico, lo cual a simple vista se sabe que es una planta *Cannabis Sativa* con Δ9-THC como componente principal, así que se hace innecesario realizar la prueba preliminar ya que desde un inicio se estipula con certeza que es una planta *Cannabis Sativa*, sin embargó la entidad tiene un protocolo previamente estudiado y estipulado que debe ser cumplido.

5.3 CROMATOGRAFIA DE GASES CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS

5.3.1 Cocaína y heroína

5.3.1.1 Especificidad

El primer paso a realizar fue la identificación de los patrones y las sustancias de referencia caracterizadas, mediante el uso de CG-MS. De este modo se estableció los tiempos de retención en los que aparece cada sustancia y los iones seleccionados de acuerdo a la relación de masa/carga (m/z).

El espectro de masas se representa en forma de un gráfico de barras, donde cada pico del espectro representa un fragmento de la molécula. La intensidad de los picos son proporcionales a la abundancia relativa de los fragmentos correspondientes y a la estabilidad relativa, donde se da un valor de 100% al pico más intenso del espectro, al que se denomina pico base [35]. Los resultados de las sustancias analizadas son los siguientes:

Tabla 20. Tiempos de retención (min) e iones principales (m/z) de las sustancias de cocaína, adulterantes y heroína.

SUSTANCIA	Tiempo de retención (min)	Iones principales (m/z)
Acetaminofén	3,180	109,80,43,151
Fenacetina	3,269	108,137,43,179
Cafeína	4,157	109,55,67,194
Lidocaína	4,399	86,58,30,234
Aminopirina	4,723	56,97,111,231
Levamisol	5,234	148,101,73,204
Procaína	5,558	86,99,120,58
Cocaína	7,430	82,182,77,303
Tetracaína	7,818	58,71,150,176
Codeína	10,223	162,42,215,299
Morfina	10,666	162,42,215,285
Heroína	11,882	327,268,310,369
Papaverina	12,902	324,338,293,339
Hidroxicina	13,151	201,165,299,375
Diltiazem	13,552	58,71,121,415

Fuente: Realizado por el autor.

Los cromatogramas y espectros de masas de los adulterantes y sustancias provenientes del opio, consolidados en la tabla 20 se encuentran en el **ANEXO 7**. La cocaína reportó que su tiempo de retención según el cromatograma fue de 7.430 minutos (ver figura 17), y la heroína con un tiempo de retención de 11.882 minutos (ver figura 18).

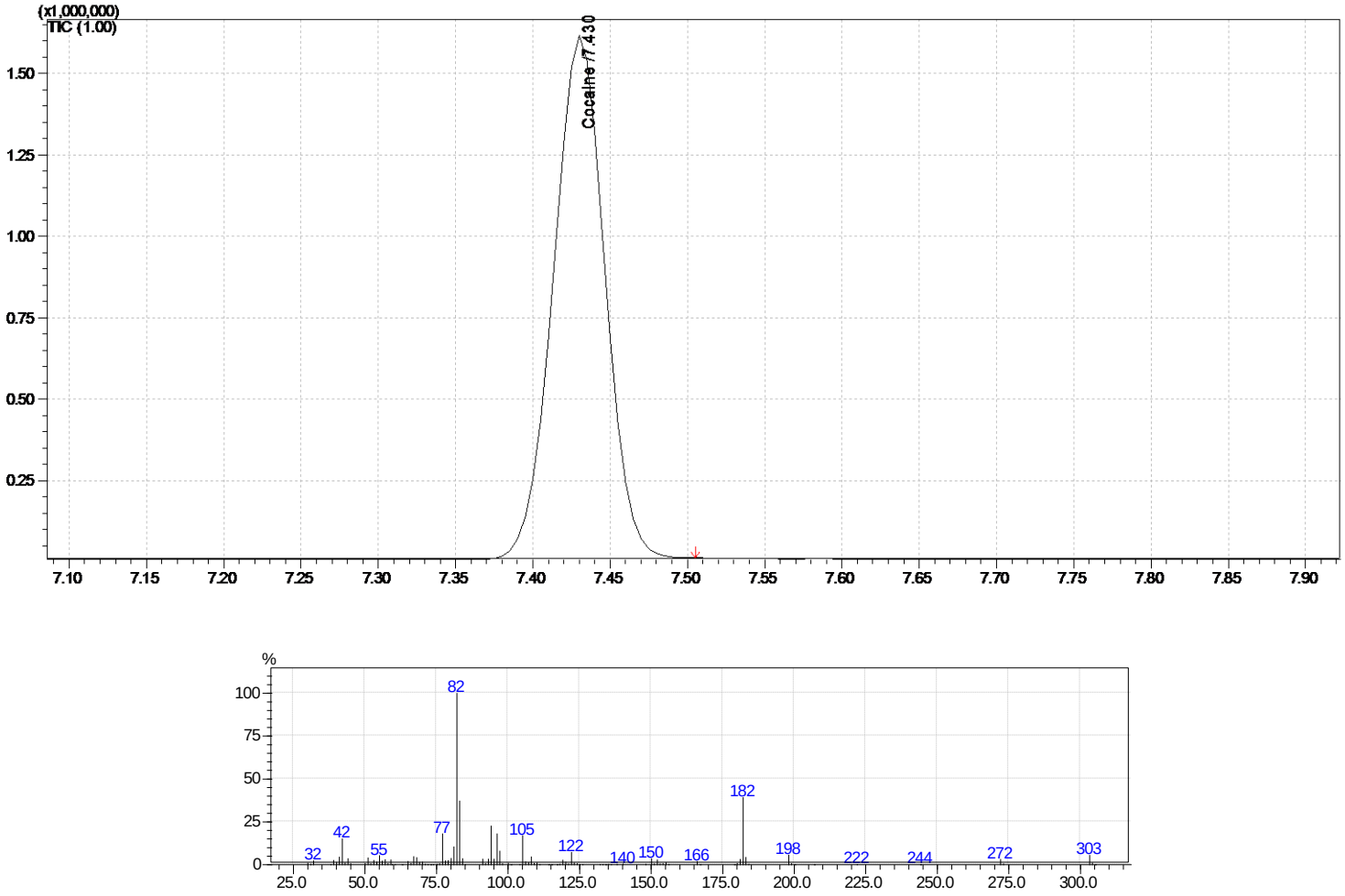


Figura 17. Cromatograma y espectro de masas de la cocaína.

Fuente: Realizado por el Autor.

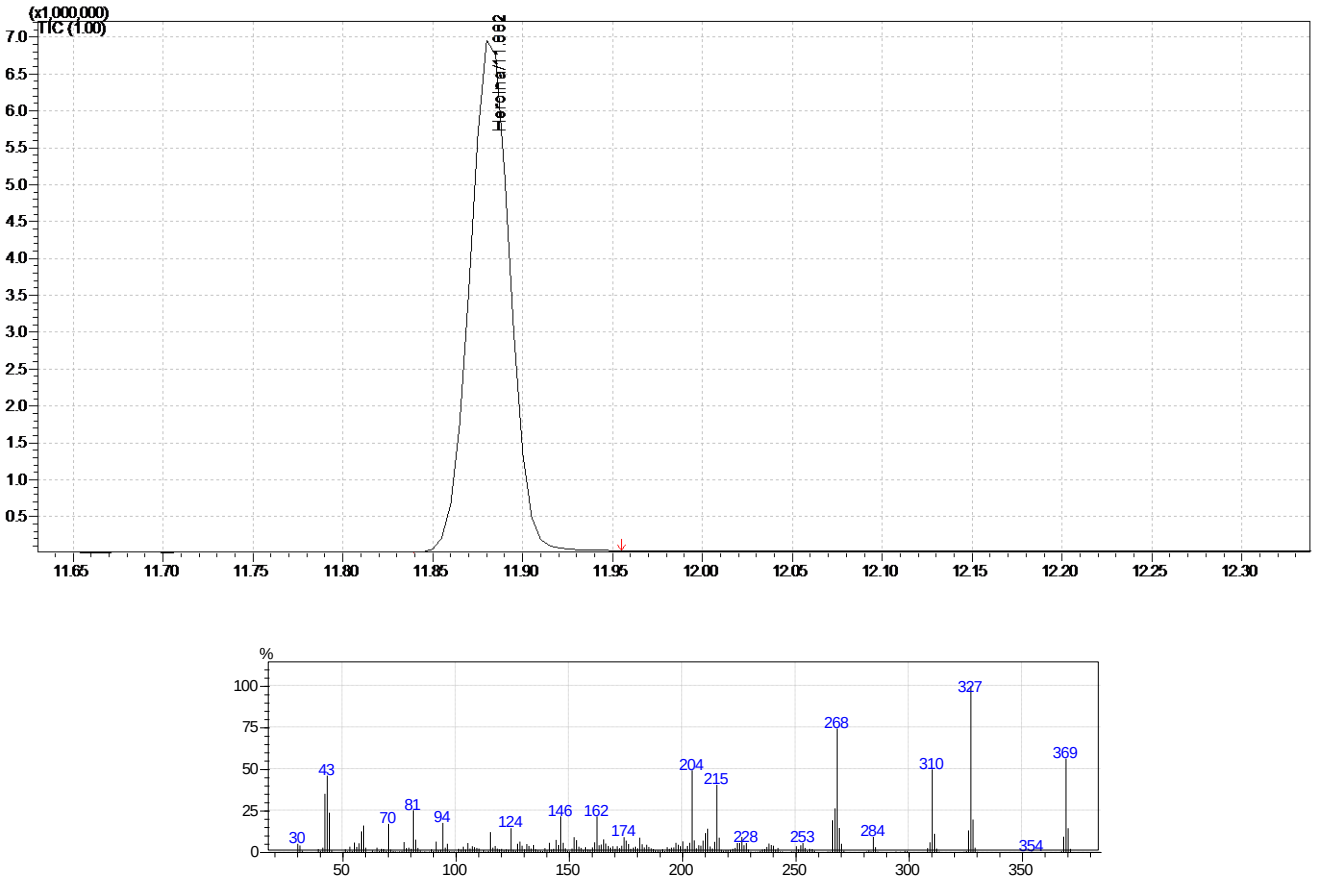


Figura 18. Cromatograma y espectro de masas de la heroína.

Fuente: Realizado por el Autor.

Los tiempos de retención y el espectro de masas identificados para la cocaína y heroína, fueron comparados con el estudio del análisis cualitativo de cocaína, heroína y morfina por cromatografía de gases acoplado al espectrómetro de masas del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, los cuales son de 7.572 minutos para la Cocaína y heroína 9.276 minutos, esta diferencia se debe a las condiciones cromatografías establecidas por la entidad, dichas condiciones como temperatura del inyector, temperatura del horno, y tasas de calentamiento; son condiciones que se diferencian en comparación con las condiciones trabajadas en el laboratorio de Química de la Fiscalía General de la Nación, seccional Norte de Santander [49].

Los espectros de masas de la cocaína y la heroína del presente estudió de validación, se compararon con otros estudios, tal como el del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses y el de Ramírez Rodríguez, A.F de la Universidad Tecnológica de Pereira [50]; donde los iones provenientes de la fragmentación de la moléculas son los mismo reportados por el espectrómetro de masas del cromatógrafo de gases de marca Shimadzu modelo QP2010 ULTRA, el cual fue utilizado para el desarrollo de esta validación. La espectroteca Willey undécima edición del cromatógrafo de gases determinó los fragmentos de las moléculas de las sustancias estudiadas que se visualizan en la tabla 19, dando como porcentaje de comparación mayor o igual al 90%.

Con los tiempos de retención de las sustancias se pudo observar una buena especificidad ya que cada analito presenta un tiempo de retención diferente; por lo tanto no hay interferencias, estableciendo así que las condiciones cromatograficas con las que se trabajó son correctas para la identificación de las sustancias de interés.

5.3.1.2 Selectividad y precisión

En el análisis de selectividad se preparó el 2017-09-27 una mezcla de las sustancias estudiadas y detalladas en el apartado de especificidad. Los tiempos de retención de cada sustancia analizada en la mezcla se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Tiempos de retención (min) de cada sustancia en la mezcla para la identificación de cocaína y heroína.

Sustancia	Tiempo de retención (min)
Acetaminofén	3,184
Fenacetina	3,269
Cafeína	4,156
Lidocaína	4,399
Aminopirina	4,723
Levamisol	5,239
Procaína	5,556
Cocaína	7,434
Tetracaína	7,813
Codeína	10,228
Morfina	10,685
Tebaína	11.267
Heroína	11,884
Papaverina	12,903
Hidroxicina	13,158
Diltiazem	13,551

Fuente: Realizado por el autor.

Los resultados obtenidos demostraron una buena separación de las sustancias en la mezcla (ver anexo 8), sin presentarse solapamientos; sin embargo, el pico de la tebaína no se muestra simétrico, por lo que se necesita una gran cantidad para obtener un pico significativo y reproducible con una espectroteca mayor al 90%, de este modo, se continua el análisis sin integrar este pico en la mezcla, debido a que no es prioridad su análisis ya que no hace parte de las sustancias normalmente encontradas dentro de las muestras analizadas en el periodo de 2016-2017.

Después de analizar la mezcla preparada con las sustancias de referencia y las caracterizadas se procedió a realizar el análisis por decuplicado en las condiciones especificadas del método. Las tablas 22 a la 25 sumarizan los resultados de las diez replicas de la mezcla, en donde se estudian los tiempos de retención, número de platos teóricos, simetria de los picos, y resolución de los quince compuestos (cocaína, heroína y adulterantes).

Como se observa en la tabla 22 hay reproducibilidad en los tiempos de retención, con una desviación estándar (s) menor a 0,02 minutos y representada por coeficientes de variación (CV) inferiores al 0,1 % para los diferentes compuestos estudiados. De la tabla 23 puede observarse que los picos cromatográficos son muy simétricos, hecho evidenciado por un factor de coleo (Tailing) para casi todos los compuestos muy cercano a 1,0 con excepción de la lidocaína con un valor de 0.874 promedio. En la mayoría de los compuestos estudiados no existe problema de solapamiento de señales cromatográficas lo que se manifiesta en los elevados valores de resolución (ver tabla 25); el acetaminofén y la fenacetina tiene un valor de resolución promedio de 2.032, lo que hace mas cercano sus picos, sin embargo no hay solapamiento. De todas las sustancias analizadas el diltiazem es la más afín con la fase estacionaria y el acetaminofén es la menos afín con la fase estacionaria.

Tabla 22. Tiempos de retención de las diez réplicas de la mezcla de cocaína, heroína y adulterantes.

tr (min)															
Réplica	**Acetaminofen**	**Fenacetina**	**Cafeina**	**Lidocaina**	**Aminopirina**	**Levamisol**	**Procaina**	**Cocaina**	**Tetracaina**	**Codeina**	**Morfina**	**Heroina**	**Papaverina**	**Hidroxicina**	**Diltiazem**
1	3,184	3,271	4,158	4,401	4,726	5,241	5,558	7,439	7,816	10,232	10,686	11,886	12,906	13,161	13,554
2	3,188	3,274	4,162	4,404	4,729	5,245	5,563	7,445	7,824	10,236	10,688	11,888	12,908	13,163	13,557
3	3,186	3,272	4,159	4,401	4,726	5,241	5,560	7,439	7,817	10,232	10,685	11,886	12,905	13,161	13,554
4	3,184	3,271	4,158	4,401	4,725	5,241	5,558	7,439	7,817	10,231	10,685	11,885	12,905	13,161	13,554
5	3,185	3,269	4,157	4,400	4,724	5,240	5,558	7,437	7,815	10,230	10,687	11,886	12,905	13,160	13,553
6	3,185	3,271	4,158	4,400	4,724	5,240	5,558	7,437	7,814	10,230	10,684	11,885	12,904	13,160	13,552
7	3,184	3,270	4,157	4,399	4,724	5,239	5,557	7,436	7,813	10,228	10,683	11,884	12,903	13,158	13,551
8	3,184	3,269	4,156	4,399	4,723	5,239	5,556	7,434	7,813	10,228	10,685	11,884	12,903	13,158	13,551
9	3,182	3,268	4,155	4,398	4,722	5,237	5,554	7,432	7,811	10,226	10,682	11,883	12,902	13,157	13,550
10	3,183	3,269	4,156	4,398	4,723	5,238	5,556	7,434	7,812	10,226	10,681	11,883	12,901	13,156	13,548
Promedio	**3,185**	**3,270**	**4,158**	**4,400**	**4,725**	**5,240**	**5,558**	**7,437**	**7,815**	**10,230**	**10,685**	**11,885**	**12,904**	**13,160**	**13,552**
Desviación estándar (S)	**0,002**	**0,022**	**0,002**	**0,002**	**0,002**	**0,002**	**0,002**	**0,004**	**0,004**	**0,003**	**0,002**	**0,002**	**0,002**	**0,002**	**0,003**
Coeficiente de variación (CV)	**0,052**	**0,054**	**0,047**	**0,041**	**0,043**	**0,042**	**0,044**	**0,049**	**0,047**	**0,030**	**0,020**	**0,013**	**0,016**	**0,017**	**0,019**

Fuente: Realizado por el autor.

Tabla 23. Simetría para las diez réplicas de la mezcla de cocaína, heroína y adulterantes.

Simetría-Tailing (T)															
Réplica	**Acetaminofen**	**Fenacetina**	**Cafeina**	**Lidocaina**	**Aminopirina**	**Levamisol**	**Procaina**	**Cocaina**	**Tetracaina**	**Codeina**	**Morfina**	**Heroina**	**Papaverina**	**Hidroxicina**	**Diltiazem**
1	1,043	1,096	1,019	0,930	1,226	1,105	1,011	1,008	1,033	0,944	0,977	1,021	1,160	1,438	1,101
2	1,052	1,057	1,006	0,883	1,085	1,050	1,010	0,995	0,997	0,939	0,972	1,003	1,126	1,308	1,057
3	1,031	1,031	1,014	0,881	1,075	1,056	0,994	1,002	1,006	0,931	0,979	1,023	1,110	1,273	1,074
4	1,034	1,011	1,008	0,873	1,066	1,029	1,018	1,010	0,997	0,947	0,978	0,018	1,085	1,275	1,063
5	1,001	1,008	0,992	0,866	1,061	1,023	1,018	1,005	1,001	0,942	0,971	1,001	1,074	1,271	1,034
6	1,019	1,015	1,001	0,867	1,059	1,023	0,998	0,997	1,009	0,936	0,966	0,999	1,056	1,263	1,051
7	1,035	1,012	0,989	0,859	1,041	1,029	0,998	0,977	1,003	0,939	0,995	0,988	1,057	1,288	1,064
8	0,984	1,022	0,979	0,856	1,032	1,017	0,990	0,986	0,998	0,940	0,962	0,979	1,066	1,277	1,053
9	0,998	1,018	0,988	0,860	1,041	1,017	1,010	1,020	1,006	0,936	0,994	0,997	1,063	1,294	1,051
10	0,996	1,025	0,990	0,867	1,053	1,031	0,990	0,990	0,989	0,935	0,997	1,001	1,065	1,365	1,065
Promedio	**1,019**	**1,030**	**0,999**	**0,874**	**1,074**	**1,038**	**1,004**	**0,999**	**1,004**	**0,939**	**0,979**	**0,903**	**1,086**	**1,305**	**1,061**
Desviación estándar (S)	**0,023**	**0,027**	**0,013**	**0,022**	**0,056**	**0,027**	**0,011**	**0,013**	**0,012**	**0,005**	**0,012**	**0,311**	**0,035**	**0,055**	**0,018**
Coeficiente de variación (CV)	**2,268**	**2,652**	**1,296**	**2,463**	**5,200**	**2,589**	**1,089**	**1,267**	**1,171**	**0,498**	**1,265**	**34,467**	**3,205**	**4,222**	**1,664**

Fuente: Realizado por el autor.

Tabla 24. Platos teóricos para las diez réplicas de la mezcla de cocaína, heroína y adulterantes.

Platos teóricos (N)															
Réplica	**Acetaminofen**	**Fenacetina**	**Cafeina**	**Lidocaina**	**Aminopirina**	**Levamisol**	**Procaina**	**Cocaina**	**Tetracaina**	**Codeina**	**Morfina**	**Heroina**	**Papaverina**	**Hidroxicina**	**Diltiazem**
1	85033	103327	159568	136703	181372	200951	217279	222746	218773	584553	741126	1189648	1241131	1193937	1215790
2	80668	102253	131363	189033	200299	200299	221852	234306	220668	541170	719082	1179297	1219028	1225803	1262316
3	81688	102971	162258	130442	196637	200964	229484	237214	240535	508708	773214	1187971	1225875	1270424	1281359
4	83915	106393	161736	132852	195309	203408	222239	237854	225856	513107	734248	1162106	1239423	1316249	1316875
5	76790	103873	158665	132957	196540	205328	214923	244720	232273	508995	692207	1177244	1215514	1350844	1233993
6	79022	102908	160415	132998	197852	203369	213685	251350	224888	527535	746825	1186263	1256120	1345789	1308661
7	79960	105148	160776	130324	196224	199587	218704	234213	220235	506276	729823	1201709	1190617	1293276	1295948
8	81396	107507	164322	130284	203947	204747	221043	242051	213464	491654	714591	1180095	1150229	1260654	1280791
9	83388	105910	164470	134887	196565	200952	219304	241910	220123	501129	724708	1175262	1213512	1307399	1312883
10	81655	108872	166794	124953	183974	203188	209062	226920	216700	471554	716507	1115270	1256984	1375712	1171169
Promedio	**81352**	**104916**	**159037**	**137543**	**194872**	**202279**	**218758**	**237328**	**223352**	**515468**	**729233**	**1175487**	**1220843**	**1294009**	**1267979**
Desviación estándar (S)	**2429**	**2214**	**10036**	**18368**	**6932**	**1975**	**5567**	**8397**	**7985**	**30655**	**21811**	**23580**	**32177**	**57345**	**47692**
Coeficiente de variación (CV)	**2,986**	**2,110**	**6,310**	**13,354**	**3,557**	**0,976**	**2,545**	**3,538**	**3,575**	**5,947**	**2,991**	**2,006**	**2,636**	**4,432**	**3,761**

Fuente: Realizado por el autor.

Tabla 25. Resolución de las diez réplicas de la mezcla de cocaína, heroína y adulterantes.

Resolución (R)														
Réplica	**Acetaminofen - Fenacetina**	**Fenacetina - Cafeina**	**Cafeina - Lidocaina**	**Lidocaina - Aminopirina**	**Aminopirina - Levamisol**	**Levamisol - Procaina**	**Procaina - Cocaína**	**Cocaina - Tetracaina**	**Tetracaina - Codeina**	**Codeina - Morfina**	**Morfina - Heroína**	**Heroina - Papaverina**	**Papaverina - Hidroxicina**	**Hidroxicina- Diltiazem**
1	2,064	21,607	5,460	7,073	11,334	6,744	34,057	5,823	40,245	8,823	26,131	22,738	5,414	8,099
2	2,021	21,574	5,396	7,072	11,449	6,782	34,690	5,929	39,563	8,551	25,920	22,578	5,429	8,235
3	2,032	21,662	5,404	7,118	11,557	6,861	35,052	6,077	39,974	8,561	25,351	22,648	5,508	8,334
4	2,075	21,840	5,432	7,153	11,579	6,796	34,865	5,988	39,370	8,514	25,704	22,603	5,561	8,466
5	1,985	21,607	5,395	7,167	11,623	6,769	34,862	6,070	39,625	8,425	25,418	22,549	5,552	8,383
6	2,007	21,602	5,420	7,163	11,623	6,739	35,080	6,031	39,624	8,622	25,708	22,791	5,604	8,482
7	2,020	21,745	5,394	7,119	11,528	6,753	34,584	5,891	39,033	8,489	25,314	22,538	5,461	8,383
8	2,021	21,997	5,414	7,184	11,728	6,807	34,963	5,921	38,448	8,409	25,354	22,221	5,390	8,319
9	2,047	21,936	5,468	7,180	11,579	6,746	34,904	5,972	38,945	8,466	25,631	22,524	5,506	8,437
10	2,045	22,144	5,368	6,947	11,409	6,707	33,928	5,848	38,204	8,295	25,756	22,429	5,626	8,294
Promedio	**2,032**	**21,771**	**5,415**	**7,118**	**11,541**	**6,770**	**34,699**	**5,955**	**39,303**	**8,516**	**25,629**	**22,562**	**5,505**	**8,343**
Desviación estándar (S)	**0,027**	**0,199**	**0,031**	**0,072**	**0,116**	**0,043**	**0,402**	**0,088**	**0,646**	**0,142**	**0,271**	**0,159**	**0,081**	**0,116**
Coeficiente de variación (CV)	**1,321**	**0,913**	**0,574**	**1,018**	**1,002**	**0,641**	**1,159**	**1,482**	**1,644**	**1,663**	**1,058**	**0,707**	**1,471**	**1,388**

Fuente: Realizado por el autor.

5.3.1.3 Límite de decisión CCα y capacidad de detección CCβ

En la determinación de los limites se analizaron soluciones de cocaína y heroína a diferentes niveles de concentración conocida, las cuales fueron preparadas en el 2017-10-11 y mediante la aplicación de la metodología de relación señal-ruido (S/R) se estimaron los límites de detección para estos dos compuestos.

En la identificación de CCα y CCβ de la cocaína, se prepararon seis soluciones de cocaína a 20,50,75,100,150 y 300 ppm y se analizaron diez veces (ver tabla 26), donde el criterio de aceptación según la guía de validación de la Fiscalía General de la Nación es tres veces la señal ruido, de este modo si se cumple el criterio se señala como respuesta si la cocaína es detectada o no, con el fin de establecer un porcentaje de las muestras detectadas, es decir porcentaje de resultados positivos contra concentraciones (ver figura 19) [38].

Tabla 26. Datos para la determinación del Límite de decisión CCα y capacidad de detección CCβ de la cocaína.

Concentración (mg/l)	300	150	100	75	50	20
Réplica	**Detectado (Si/No relación señal ruido > 3)**					
1	Si	Si	Si	Si	Si	No
2	Si	Si	Si	Si	Si	No
3	Si	Si	Si	Si	Si	No
4	Si	Si	Si	Si	Si	No
5	Si	Si	Si	Si	Si	No
6	Si	Si	Si	Si	Si	No
7	Si	Si	Si	Si	Si	No
8	Si	Si	Si	Si	Si	No
9	Si	Si	Si	Si	Si	No
10	Si	Si	Si	Si	Si	No
% Positivos	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**0**

Fuente: Realizado por el autor.

Los cromatogramas de la soluciones a diferentes concentraciones de la cocaína, se encuentran en el **ANEXO 9**.

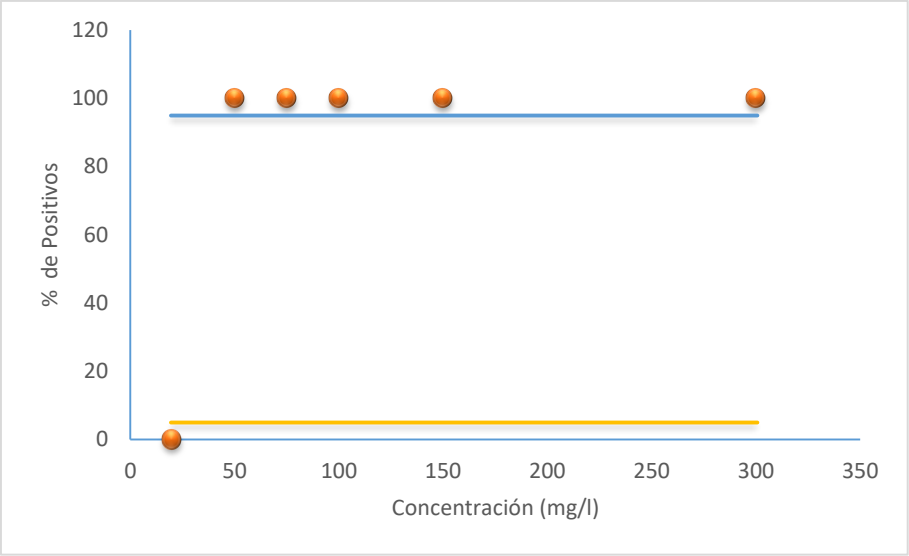


Figura 19. Curva característica para la determinación del Límite de decisión CCα y capacidad de detección CCβ de la cocaína.

Fuente: Realizado por el autor.

La figura 19 corresponde a la representación gráfica de los datos de la tabla 26, y de ella se puede estimar el límite de decisión (CCα) para la cocaína es de 21,5 mg/L y la capacidad de detección (CCβ) en 48,5 mg/L.

De la misma forma se hizo para la heroína, donde se prepararon nueve soluciones, las cuales fueron de 40, 80, 100, 150, 300, 600, 700, 750 y 800 ppm (ver tabla 27) y se construyó la curva de respuesta (ver figura 20).

Tabla 27. Datos para la determinación del Límite de decisión CCα y capacidad de detección CCβ de la heroína.

Concentración (mg/l)	800	750	700	600	300	150	100	80	40
Réplica	Detectado (Si/No relación señal ruido > 3)								
1	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
2	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
3	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
4	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
5	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
6	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
7	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
8	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
9	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
10	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
% Positivos	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**0**

Fuente: Realizado por el autor.

Los cromatogramas de la soluciones a diferentes concentraciones de la heroína, se encuentran en el **ANEXO 10**.

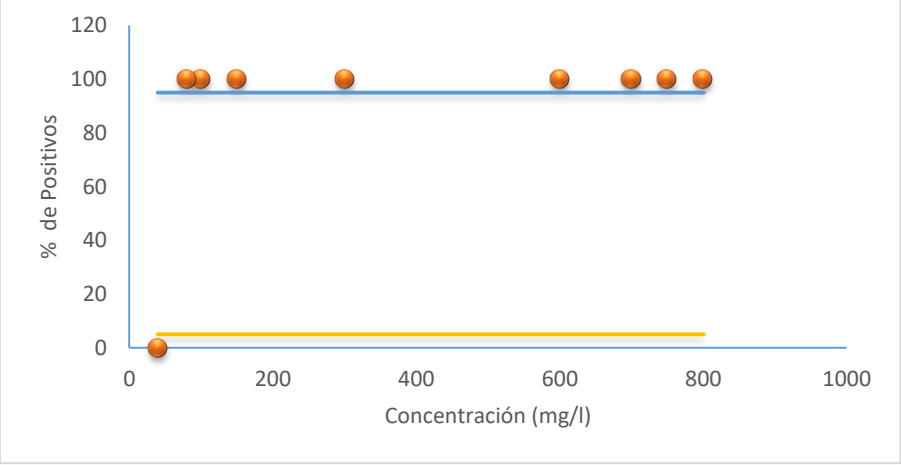


Figura 20. Curva característica para la determinación del Límite de decisión CCα y capacidad de detección CCβ de la heroína.

Fuente: Realizado por el autor.

La figura 20 corresponde a la representación gráfica de los datos de la tabla 27, y de ella se puede estimar el límite de decisión (CCα) para la heroína es de 42 mg/L y la capacidad de detección (CCβ) en 78 mg/L.

5.3.1.4 Límite de identificación

Para la búsqueda del límite de identificación, se analizaron las mismas soluciones de cocaína y heroína preparadas a diferentes concentraciones, las cuales se manejaron para la identificación de CCα y CCβ.

Las tablas 28 y 29 denotan los resultados de la búsqueda en la espectroteca considerando una identificación positiva si el match es igual o superior al 90%, de este modo, se reporta como límite de identificación la concentración mínima en la cuales la totalidad de las diez réplicas son identificadas.

Tabla 28. Datos para la determinación del límite de identificación de la cocaína.

Concentración (mg/l)	300	150	100	75	50	20
Réplica	**Identificado (Si/No Match spectroteca > 90)**					
1	Si	Si	Si	Si	No	No
2	Si	Si	Si	Si	No	No
3	Si	Si	Si	Si	No	No
4	Si	Si	Si	Si	Si	No
5	Si	Si	Si	Si	No	No
6	Si	Si	Si	Si	No	No
7	Si	Si	Si	No	No	No
8	Si	Si	Si	Si	No	No
9	Si	Si	Si	Si	Si	No
10	Si	Si	Si	Si	No	No
% Positivos	**100**	**100**	**100**	**90**	**20**	**0**

Fuente: Realizado por el autor.

Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz

Tabla 29. Datos para la determinación del límite de identificación de la heroína.

Concentración (mg/l)	800	750	700	600	300	150	100	80	40
Réplica	**Identificado (Si/No Match spectroteca > 90)**								
1	Si	No	Si	Si	No	No	No	No	No
2	Si	No	No	No	No	No	No	No	No
3	Si	No	Si	No	No	No	No	No	No
4	Si	No	No	No	No	No	No	No	No
5	Si	No	No	No	No	No	No	No	No
6	Si	No	No	No	Si	No	No	No	No
7	Si	Si	No	No	No	No	No	No	No
8	Si	No	Si	Si	No	No	No	No	No
9	Si	Si	Si	Si	No	No	No	No	No
10	Si	Si	No	Si	No	No	No	No	No
% Positivos	**100**	**30**	**40**	**40**	**10**	**0**	**0**	**0**	**0**

Fuente: Realizado por el autor.

Con los datos obtenidos para la determinación del límite de identificación, se pudo observar que la heroína tiene un alto límite de identificación (800 mg/L) en comparación con la cocaína (100 mg/L). El procedimiento para la preparación de soluciones de la muestras que presentan cocaína y heroína para la determinación cualitativa, según la guía de análisis de estupefacientes y sustancias controladas de la Fiscalía General de la Nación, denota que las muestras preparadas, están en un rango de concentración por encima del límite de identificación, por lo cual se demuestra más confiabilidad para que la muestra sea detectada según los criterios de aceptación de una similitud de espectroteca mayor o igual al 90%.

5.3.1.5 Robustez

Para determinar la robustez del método para cocaína y heroína, se empleó la metodología de Youden & Steiner para lo cual se realizaron variaciones en siete factores descritos en la tabla 30 y con base en ellos se ejecutaron ocho ensayos (ver tabla 31), donde cada ensayo se realizó por triplicado. Cada ensayo fue hecho a una nueva mezcla preparada, la cual contiene solo cuatro sustancias que son la cocaína, heroína, procaína y morfina, dichas sustancias, en su

análisis de selectividad denotaron los tiempos de retención más cercano a los analitos de interés.

Los resultados de los ensayos realizados por triplicado se encuentran más detallados en el **anexo 11**, de donde se toma solo el promedio para el desarrollo de las ecuaciones 6 a la 12 para determinar la influencia de cada variable empleada.

Tabla 30. Factores seleccionados y condiciones validada y alterna en el diseño experimental de robustez para la cocaína y heroína.

Factor	Nombre	Condición validada	Valor de la condición validada	Condición alterna	Valor de la condición alterna
1	Split	A	1:39	A	1:20
2	Flujo purga del inyector	B	2	b	4
3	Temperatura inyector	C	280	c	300
4	Temperatura Fuente	D	250	d	240
5	Temperatura Interfase	E	312	e	280
6	Volumen de inyección	F	0,2	f	0,5
7	Tiempo jeringa puerto	G	0,3	g	0,8

Fuente: Realizado por el autor.

Tabla 31. Combinaciones de los siete factores para el estudio de robustez para la cocaína y heroína.

	Ensayo							
Factor	1	2	3	4	5	6	7	8
1 (A/a)	1:39	1:39	1:39	1:39	1:20	1:20	1:20	1:20
2 (B/b)	2	2	4	4	2	2	4	4
3 (C/c)	280	300	280	300	280	300	280	300
4 (D/d)	250	250	240	240	240	240	250	250
5 (E/e)	312	280	312	280	280	312	280	312
6 (F/f)	0,2	0,5	0,5	0,2	0,2	0,5	0,5	0,2
7 (G/g)	0,3	0,8	0,8	0,3	0,8	0,3	0,3	0,8

Fuente: Realizado por el autor.

Los cromatogramas de los ensayos aplicados con sus respectivas variables se encuentran en el **anexo 12**.

Una vez ejecutados los experimentos se analizaron los resultados obtenidos de platos teóricos, simetría, resolución y tiempo de retención para la cocaína (ver tabla 33) y heroína (ver tabla 34), las cuales se compararon con los valores calculados en el estudio de selectividad (resumidos en la tabla 32).

Tabla 32. Variables de respuesta seleccionadas de la cocaína y heroína.

Variables respuesta	Desviación estándar *	
	Cocaína	Heroína
Platos teóricos	8397	23580
Simetría	0,013	0,311
Resolución	0,09	0,16
Tiempo de retención	0,004	0,002

* Desviaciones estándar tomadas del ensayo de selectividad (ver tablas 21 al 24).

Fuente: Realizado por el autor.

Tabla 33. Efectos estimados para el número de platos teóricos simetría, resolución y tiempo de retención para cocaína.

Factor		Platos teóricos		Simetría		Resolución		Tiempo de retención	
VA Split	A-a	**23.321**	**Afecta**	**0,043**	**Afecta**	**11,473**	**Afecta**	**-0,001**	**No Afecta**
VA Flujo purga del inyector	B-b	**8.236**	**No Afecta**	**0,003**	**No Afecta**	**0,454**	**Afecta**	**0,003**	**No Afecta**
VA Temperatura inyector	C-c	**1.062**	**No Afecta**	**0,006**	**No Afecta**	**0,034**	**No Afecta**	**0,005**	**No Afecta**
VA Temperatura Fuente	D-d	**5.803**	**No Afecta**	**0,004**	**No Afecta**	**0,362**	**Afecta**	**-0,004**	**No Afecta**
VA Temperatura Interfase	E-e	**3.400**	**No Afecta**	**0,002**	**No Afecta**	**0,101**	**No Afecta**	**0,004**	**No Afecta**
VA Volumen de inyección	F-f	**26.596**	**Afecta**	**0,057**	**Afecta**	**11,934**	**Afecta**	**-0,003**	**No Afecta**
VA Tiempo jeringa puerto	G-g	**1.365**	**No Afecta**	**-0,018**	**Afecta**	**-9,825**	**Afecta**	**0,005**	**No Afecta**
Estimador de Youden		11876		0,018		0,125		0,005	

Fuente: Realizado por el autor.

Tabla 34. Efectos estimados para el número de platos teóricos, simetría, resolución y tiempo de retención para heroína.

Factor		Platos teóricos		Simetría		Resolución		Tiempo de retención	
VA Split	A-a	**236.910**	**Afecta**	**0,052**	**No Afecta**	**2,414**	**Afecta**	**-0,006**	**Afecta**
VA Flujo purga del inyector	B-b	**-7.449**	**No Afecta**	**0,000**	**No Afecta**	**-0,295**	**Afecta**	**0,000**	**No Afecta**
VA Temperatura inyector	C-c	**21.683**	**No Afecta**	**0,007**	**No Afecta**	**0,124**	**No Afecta**	**0,001**	**No Afecta**
VA Temperatura Fuente	D-d	**23.974**	**No Afecta**	**-0,007**	**No Afecta**	**0,047**	**No Afecta**	**0,001**	**No Afecta**
VA Temperatura Interfase	E-e	**-3.430**	**No Afecta**	**0,004**	**No Afecta**	**-0,204**	**No Afecta**	**0,003**	**Afecta**
VA Volumen de inyección	F-f	**371.898**	**Afecta**	**0,065**	**No Afecta**	**3,798**	**Afecta**	**-0,008**	**Afecta**
VA Tiempo jeringa puerto	G-g	**-37.643**	**Afecta**	**-0,011**	**No Afecta**	**-1,067**	**Afecta**	**0,003**	**Afecta**
Estimador de Youden		33347		0,440		0,226		0,002	

Fuente: Realizado por el autor.

Con los resultados descritos en la tabla 33, se denotó que en el análisis de la cocaína, su tiempo de retención no se vio afectado por la variación de los siete factores establecidos; por otro lado, los platos teóricos, simetría y resolución no son afectados ante la variación de la temperatura del inyector y la temperatura de la interfase.

En el análisis de la robustez para la heroína observado en la tabla 34, se indica que la simetría de los picos no son afectados ante la variación de cualquiera de los siete factores establecidos; por otra parte la variación de la temperatura del inyector y de la fuente, no afecta los platos teóricos, resolución y tiempo de retención de la heroína.

5.3.1.6 Estabilidad

En el análisis de estabilidad, se toman los datos de la mezcla de materiales de referencia analizada por primera vez el 27 de agosto de 2017, posteriormente se toma la misma mezcla, la cual fue refrigerada para evitar descomposición o contaminación de la muestra; dicha muestra se analizó por decuplicado el 20 de noviembre del 2017. Seguidamente se compararon las áreas mediante una prueba t para la muestra analizada, obteniendo que las

los dos análisis de la mezcla son estadísticamente iguales con la sustancia de cocaína. Sin embargo, las áreas no fueron estadísticamente iguales para la heroína, por consiguiente las mezclas se consideran estables durante un período de dos meses con fines cualitativos, debido a que sus tiempos de retención e identificación en la espectroteca fueron similares, más no con fines cuantitativos por la varianza de las áreas. Los resultados se observan en las tabla 35.

Tabla 35. Comparación de áreas de las réplicas de dos soluciones de materiales de referencia preparados en diferentes fechas para la cocaína y heroína.

Réplica\Fecha preparación	**Cocaína**		**Heroína**	
	Área		**Área**	
	2017-11-20	**2017-09-27**	**2017-11-20**	**2017-09-27**
1	4882283	5286750	8445737	14440427
2	5667050	6007382	9075486	15203394
3	5990869	6218816	9223872	15548664
4	6035776	5625927	9314770	14927779
5	6058067	6501816	9502136	15291316
6	5977539	5852991	9494525	15818236
7	6148909	5984621	9343975	15883930
8	6181010	5881342	9814278	14053875
9	6279558	5830585	9714063	15833971
10	6264704	6239241	9705523	16118302
Desviación estándar	**413938**	**339563**	**398184**	**672006**
Coeficiente de variación	**6,959**	**5,714**	**4,253**	**4,389**
Media	5948577	5942947	9363437	15311989
Varianza	171344688308	115302850053	158550578984	451592464256
Observaciones	10	10	10	10
Grados de libertad	9	9	9	9
Prueba t para dos muestras				
Diferencia hipotética de las medias	**0**	$Ho: \bar{X}_{Mx\ MR\ Reciente} - \bar{X}_{Mx\ MR\ antigua} = 0$		
Alfa	0,05			
Varianza agrupada	143323769180		305071521620	
Varianza insesgada	169307		247011	
Grados de libertad	18		18	
Estadístico t	0,033		-24,082	
P(T<=t) una cola	4,9E-01		1,0E+00	

Réplica\Fecha preparación	Cocaína		Heroína	
	Área		Área	
	2017-11-20	2017-09-27	2017-11-20	2017-09-27
Valor crítico de t (una cola)	1,734		1,734	
P(T<=t) dos colas	9,7E-01		3,8E-15	
Valor crítico de t (dos colas)	2,101		2,101	
	Las medias de las dos soluciones son estadísticamente iguales		**Las medias de las dos soluciones No son estadísticamente iguales**	

Fuente: Realizado por el autor.

La diferencia significativa de las áreas de la heroína analizada dos meses después de haber sido preparada, se atribuye a la aparición del pico de 6-monoacetilmorfina (ver anexo 13). El cromatograma indica que en el tiempo de retención de 11,2 minutos aparece esta nueva sustancia, demostrando así la disminución de las áreas. El factor que puede influir en la conversión de la heroína a 6-monoacetilmorfina, es la temperatura del puerto de inyección, ya que a temperaturas altas la heroína se ve afectada.

5.3.2 Cannabis Sativa

5.3.2.1 Selectividad y precisión

Para el desarrollo del análisis de selectividad se preparó el 25 de octubre del 2017, una mezcla de sustancias tales como: CBN, CBD y Δ9-THC. Se tomaron estos compuestos para la preparación de la mezcla debido a la información aportada por las muestras previamente realizadas en el laboratorio. Los tiempos de retención de cada sustancia analizada en la mezcla se muestran en la tabla 36.

Tabla 36. Tiempos de retención (min) de cada sustancia en la mezcla para la identificación de *Cannabis Sativa*.

Sustancia	Tiempo de retención (min)	Iones principales (m/z)
Cannabidiol	4,969	231,121,246,314
Δ9- tetrahidrocannabinol	5,720	231,299,43,314
Cannabinol	6,321	295,238,223,310

Fuente: Realizado por el autor

Los resultados obtenidos demostraron una buena separación de las sustancias en la mezcla (ver figura 21), sin presentarse solapamientos entre los picos de las sustancias estudiadas. Los espectros de masas del CBN, CBD y Δ9-THC del presente estudió de validación, se compararon con la literatura impartida del II Curso de actualización de PPH de la UNOCD [35]; donde los iones provenientes de la fragmentación de la moléculas de un espectrómetro de masas acoplado a un cromatógrafo de gases de marca Shimadzu modelo QP 5000, fueron similares con los iones reportados por el cromatógrafo de gases usado para el presente estudio con la espectroteca Willey undécima edición (ver figura 22).

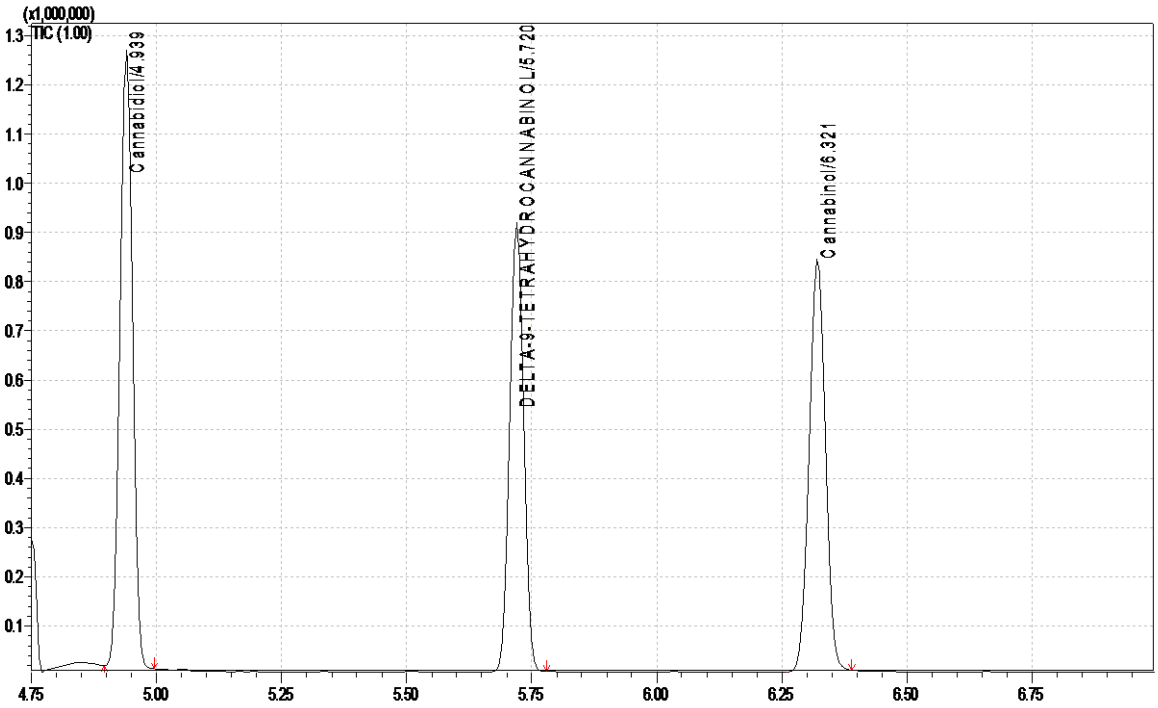
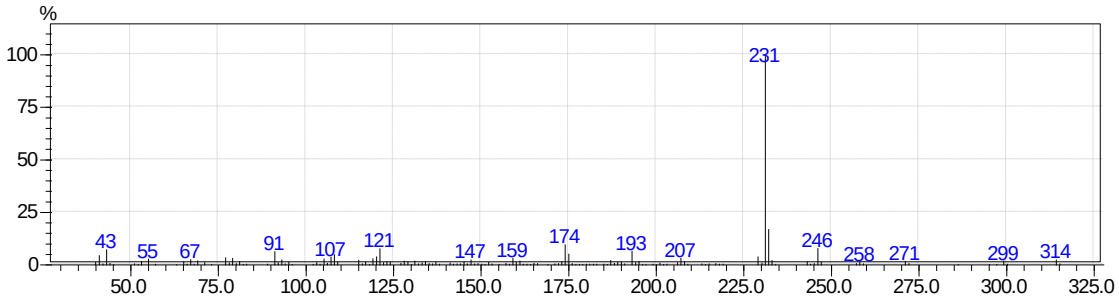
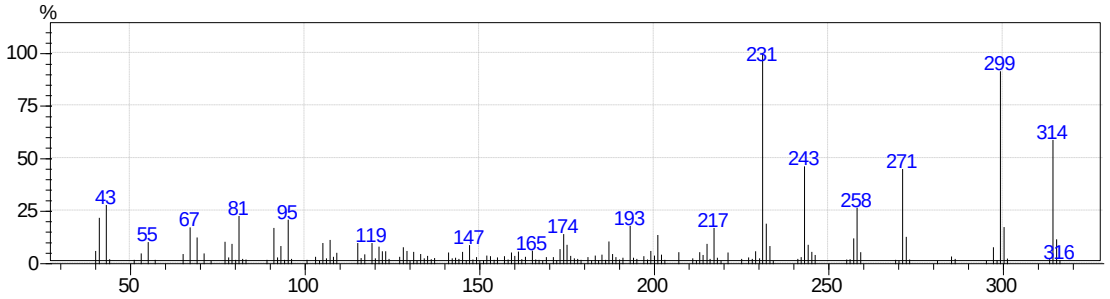


Figura 21. Cromatograma de la mezcla de los principales compuestos del *Cannabis Sativa*.

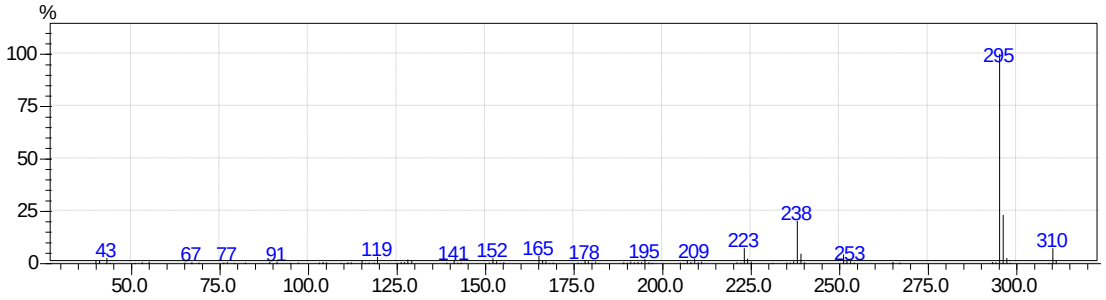
Fuente: Realizado por el Autor.



a)



b)



c)

Figura 22. Espectro de masas de a) CBD b) Δ9-THC y c) CBN.

Fuente: Realizado por el Autor.

Una vez visualizado una buena corrida de la mezcla de cannabis por el cromatógrafo, se procedió a analizar la mezcla preparada por decuplicado en las condiciones especificadas del método. Las tablas 37 a la 40 sumarizan los resultados de las diez replicas de la mezcla, en donde se estudian los tiempos de retención, número de platos teóricos, simetria de los picos, y resolución de los tres compuestos analizados para este metodo (CBN,CBD y Δ9-THC).

Tabla 37. Tiempos de retención de las diez réplicas de la mezcla de *Cannabis Sativa*.

tr (min)			
Réplica	**CBD**	**Δ9-THC**	**CBN**
1	4,939	5,720	6,322
2	4,939	5,720	6,321
3	4,940	5,721	6,322
4	4,939	5,721	6,322
5	4,939	5,721	6,321
6	4,939	5,721	6,323
7	4,938	5,720	6,32
8	4,940	5,720	6,322
9	4,939	5,719	6,321
10	4,937	5,717	6,319
Promedio	**4,939**	**5,720**	**6,321**
Desviación estándar	**0,0009**	**0,0012**	**0,0012**
Coeficiente de variación	**0,02**	**0,02**	**0,02**

Fuente: Realizado por el Autor.

Tabla 38. Simetría de las diez réplicas de la mezcla de *Cannabis Sativa*.

Tailing (T)			
Réplica	**CBD**	**Δ9-THC**	**CBN**
1	1,007	1,009	1,010
2	1,011	1,019	1,011
3	1,016	1,035	1,016
4	1,028	1,012	1,010
5	1,026	1,006	1,035
6	1,014	0,998	0,993
7	1,036	0,990	1,020
8	1,017	1,015	1,018
9	1,025	1,017	1,013
10	1,021	1,021	1,010
Promedio	**1,020**	**1,012**	**1,014**
Desviación estándar	**0,009**	**0,013**	**0,011**
Coeficiente de variación	**0,860**	**1,240**	**1,037**

Fuente: Realizado por el Autor.

Tabla 39. Platos teóricos de las diez réplicas de la mezcla de *Cannabis Sativa*.

Platos teóricos(N)			
Réplica	**CBD**	**Δ9-THC**	**CBN**
1	177848	183246	191907
2	173831	190238	177646
3	175342	189474	176681
4	174840	186437	181799
5	174468	186072	181896
6	165047	192179	186799
7	173553	192100	184138
8	180286	194024	185163
9	166930	192056	183294
10	173655	181725	194043
Promedio	**173580**	**188755**	**184337**
Desviación estándar	**4543**	**4172**	**5529**
Coeficiente de variación	**2,617**	**2,210**	**3,000**

Fuente: Realizado por el Autor.

Tabla 40. Resolución de las diez réplicas de la mezcla de *Cannabis Sativa*.

Resolución		
Réplica	**CBD- Δ9THC**	**Δ9THC - CBN**
1	15,609	10,859
2	15,680	10,724
3	15,696	10,694
4	15,641	10,744
5	15,620	10,708
6	15,546	10,900
7	15,736	10,834
8	15,893	10,906
9	15,569	10,845
10	15,492	10,879
Promedio	**15,648**	**10,809**
Desviación estándar	**0,113**	**0,083**
Coeficiente de variación	**0,721**	**0,767**

Fuente: Realizado por el Autor.

Como se observa en la tabla 36 hay reproducibilidad en los tiempos de retención, con una desviación estándar (s) menor a 0,01 minutos y representada por coeficientes de variación (CV) inferiores al 0,1 % para los diferentes compuestos estudiados. De la tabla 37 puede observarse que los picos cromatográficos son muy simétricos, hecho evidenciado por un factor de coleo (Tailing) para casi todos los compuestos muy cercano a 1. En los compuestos estudiados no existe problema de solapamiento de señales cromatográficas lo que se manifiesta en los elevados valores de resolución (ver tabla 38). El número de platos teóricos (N) es concordante con lo esperado para la columna capilar de 0,250 mm de diámetro interno utilizado. De las sustancias analizadas, el CBN es la más afín con la fase estacionaria y el CBN es la menos afín con la fase estacionaria, lo cual se obsrvó en los tiempos de retención de la figura 21.

5.3.2.2 Límite de decisión CCα y capacidad de detección CCβ

En la determinación de los limites se analizaron soluciones de Δ9-THC del *Cannabis Sativa* a diferentes niveles de concentración conocida, debido a que es uno de los componenentes mas activos. Estas soluciones fueron preparadas el 24 de Octubre del 2017 y mediante la aplicación de la metodología de relación señal-ruido (S/R) se estimaron los límites de detección.

En la identificación de CCα y CCβ del Δ9-THC, se prepararon seis soluciones de cocaína a 10, 20,40, 50, 60,100 y 300 ppm, las cuales se analizaron diez veces (ver tabla 41). El criterio de aceptación para la determinación de los limites según la guía de validación de la Fiscalía General de la Nación es tres veces la señal ruido, de este modo si se cumple el criterio se señala como respuesta que el Δ9-THC si fue detectado, con el fin de establecer un porcentaje de las muestras detectadas, es decir porcentaje de resultados positivos contra concentraciones (ver figura 23) [38].

Tabla 41. Datos para la determinación del Límite de decisión CCα y capacidad de detección CCβ del Δ9-THC.

Concentración (mg/l)	300	100	60	50	40	20	10
Réplica	**Detectado (Si/No relación señal ruido > 3)**						
1	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
2	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
3	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
4	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
5	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
6	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
7	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
8	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
9	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
10	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
% Positivos	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**0**

Fuente: Realizado por el autor.

Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz

Los cromatogramas de la soluciones a diferentes concentraciones del Δ9-THC, se encuentran en el **ANEXO 14**.

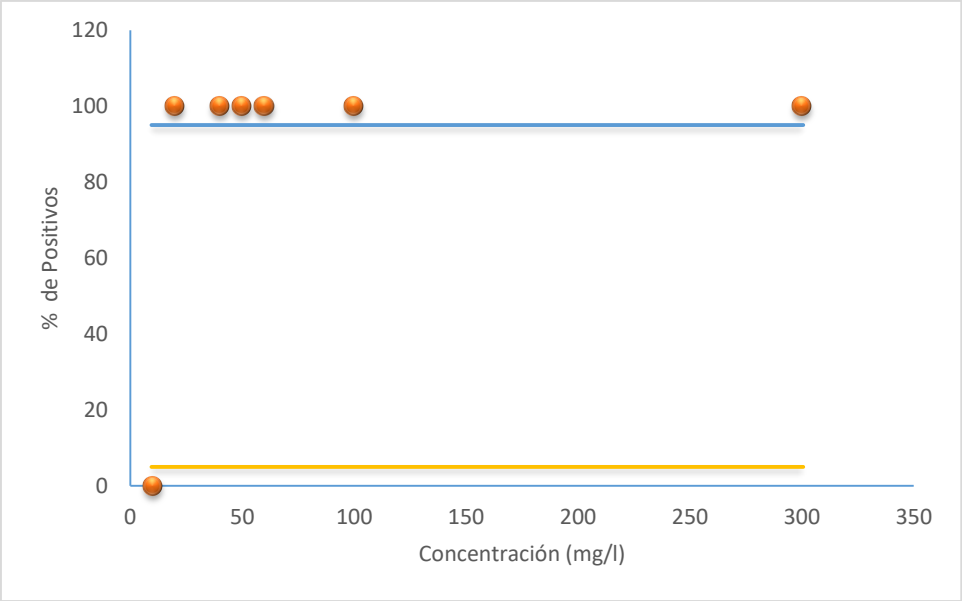


Figura 23. Curva característica para la determinación del Límite de decisión CCα y capacidad de detección CCβ del Δ9-THC.

Fuente: Realizado por el autor.

La figura 23 corresponde a la representación gráfica de los datos de la tabla 41, y de ella se puede estimar el límite de decisión CCα para la cocaína es de 10,5 mg/l y la capacidad de detección CCβ en 19,5 mg/l.

5.3.2.3 Límite de identificación

Para la búsqueda del límite de identificación, se analizaron las mismas soluciones del Δ9-THC preparadas a diferentes concentraciones, las cuales se manejaron para la identificación de CCα y CCβ.

La tabla 42 denota los resultados de la búsqueda en la espectroteca del espectrómetro de masas, considerando una identificación positiva si el match es igual o superior al 90 %, de

este modo, se encontró que las concentraciones mínimas a las cuales el total de las diez réplicas fueron identificadas fue de 100 mg/l para Δ9-THC.

Tabla 42. Datos para la determinación del límite de identificación de la Δ9-THC.

Concentración (mg/l)	300	100	60	50	40	20	10
Réplica	**Identificado (Si/No Match espectroteca ≥ 90)**						
1	Si	Si	No	No	No	No	No
2	Si	Si	No	No	No	No	No
3	Si	Si	No	No	No	No	No
4	Si	Si	No	No	No	No	No
5	Si	Si	No	No	No	No	No
6	Si	Si	No	No	No	No	No
7	Si	Si	No	No	No	No	No
8	Si	Si	No	No	No	No	No
9	Si	Si	No	No	No	No	No
10	Si	Si	No	No	No	No	No
% Positivos	**100**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**

Fuente: Realizado por el autor.

El procedimiento para la preparación de soluciones de la muestra que presenta Δ9-THC para la determinación cualitativa, según la guía de análisis de estupefacientes y sustancias controladas de la Fiscalía General de la Nación, denota que las muestras preparadas, están en un rango de concentración por encima del límite de identificación, por lo cual se demuestra más confiabilidad para que la muestra sea detectada según los criterios de aceptación de una similitud de espectroteca mayor o igual al 90%.

5.3.2.4 Robustez

Para determinar la robustez del método para el Δ9-THC, se empleó la metodología de Youden & Steiner para lo cual se realizaron variaciones en siete factores descritos en la tabla 43 y con base en ellos se ejecutaron ocho ensayos (ver tabla 44), donde cada experimento se realizó por triplicado.

Cada ensayo fue realizado a una mezcla preparada, la cual contiene los tres compuestos principales del *Cannabis Sativa* que se han venido estudiando en el desarrollo de la validación (CBD, Δ9-THC y CBN).

Los resultados de los ensayos realizados por triplicado se encuentran más detallados en el **anexo 15**, de donde se toma solo el promedio para el desarrollo de las ecuaciones 6 a la 12 para determinar la influencia de cada variable empleada.

Tabla 43. Factores seleccionados y condiciones validada y alterna en el diseño experimental de robustez del *Cannabis Sativa*

Factor	Nombre	Condición validada	Valor de la condición validada	Condición alterna	Valor de la condición alterna
1	Split	A	1:40	A	1:20
2	Flujo purga del inyector	B	2	b	4
3	Temperatura inyector	C	280	c	300
4	Temperatura Fuente	D	295	d	240
5	Temperatura Interfase	E	290	e	280
6	Volumen de inyeccion	F	0,2	f	0,4
7	Tiempo jeringa puerto	G	0,3	g	0,8

Fuente: Realizado por el autor.

Tabla 44. Combinaciones de los siete factores para el estudio de robustez del *Cannabis Sativa*.

	Ensayo							
Factor	1	2	3	4	5	6	7	8
1 (A/a)	1:40	1:40	1:40	1:40	1:20	1:20	1:20	1:20
2 (B/b)	2	2	4	4	2	2	4	4
3 (C/c)	280	300	280	300	280	300	280	300
4 (D/d)	295	295	240	240	240	240	295	295
5 (E/e)	290	280	290	280	280	290	280	290
6 (F/f)	0,2	0,4	0,4	0,2	0,2	0,4	0,4	0,2
7 (G/g)	0,3	0,8	0,8	0,3	0,8	0,3	0,3	0,8

Fuente: Realizado por el autor.

Los cromatogramas de los ensayos aplicados con sus respectivas variables se encuentran en el **anexo 16**.

Una vez ejecutados los experimentos se analizaron los resultados obtenidos de platos teóricos, simetría, resolución y tiempo de retención para el compuesto activo el Δ9-THC (ver tabla 46), las cuales se compararon con los valores calculados en el estudio de selectividad (resumidos en la tabla 45).

Tabla 45. Variables de respuesta seleccionadas del Δ9-THC.

Variables respuesta	Desviación estándar del Δ9-THC
Platos teóricos	4172
Simetría	0,013
Resolución	0,11
Tiempo de retención	0,001

* Desviaciones estándar tomadas del ensayo de selectividad (ver tablas 36 al 39).

Fuente: Realizado por el autor.

Tabla 46. Efectos estimados para el número de platos teóricos simetría, resolución y tiempo de retención para el Δ9-THC.

Factor		Platos teóricos		Simetría		Resolución		Tiempo de retención	
VA Split	A-a	**19,527**	**Afecta**	**0,010**	**No Afecta**	**0,737**	**Afecta**	**0,00267**	**Afecta**
VA Flujo purga del inyector	B-b	**1,238**	**No Afecta**	**0,004**	**No Afecta**	**-0,065**	**Afecta**	**0,00150**	**No Afecta**
VA Temperatura inyector	C-c	**266**	**No Afecta**	**0,007**	**No Afecta**	**-0,081**	**No Afecta**	**0,00183**	**Afecta**
VA Temperatura Fuente	D-d	**-1,760**	**No Afecta**	**-0,036**	**Afecta**	**-0,007**	**Afecta**	**-0,00283**	**Afecta**
VA Temperatura Interfase	E-e	**-1,096**	**No Afecta**	**0,001**	**No Afecta**	**0,048**	**No Afecta**	**-0,00217**	**Afecta**
VA Volumen de inyección	F-f	**13,019**	**Afecta**	**0,002**	**No Afecta**	**0,573**	**Afecta**	**-0,00533**	**Afecta**
VA Tiempo jeringa puerto	G-g	**4,117**	**No Afecta**	**-0,004**	**No Afecta**	**-0,002**	**Afecta**	**-0,00200**	**Afecta**
Estimador de Youden		5900		0,018		0,159		0,00176	

Fuente: Realizado por el autor.

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA COLOMBIA

Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz

Con los resultados descritos en la tabla 46, se denotó que en el análisis del Δ9-THC, su tiempo de retención no se vio afectado por flujo de purga del inyector, mientas que los demás factores si afectaron el tiempo de retención. Por otro lado, los platos teóricos fueron afectados por los factores de relación de Split y el volumen de inyección. La simetría de los picos es afectada solamente por el cambio en la temperatura de la fuente y la resolución no es afectada ante la variación de la temperatura del inyector y la temperatura de la interfase.

5.3.2.5 Estabilidad

Se pasó por decuplicado la mezcla de materiales de referencia el 27 de noviembre del 2017, dicha muestra fue preparada el 25 de octubre del 2017 para el análisis de precisión. Con los datos obtenidos se compararon las áreas del Δ9-THC mediante una prueba t, obteniéndose que los dos análisis de la mezcla no presentaban variaciones y por tanto para la fecha de análisis (2017-10-25) se puede concluir que la mezcla de materiales de referencia es estable durante un período de un mes. Este análisis se hace con el fin de observar la estabilidad de la muestra, sin embargo debido a la falta de tiempo del desarrollo del análisis, se recomienda continuar con la realización de la prueba en tres meses más adelante para certificar la estabilidad de la mezcla en un tiempo más largo. Los resultados se observan en la tabla 47.

Tabla 47. Comparación de áreas de las réplicas de dos soluciones de materiales de referencia preparados en diferentes fechas para el Δ9-THC.

Réplica\Fecha preparación	Δ9-THC	
	Área	
	2017-11-27	2017-10-25
1	1586278	1804216
2	1777756	1808717
3	1685800	1836914
4	1736707	1825912
5	1750453	1771483
6	1800390	1760880
7	1851218	1806548
8	1789270	1806176
9	1968014	1786884
10	1943370	1796299
Desviación estándar	**113515**	**22941**
Coeficiente de variación	**6,345**	**1,274**
Media	1788926	1800403
Varianza	12885582683	526283603
Observaciones	10	10
Grados de libertad	9	9
Diferencia hipotética de las medias	**0**	*
Alfa	0,05	
Varianza agrupada	6705933142,9	
Varianza insesgada	36622,215	
Grados de libertad	18	
Estadístico t	-0,313	
P(T<=t) una cola	6,2E-01	
Valor crítico de t (una cola)	1,734	
P(T<=t) dos colas	7,6E-01	
Valor crítico de t (dos colas)	2,101	
	Las medias de las dos soluciones son estadísticamente iguales	

$* \; Ho: \; \bar{X}_{\textbf{Mx MR Reciente}} - \bar{\mathbf{X}}_{\textbf{Mx MR antigua}} = 0$

Formando líderes para la *construcción* de un nuevo *país en paz*

6. CONCLUSIONES

- En el desarrollo de las pruebas preliminares de identificación homologada, se determinó que el ensayo de Tanred es una prueba con alta sensibilidad para la identificación de alcaloides, con un límite de identificación del 10% para la cocaína; la cual en presencia de adulterantes como el acetaminofén proporcionó un falso negativo en su identificación.

- El ensayo de Scott es una prueba sensible para la identificación preliminar de cocaína, con un límite de detección del 10 %. Sin embargo los adulterantes tales como: la fenacetina, aminopirina, lidocaína y cafeína afectan el resultado del ensayo Scott dando un falso negativo a la concentración de límite de detección de la cocaína.

- En la identificación preliminar de la heroína, se obtuvieron como pruebas selectivas, los ensayos de Marquis y HNO3 para la identificación de opiáceos. La fenacetina, aminopirina, cafeína y acetaminofén proporcionan en mezcla con la heroína a su concentración de límite de detección del 10%, un falso negativo en el ensayo Marquis y adicionalmente a estas sustancias la lidocaína da un falso negativo en el ensayo de HNO_3.

- Se identificó para el *Cannabis Sativa* que el ensayo de Duquenois es una prueba preliminar, muy sensible para la identificación de su principal compuesto activo el Δ9-TCH.

- En la validación del método no normalizado de la identificación de la cocaína, heroína y el *Cannabis Sativa* del laboratorio de química de la presente entidad, se observó que los parámetros establecidos por el laboratorio, indica una buena resolución y simetría de los picos de las sustancias estudiadas y posibles adulterantes, evitando solapamientos entre ellos, lo que indica un buen análisis y desarrollo del método establecido.

- La precision realizada para la identificacion de la cocaína y heroína reportó que los tiempos de retención tienen una desviación estándar menor a 0,02 minutos y coeficientes de variación inferiores al 0,1 %, en cuanto el analisis del *Cannabis Sativa* tienen una una desviación estándar menor a 0,01 minutos y los coeficientes de variación son inferiores al 0,1 %, lo que determina que los metodos son reproducibles en sus tiempos de retención.

- Se determinó para la cocaína que el límite de decisión (CCα) es de 21,5 mg/L y capacidad de detección (CCβ) es de 48,5 mg/L, para la heroína el CCα es de 42 mg/L y el CCβ es de 78 mg/L y para el Δ9-THC del *Cannabis Sativa* el CCα es de 10,5 mg/L y el CCβ es de 19,5 mg/L, estableciendo de este modo los rangos de falta de fiabilidad del método, dado que se pueden presentar resultados falsos.

- Se estableció como límite de identificación para la cocaína una concentración de 100 mg/L, para la heroína 800 mg/L y para el Δ9-THC 100 mg/L según el método validado con las condiciones previamente establecidas.

- El ensayo de robustez indicó que para la cocaína los platos teóricos son afectados al variar los factores de split y el volumen de inyección de la muestra, de igual forma la simetría del pico de cocaína es afectada por los mismos factores que afectan a los platos teóricos y el tiempo de jeringa en el puerto, la resolución de la cocaína es afectada por el split, flujo de purga del inyector, temperatura de la fuente, volumen de inyección y el tiempo de jeringa en el puerto; mientras que el tiempo de inyección no se vio afectado por la variación de los siete factores trabajados.

- Se observó que en el ensayo de robustez para la heroína, los platos teóricos son afectados al variar los factores de split, volumen de inyección y el tiempo de jeringa del puerto, de igual forma la resolución del pico de heroína es afectada por los mismos factores que afectan a los platos teóricos y el flujo de purga del inyector, el tiempo de retención de la heroína también es afectado por mismos factores que inciden sobre los platos teóricos, adicionando que la temperatura de la interfase también es un factor que afecta este parámetro cromatografico; mientras que la simetría del pico de heroína no se vio afectado por la variación de cualquier factor trabajado.

- En la aplicación del ensayo de robustez para el Δ9-THC se concluyó que los platos teóricos fueron afectados por el split y el volumen de inyección de la muestras, la simetría del pico fue afectada por la temperatura de la fuente, la resolución del pico del Δ9-THC fue afectado por la variación de todos los factores exceptuando la temperatura del inyector y de la interfase y el tiempo de retención solo no fue afectado al variar el flujo de purga del inyector.

- Se estableció que al preparar una mezcla de cocaína, heroína y adulterantes, esta permanece estable durante dos meses, es decir no presenta varianza en los datos analizados y alteraciones que interfieren en su análisis cualitativo.

- En el desarrollo de la prueba t a la mezcla de Δ9-THC, CBN y CBD se determinó que la mezcla hasta un mes después de ser preparada permanece estable, es decir, los factores como el tiempo de retención y área son similares después de ser analizados en tiempos diferentes.

7. RECOMENDACIONES

- Debido a que las pruebas preliminares son selectivas pero no específicas y que se presentaron sustancias que establecen efecto matriz con los analitos de interés, se recomienda cumplir detalladamente con el método de análisis impartido por la Fiscalía General de la Nación de corroborar el resultado con la aplicación del análisis instrumental para obtener confiabilidad en los datos obtenidos.

- Se aconseja que si se desea cambiar un parámetro del cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas del laboratorio de química de la Fiscalía General de la Nación, seccional Norte de Santander, se remita a la lectura de este documento para visualizar los factores que afecta los parámetros cromatógraficos del analito de interés.

- Se recomienda hacer un análisis exhaustivo de las mezclas manejadas en el presente trabajo por más tiempo, con el objeto de determinar la estabilidad de las sustancias con un rango de tiempo más amplio y así evitar costos posteriores en la preparación de patrones utilizados para el análisis de muestras.

8. NOMENCLATURA

CCα	Límite de decisión
CCβ	Capacidad de detección
CBD	Cannabidiol
CBN	Cannabinol
CV	Coeficiente de variación
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
GC	Cromatografía de gases
MS	Espectrómetro de masas
N	Platos teóricos
R	Resolución
S	Desviación estándar
S/R	Señal ruido
T	*Tailing* (Simetría)
tr	Tiempo de retención
THC	Tetrahidrocannabinol
UNODC	Oficina contra la Droga y el Crimen de la Organización de las Naciones Unidas
VN	Verdaderos negativos
VP	Verdaderos positivos

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cáceres, D., et al., *Consumo de drogas en jóvenes universitarios y su relación de riesgo y protección con los factores psicosociales.* Universitas Psychologica, 2006. **5**(3).
2. Cadena Afanador, W. and C.A. Devia Garzón, *La lucha contra las drogas en América Latina y las iniciativas generadas desde la UNASUR y la OEA.* Revista Científica General José María Córdova, 2013. **11**(12): p. 39-59.
3. ANMM, B.d.I.C.y.T.d.l., *El consumo del cannabis y sus repercusiones.* Facultad de Medicina de la UNAM 2017. **60**(1): p. 38-41.
4. Arévalo Navarro, A.A., et al., *Causas y consecuencias del consumo de sustancias psicoactivas en adolescentes con ambientes de vulnerabilidad familiar y contextos sociales conflictivos.* 2015.
5. GANTIVA, C., et al., *Actitudes hacia el consumo de cocaína y marihuana en estudiantes universitarios.* Psychologia. Avances de la disciplina, 2007. **1**(2).
6. Bewley-Taylor, D. and M. Jelsma, *Regime change: re-visiting the 1961 Single Convention on Narcotic Drugs.* International Journal of Drug Policy, 2012. **23**(1): p. 72-81.
7. Hallam, C., D. Bewley-Taylor, and M. Jelsma, *transnational institute.* 2014.
8. Beltran Morillo, N.J., *Locus de control en consumidores de marihuana. Chimbote, 2015.* 2016.
9. Russo, E.B., *Cannabis and cannabinoids: pharmacology, toxicology, and therapeutic potential*. 2013: Routledge.
10. Grotenhermen, F., *Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide.* Cannabinoids, 2006. **1**(1): p. 10-14.
11. FLORIAN, N.M., F. PARADA, and W.F. GARZÓN, *Estudio del contenido de canabinoides en muestras de marihuana (Cannabis Sativa L.) cultivadas en varias regiones de Colombia.* Vitae, 2009. **16**(2).
12. Béguerie, S., I. García, and C. IACM, *Estudio comparativo para la cuantificación de THC, CBD y CBN.*
13. Galand, N., et al., *Separation and identification of cannabis components by different planar chromatography techniques (TLC, AMD, OPLC).* Journal of chromatographic science, 2004. **42**(3): p. 130-134.
14. Milman, G., et al., *Simultaneous quantification of cannabinoids and metabolites in oral fluid by two-dimensional gas chromatography mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(9): p. 1513-1521.
15. Van Dyke, C. and R. Byck, *Cocaine.* Scientific American, 1982. **246**(3): p. 128-141.
16. Bocos González, F., *Estudio conformacional de la estructura molecular de la cocaína y el "crack".* 2016.

17. Shannon, M., *Clinical toxicity of cocaine adulterants.* Annals of emergency medicine, 1988. **17**(11): p. 1243-1247.
18. Buchanan, J.A., et al., *A confirmed case of agranulocytosis after use of cocaine contaminated with levamisole.* Journal of Medical Toxicology, 2010. **6**(2): p. 160-164.
19. GARZÓN, W.F., F. PARADA, and N.M. FLORIÁN, *Análisis forense de muestras de cocaína producidas en Colombia: I. Perfil cromatográfico de muestras de clorhidrato de cocaína.* Vitae, 2009. **16**(2).
20. ADCOL98, P., *C58, Convenio UNODC–Estado Colombiano.* Validación Prueba Pericial Homologada. Buga, Valle, 2001.
21. Morello, D.R. and R.P. Meyers, *Qualitative and quantitative determination of residual solvents in illicit cocaine HCl and heroin HCl.* Journal of Forensic Science, 1995. **40**(6): p. 957-963.
22. Casale, J.F., *Detection of pseudoecgonine and differentiation from ecgonine in illicit cocaine.* Forensic science international, 1990. **47**(3): p. 277-287.
23. Bessa, M.A., et al., *Underreporting of use of cocaine and marijuana during the third trimester of gestation among pregnant adolescents.* Addictive behaviors, 2010. **35**(3): p. 266-269.
24. Sánchez, C.L., et al., *Fundamentos básicos sobre alcohol, tabaco y otras drogas*. 2001: Universidad Miguel Hernández, Instituto de Investigación de Drogodependencias.
25. Rodríguez, R.E., et al., *Les molècules que modulen el dolor. Analgèsia i drogodependència, vint-i-cinc anys després del descobriment de les encefalines.* Revista de la Societat Catalana de Química, 2001: p. 49-55.
26. Sosa, I.A. and J.L.L. Sánchez, *Instituto de Biotecnología.*
27. Siegel, J., *Forensic chemistry: fundamentals and applications*. 2015: John Wiley & Sons.
28. Lurie, I.S. and S.G. Toske, *Applicability of ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for heroin profiling.* Journal of Chromatography A, 2008. **1188**(2): p. 322-326.
29. Cases, M.V. and A.G. Hens, *Técnicas analíticas de separación*. 1988: Reverté.
30. Holler, J., T. Nieman, and D.A. Skoog, *Principios de análisis instrumental*. 2000: Madrid.
31. Naturales, M.N.d.C. *Cromatografía de gases*. 14 de Noviembre de 2017]; Available from: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio//es_ES//investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf.
32. Gomis Yagües, V., *Tema 3. Cromatografía de gases.* Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial, 2008.

33. López Valencia, J.P., *Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metilésteres de ácidos*. 2008, Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
34. McNair, H.M. and J.M. Miller, *Basic gas chromatography*. 2011: John Wiley & Sons.
35. Naciones Unidas, P.A.C., *Manual II Curso de actualización de protocolos de PPH*. UNODC: Guadalajara de Buga, COLOMBIA
36. Vessman, J., *Selectivity or specificity. Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry.* Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 1996. **14**(8-10): p. 867-869.
37. Massart, D.L., et al., *Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A*. 1997: Elsevier Science Inc.
38. López, M.I., M.P. Callao, and I. Ruisánchez, *A tutorial on the validation of qualitative methods: From the univariate to the multivariate approach.* Analytica chimica acta, 2015. **891**: p. 62-72.
39. Committee, S., *Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG), Recommendations for: Education and Training.* Quality Assurance, Methods of Analysis, US Department of Justice, Drug Enforcement Administration/Executive Office of the President, Office of National Drug Control Policy, Counterdrug Technology Assessment Center, 2001.
40. Drugs, U.N.O.o., C. Laboratory, and S. Section, *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment Used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens: A Commitment to Quality and Continuous Improvement*. 2009: United Nations Publications.
41. Commission, E.U., *Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.* Off. J. Eur. Communities L, 2002. **221**: p. 8.
42. Bewick, V., L. Cheek, and J. Ball, *Statistics review 13: receiver operating characteristic curves.* Critical care, 2004. **8**(6): p. 508.
43. Glas, A.S., et al., *The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance.* Journal of clinical epidemiology, 2003. **56**(11): p. 1129-1135.
44. Quattrocchi, O.A., S.I.A. de Andrizzi, and R.F. Laba, *Introducción a la HPLC: aplicación y práctica*. 1992: Artes Gráficas Farro.
45. Unidas, N., *Métodos recomendados para la identificación y el análisis de cocaína en materiales incautados*. 2012, New York: Naciones Unidas.
46. Conceição, V., et al., *Estudo do teste de Scott via técnicas espectroscópicas: um método alternativo para diferenciar cloridrato de cocaína e seus adulterantes.* Quim. Nova, 2014. **37**: p. 1538-1544.
47. Youden, W.J., *Index for rating diagnostic tests.* Cancer, 1950. **3**(1): p. 32-35.
48. Alonso, M.Á.M., *Intervalos de confianza y contrastes de hipótesis para parámetros de tests diagnósticos binarios*. 2010: Editorial de la Universidad de Granada.

49. Torrado, C.G., *Análisis cualitativo de cocaína, heroína y morfina por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/MS).* Colombia Forense, 2016. **1**(3): p. 15-23.
50. Ramírez Rodríguez, A.F., *Estandarización de la técnica GC-MS para análisis de cocaína y caracterización de sus principales adulterantes en el Eje Cafétero*. 2011, Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.

ANEXOS

ANEXO 1. Prueba preliminares de sustancias.

Figura 24. Prueba preliminar realizada a la amidopirina (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 25. Prueba preliminar realizada a la fenacetina (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 26. Prueba preliminar realizada a la procaina (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 27. Prueba preliminar realizada a la lidocaina (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 28. Prueba preliminar realizada a la cafeína (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 29. Prueba preliminar realizada a la tetracaína (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 30. Prueba preliminar realizada al levamisol (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

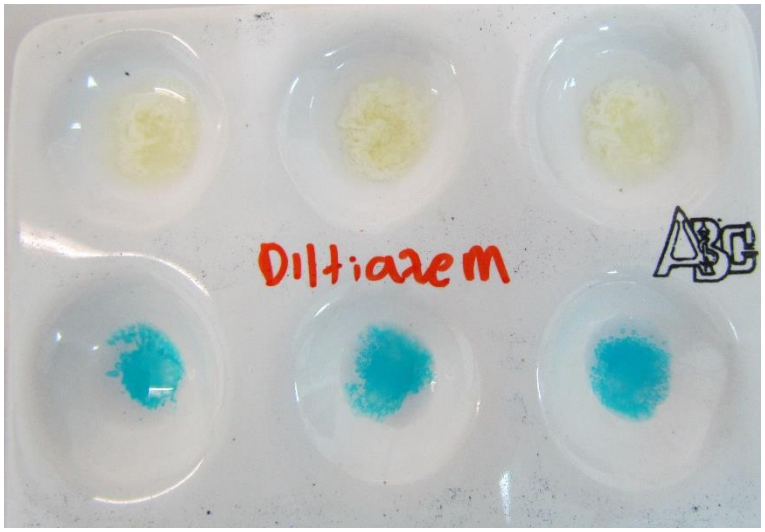


Figura 31. Prueba preliminar realizada al diltiazem (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 32. Prueba preliminar realizada al acetaminofén (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

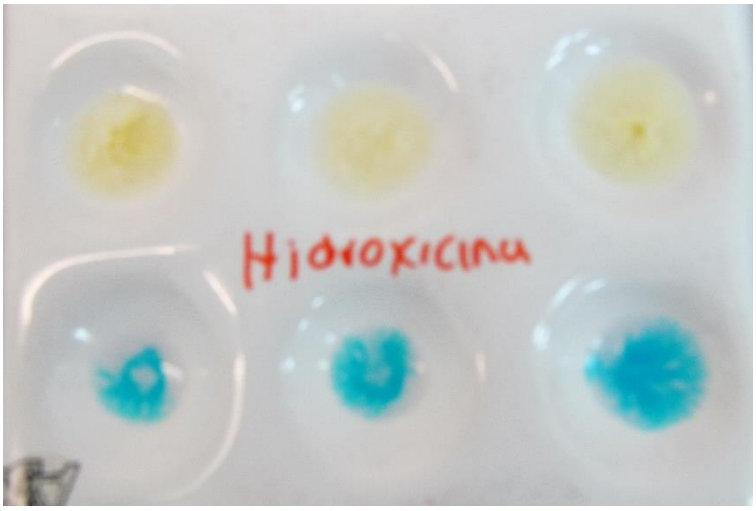


Figura 33. Prueba preliminar realizada a la hidroxicina (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

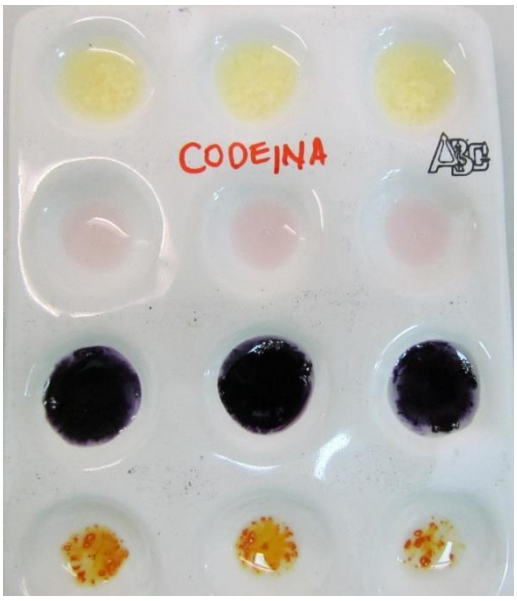


Figura 34. Prueba preliminar realizada a la codeína (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3).

Fuente: Realizado por el Autor.

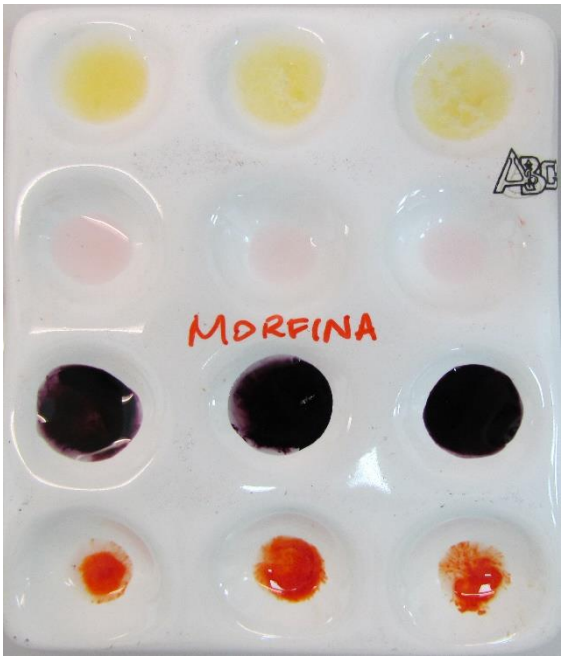


Figura 35. Prueba preliminar realizada a la morfina (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3).

Fuente: Realizado por el Autor.

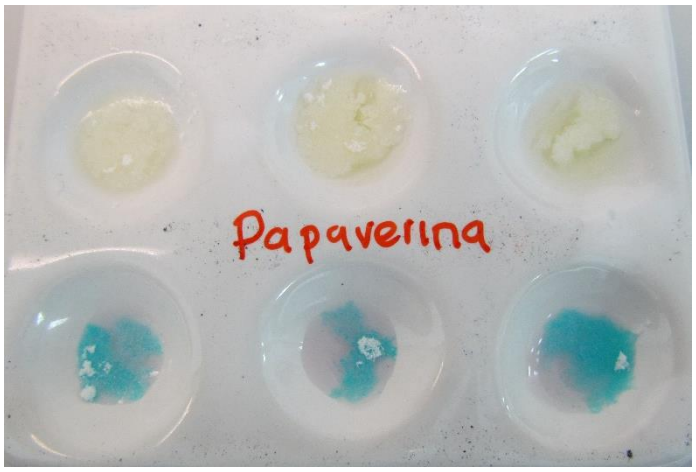


Figura 36. Prueba preliminar realizada a la papaverina (Ensayo Tanred, Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

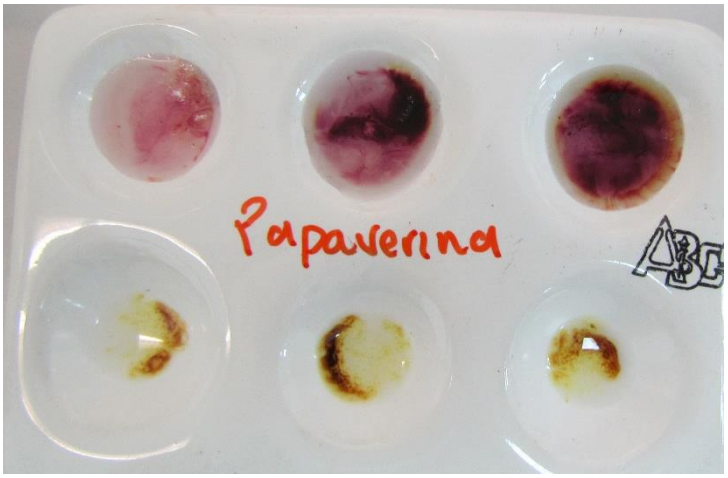


Figura 37. Prueba preliminar realizada a la papaverina (Ensayo Marquis y HNO_3).

Fuente: Realizado por el Autor.

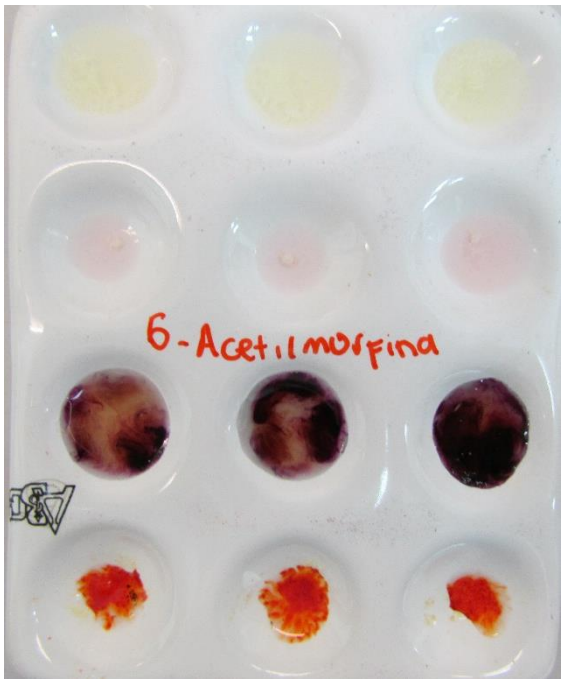


Figura 38. Prueba preliminar realizada a la 6-monoacetilmorfina (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO3).

Fuente: Realizado por el Autor.

ANEXO 2. Prueba preliminares para determinar el límite de detección de la cocaína.

Figura 39. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 80% (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 40. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 70% (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 41. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 60% (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

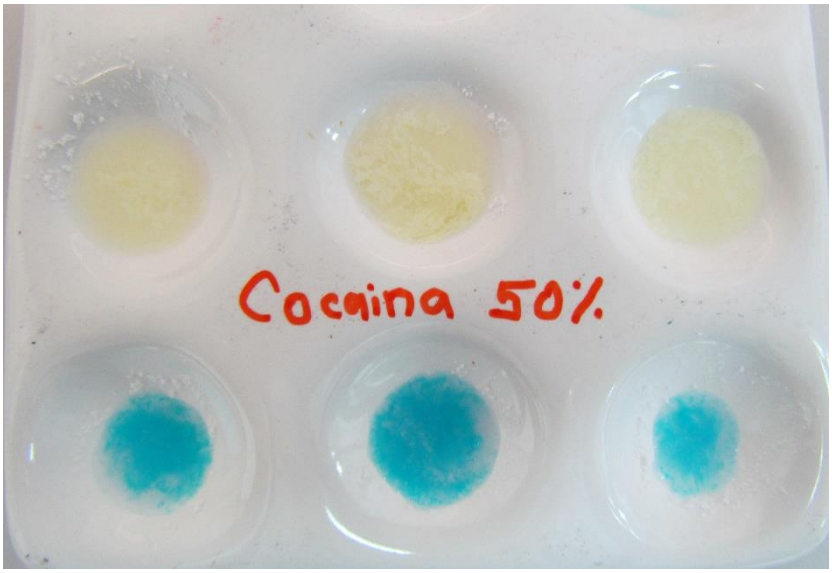


Figura 42. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 50% (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 43. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 40% (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

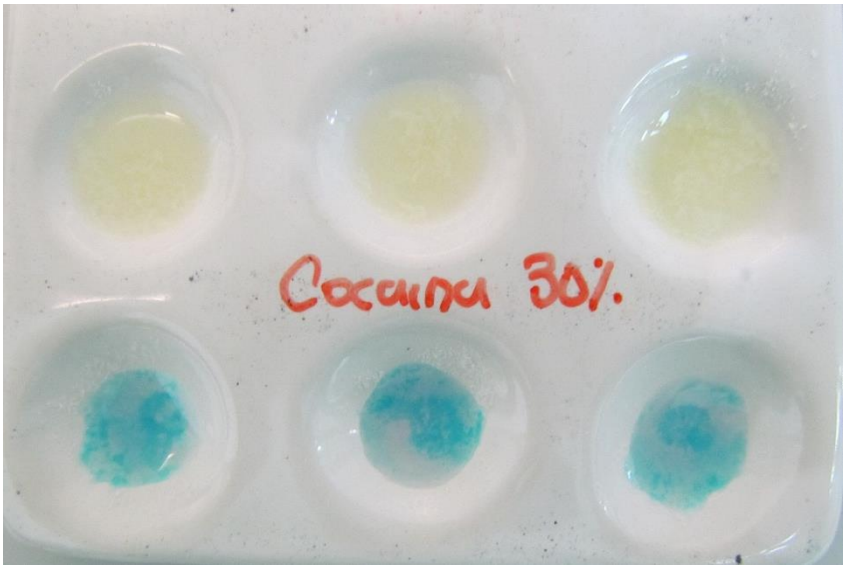


Figura 44. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 30% (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

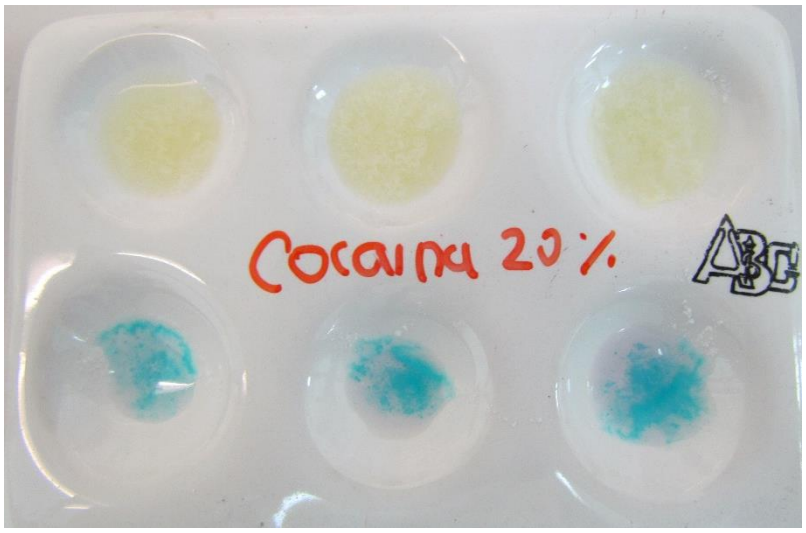


Figura 45. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 20% (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 46. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 10% (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

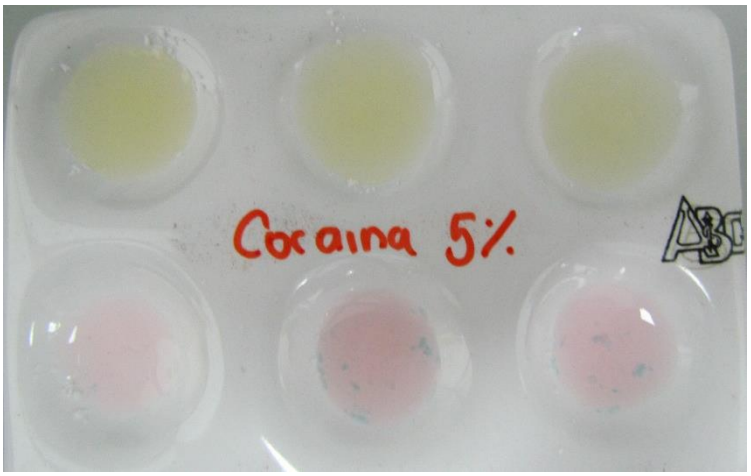


Figura 47. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 5% (Ensayo Tanred y Scott).

Fuente: Realizado por el Autor.

ANEXO 3. Prueba preliminares para determinar efecto matriz de la cocaína.

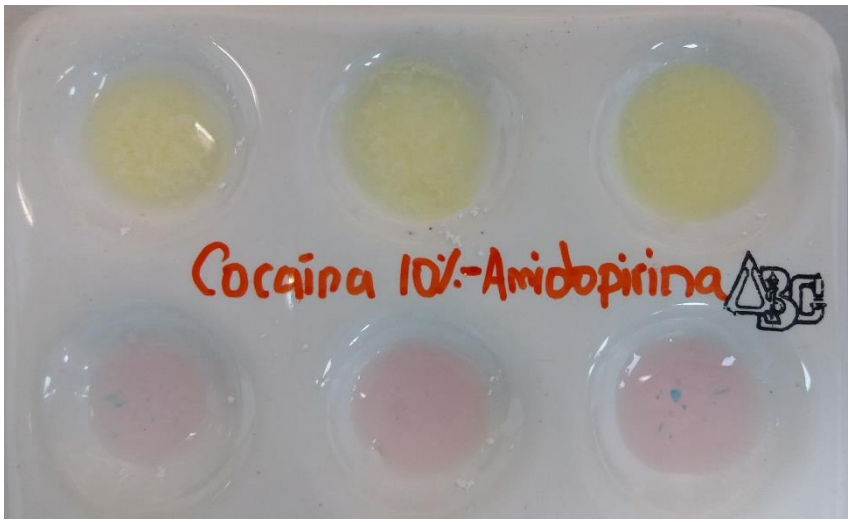


Figura 48. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 10%- aminopirina 90%.

Fuente: Realizado por el Autor.

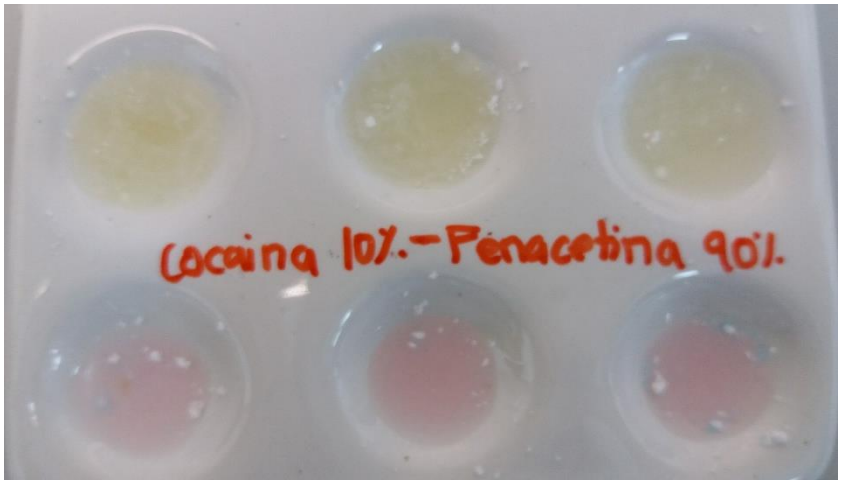


Figura 49. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 10%- fenacetina 90%.

Fuente: Realizado por el Autor.

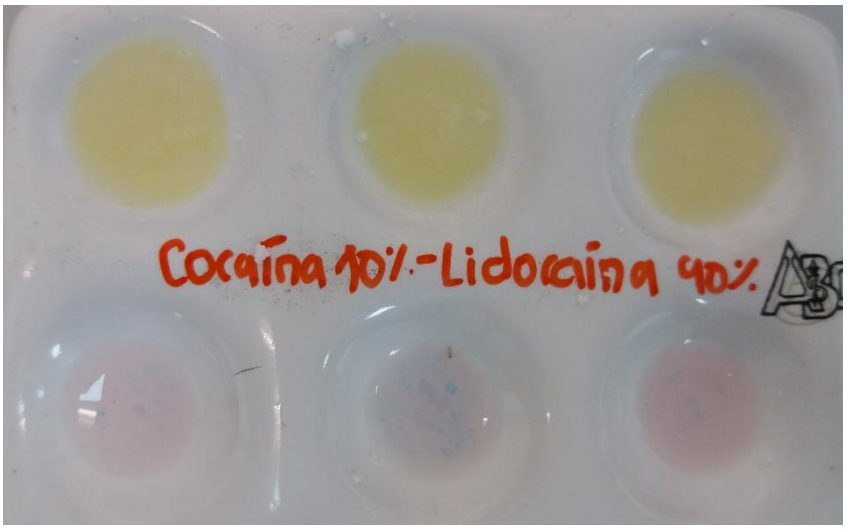


Figura 50. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 10%- Lidocaína 90%.

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 51. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 10%- cafeína 90%.

Fuente: Realizado por el Autor.

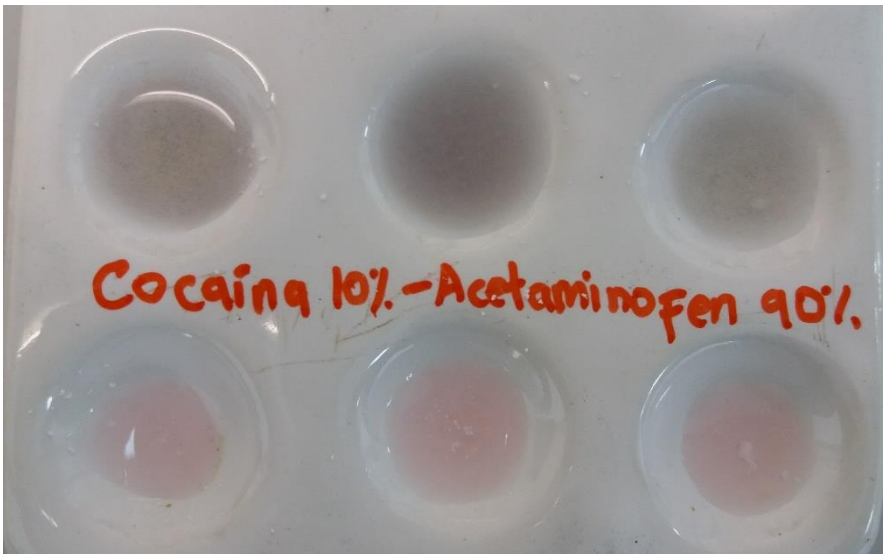


Figura 52. Prueba preliminar realizada a la cocaína al 10%- acetaminofén 90%.

Fuente: Realizado por el Autor.

ANEXO 4. Prueba preliminares para determinar el límite de detección de la heroína.

Figura 53. Prueba preliminar realizada a la heroína al 80% (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3).

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 54. Prueba preliminar realizada a la heroína al 70% (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3).

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 55. Prueba preliminar realizada a la heroína al 60% (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3).

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 56. Prueba preliminar realizada a la heroína al 40% (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3).

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 57. Prueba preliminar realizada a la heroína al 30% (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3).

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 58. Prueba preliminar realizada a la heroína al 20% (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO3).

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 59. Prueba preliminar realizada a la heroína al 10% (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3).

Fuente: Realizado por el Autor.

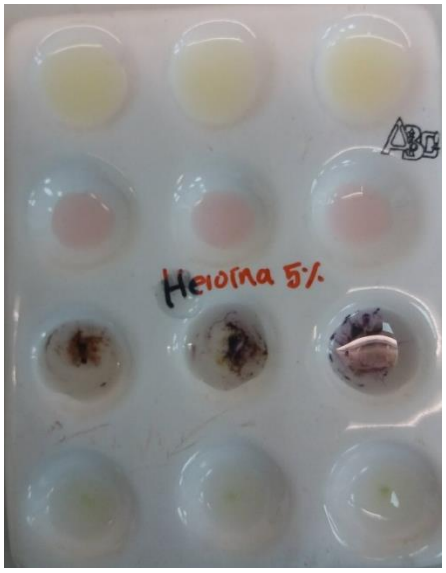


Figura 60. Prueba preliminar realizada a la heroína al 5% (Ensayo Tanred, Scott, Marquis y HNO_3).

Fuente: Realizado por el Autor.

ANEXO 5. Prueba preliminares para determinar efecto matriz de la heroína.

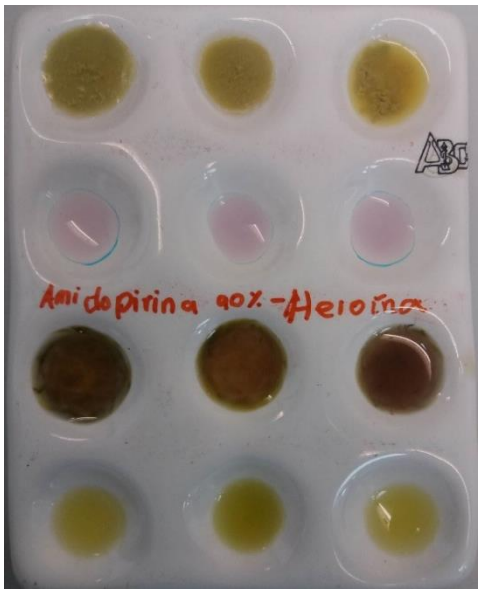


Figura 61. Prueba preliminar realizada a la heroína al 10%- aminopirina 90%.

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 62. Prueba preliminar realizada a la heroína al 10%- fenacetina 90%.

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 63. Prueba preliminar realizada a la heroína al 10%- lidocaina 90%.

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 64. Prueba preliminar realizada a la heroína al 10%- cafeína 90%.

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 65. Prueba preliminar realizada a la heroína al 10%- acetaminofen 90%.

Fuente: Realizado por el Autor.

ANEXO 6. Prueba preliminares para determinar el límite de detección del *Cannabis Sativa*.

Figura 66. Prueba preliminar realizada a la *Cannabis Sativa* al 80% (Ensayo Duquenois).

Fuente: Realizado por el Autor.

Figura 67. Prueba preliminar realizada a la *Cannabis Sativa* al 70% (Ensayo Duquenois).

Fuente: Realizado por el Autor.

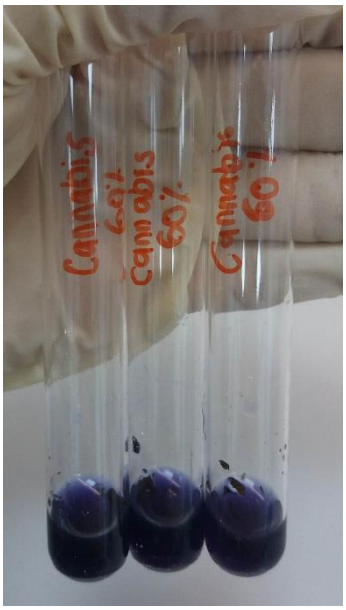


Figura 68. Prueba preliminar realizada a la *Cannabis Sativa* al 60% (Ensayo Duquenois).

Fuente: Realizado por el Autor.

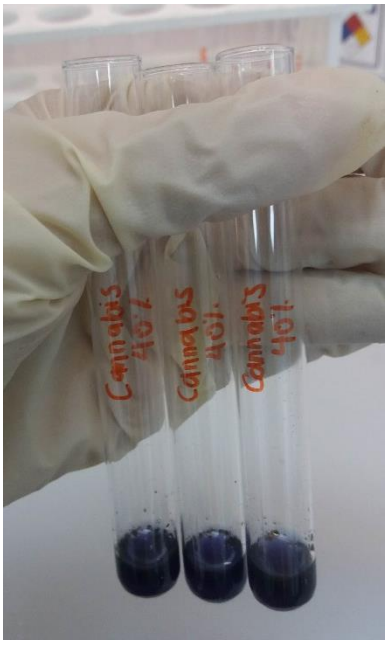


Figura 69. Prueba preliminar realizada a la *Cannabis Sativa* al 40% (Ensayo Duquenois).

Fuente: Realizado por el Autor.

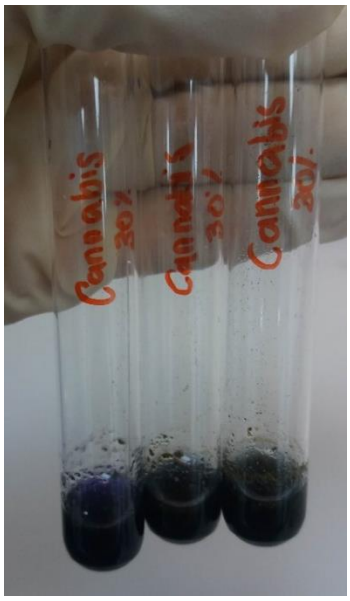


Figura 70. Prueba preliminar realizada a la *Cannabis Sativa* al 30% (Ensayo Duquenois).

Fuente: Realizado por el Autor.

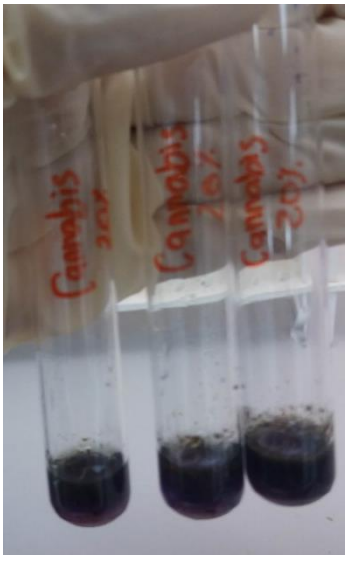


Figura 71. Prueba preliminar realizada a la *Cannabis Sativa* al 20% (Ensayo Duquenois).

Fuente: Realizado por el Autor.

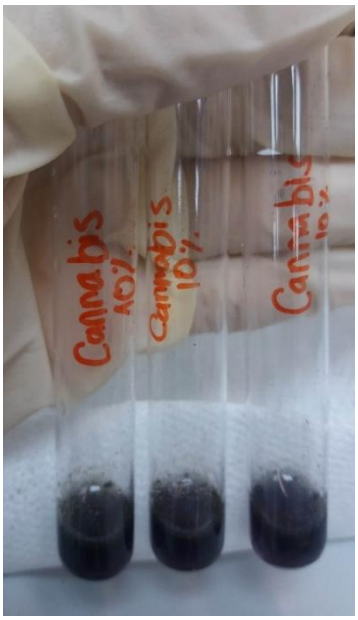


Figura 72. Prueba preliminar realizada a la *Cannabis Sativa* al 10% (Ensayo Duquenois).

Fuente: Realizado por el Autor.

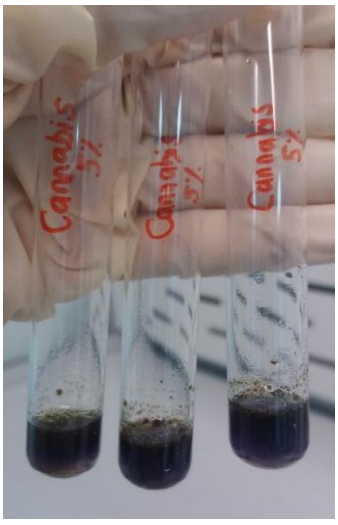


Figura 73. Prueba preliminar realizada a la *Cannabis Sativa* al 5% (Ensayo Duquenois).

Fuente: Realizado por el Autor.

.

ANEXO 7. Cromatogramas y espectrómetros de las sustancias de cocaína, heroína y adulterantes.

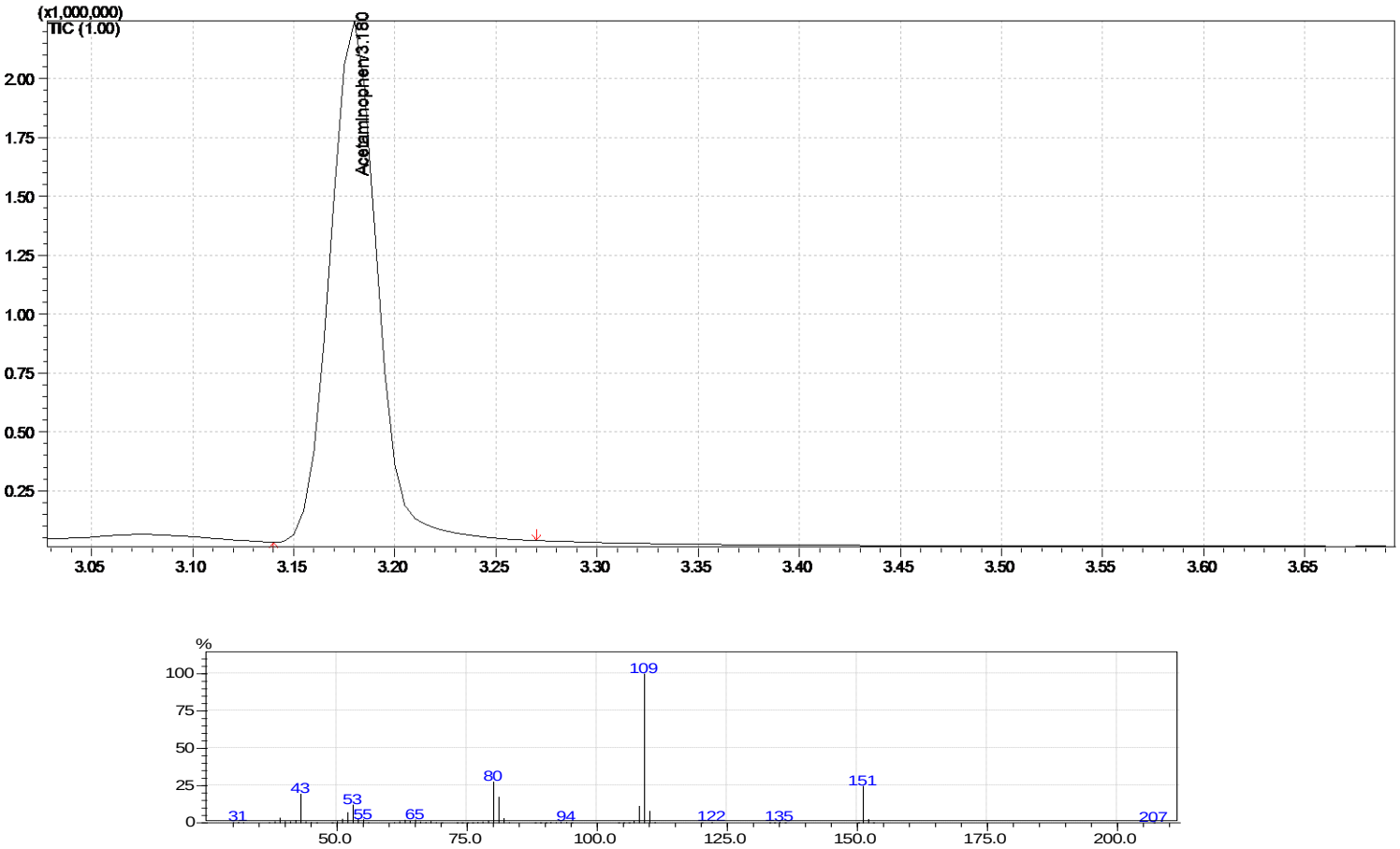


Figura 74. Cromatograma y espectro de masas del acetaminofén.

Fuente: Realizado por el Autor.

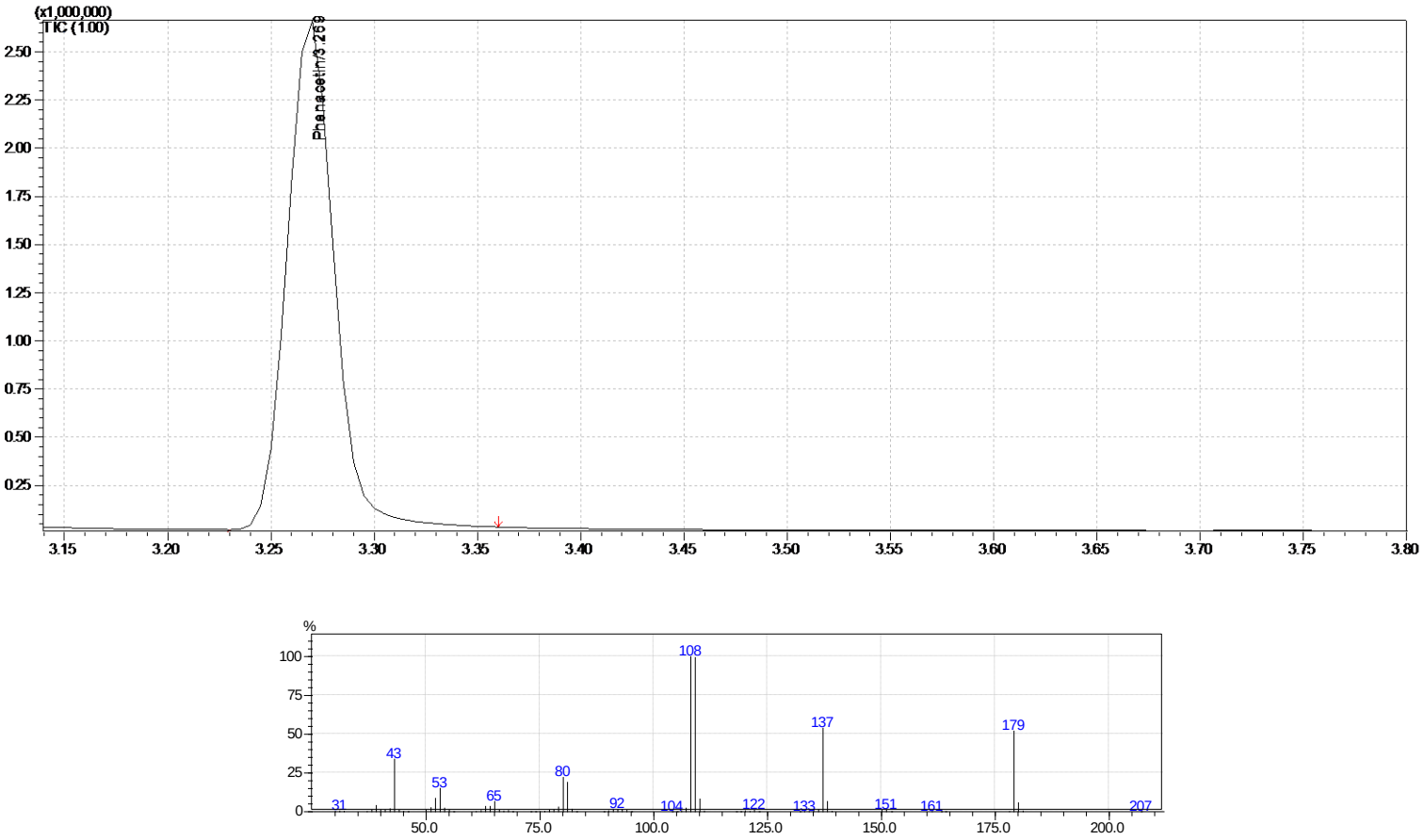


Figura 75. Cromatograma y espectro de masas de la fenacetina.

Fuente: Realizado por el Autor.

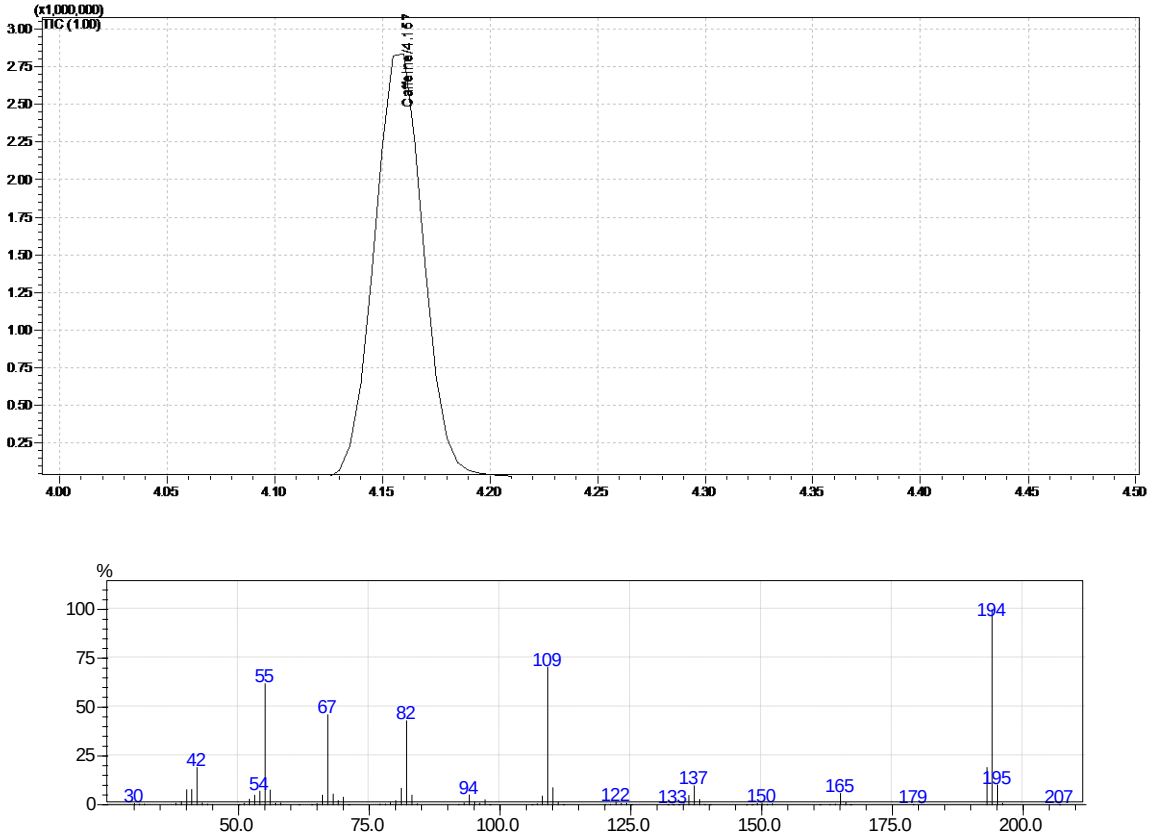


Figura 76. Cromatograma y espectro de masas de la cafeína.

Fuente: Realizado por el Autor.

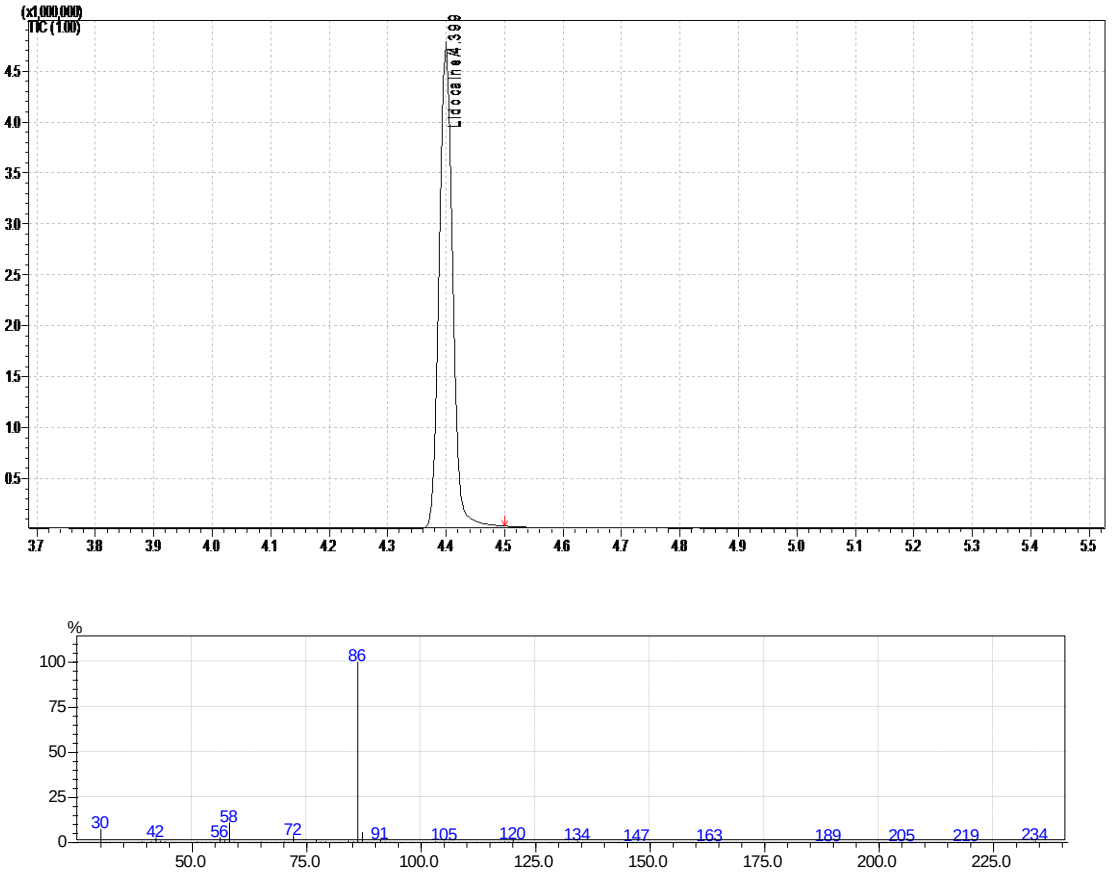


Figura 77. Cromatograma y espectro de masas de la lidocaína.

Fuente: Realizado por el Autor.

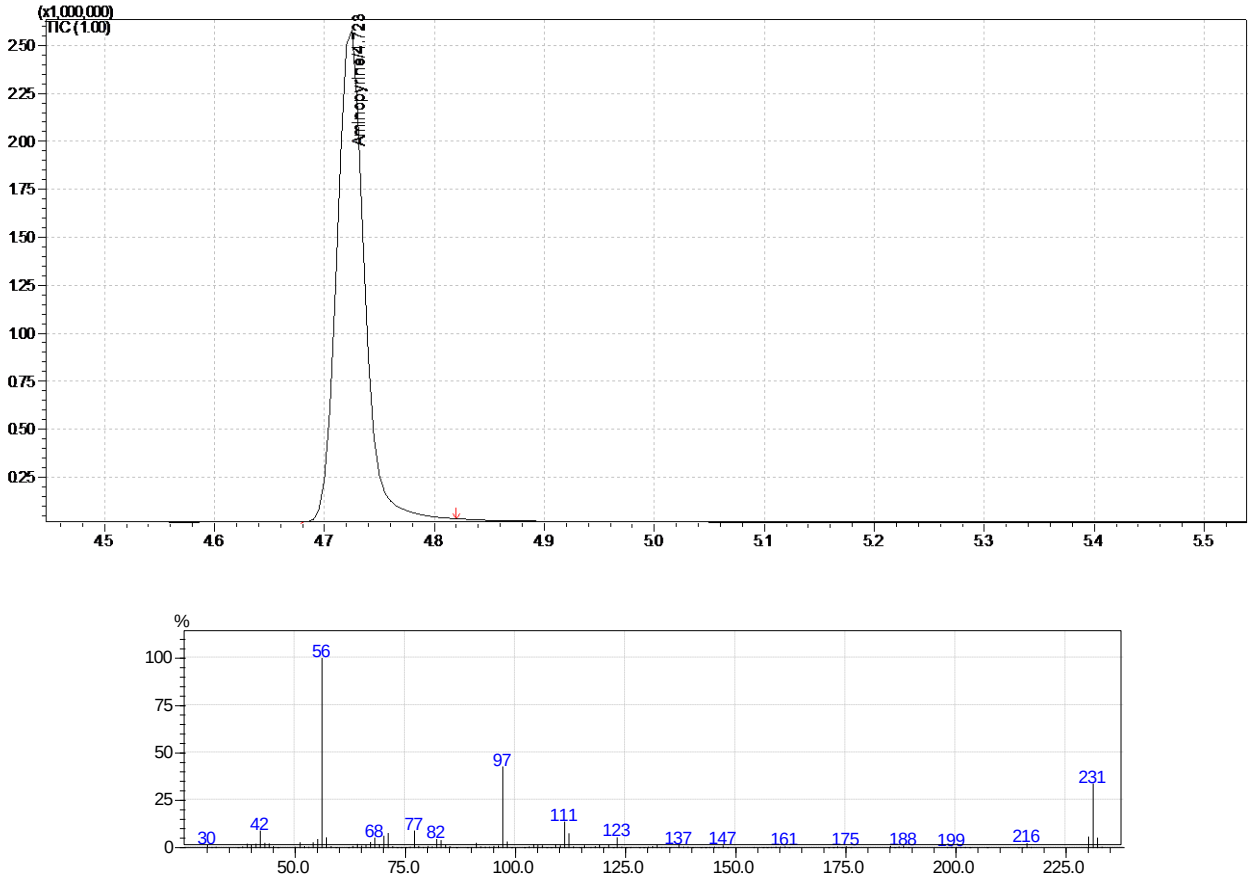


Figura 78. Cromatograma y espectro de masas de la Aminopirina.

Fuente: Realizado por el Autor.

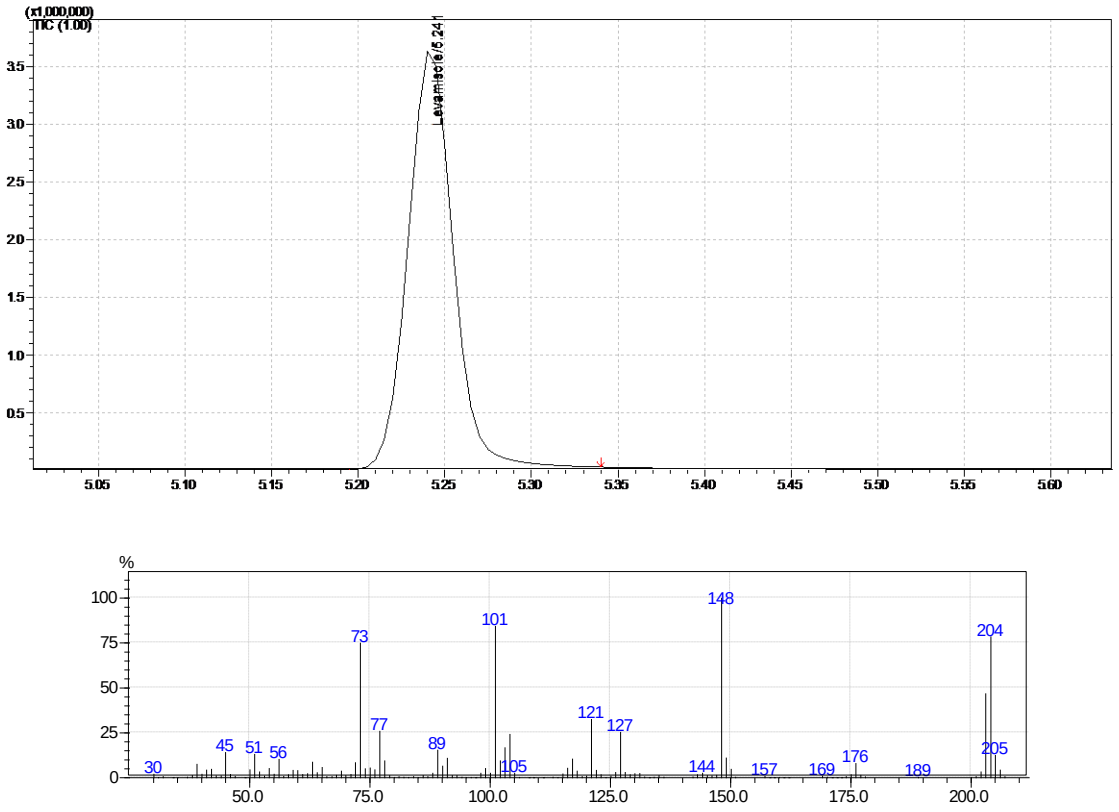


Figura 79. Cromatograma y espectro de masas de la Levamisol.

Fuente: Realizado por el Autor.

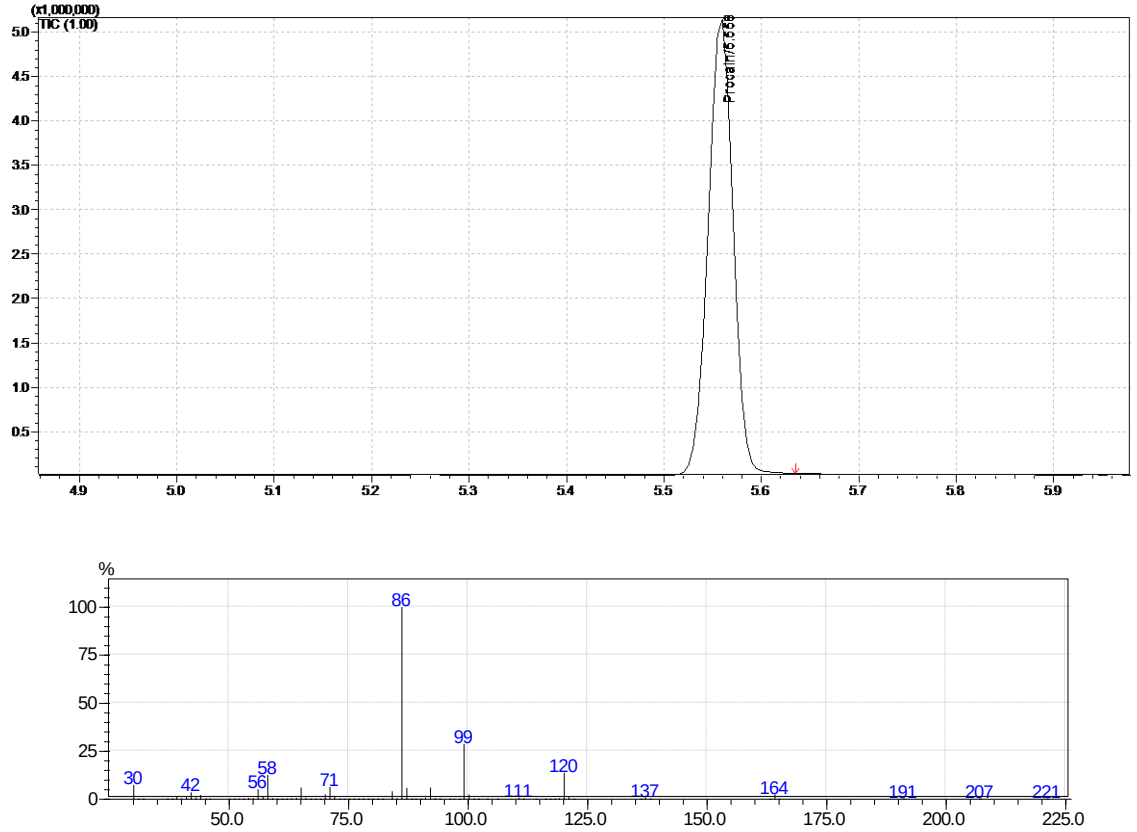


Figura 80. Cromatograma y espectro de masas de la procaína.

Fuente: Realizado por el Autor.

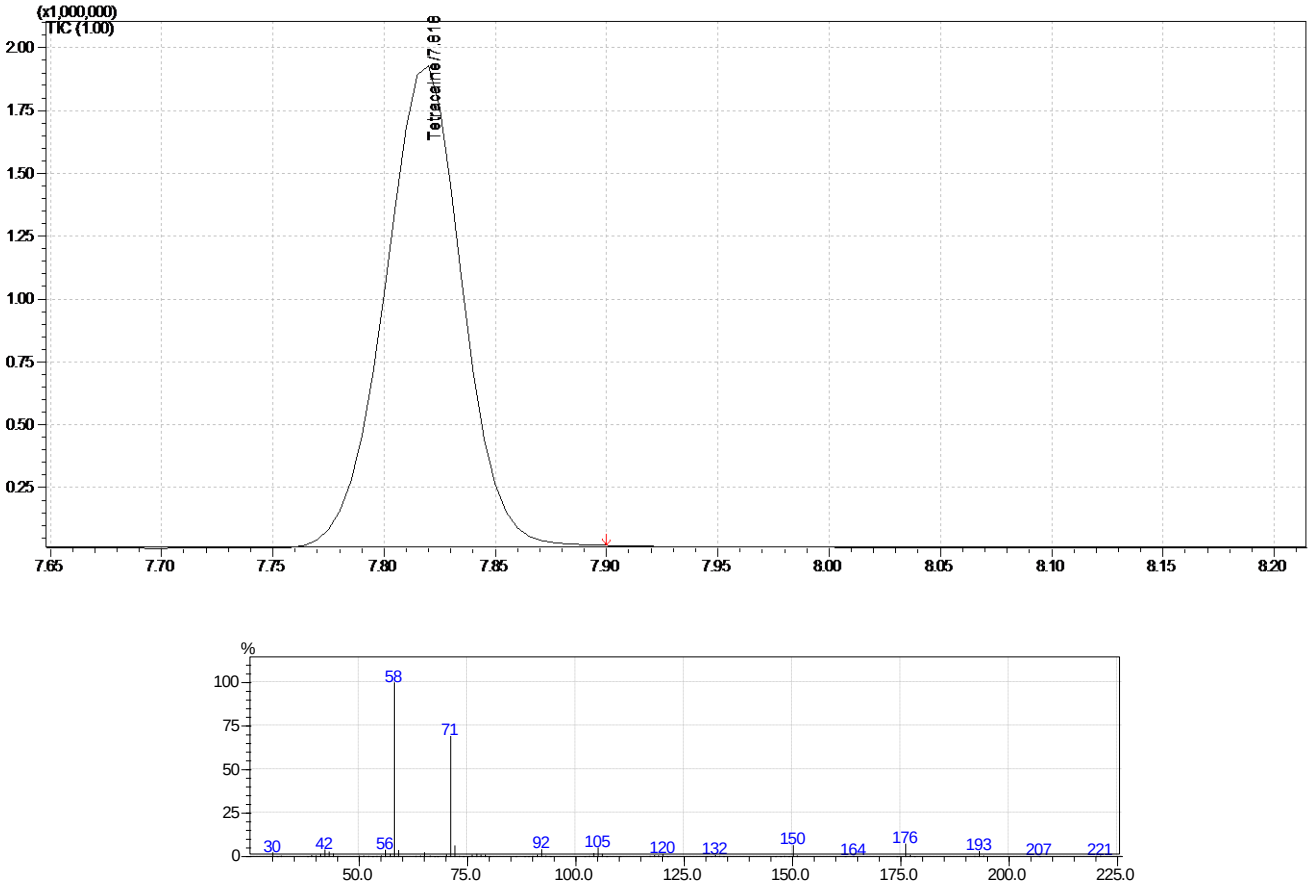
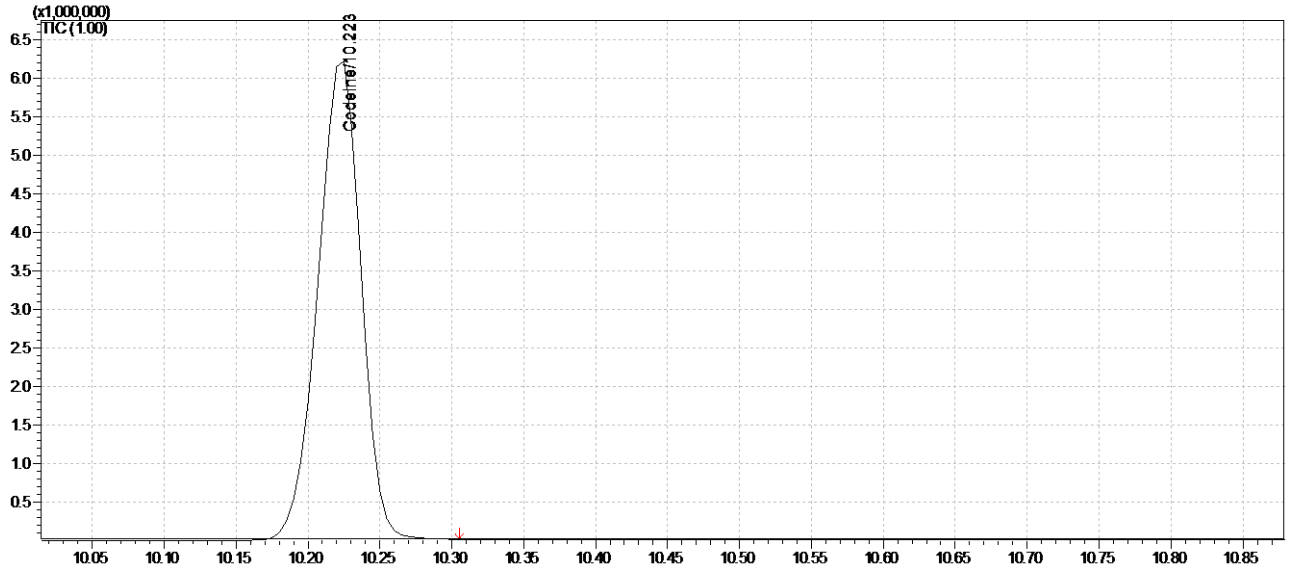


Figura 81. Cromatograma y espectro de masas de la Tetracaína.

Fuente: Realizado por el Autor.



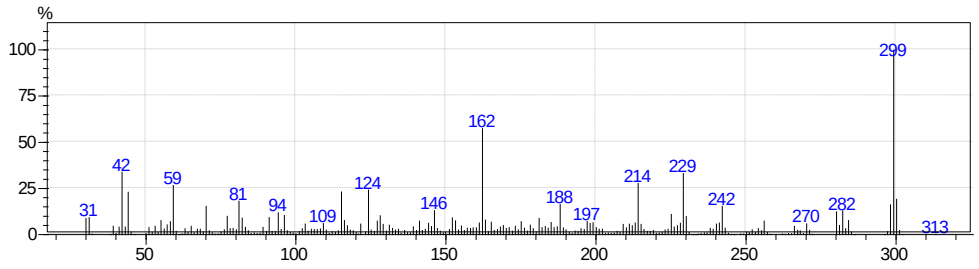


Figura 82. Cromatograma y espectro de masas de la Codeína.

Fuente: Realizado por el Autor.

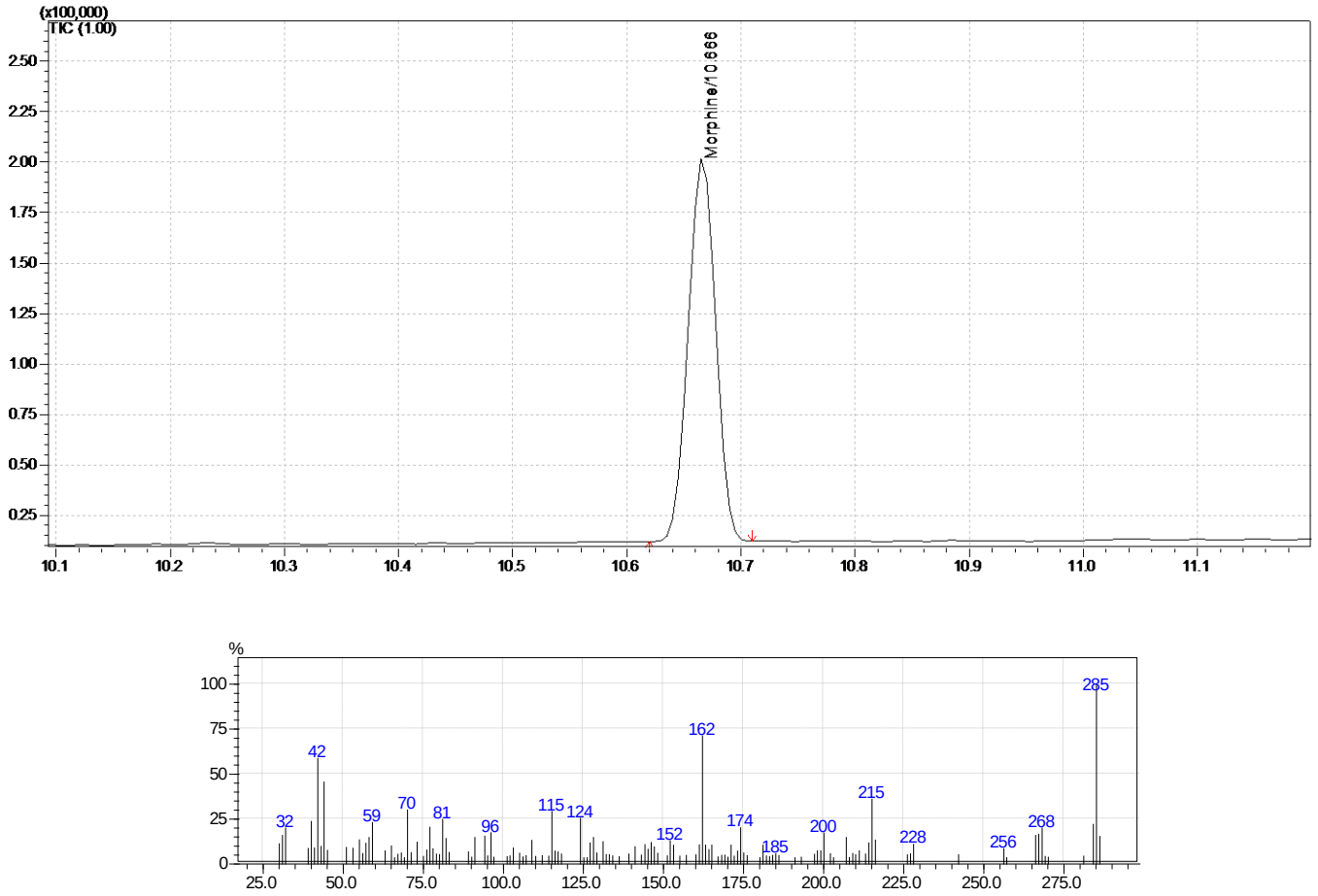


Figura 83. Cromatograma y espectro de masas de la morfina.

Fuente: Realizado por el Autor.

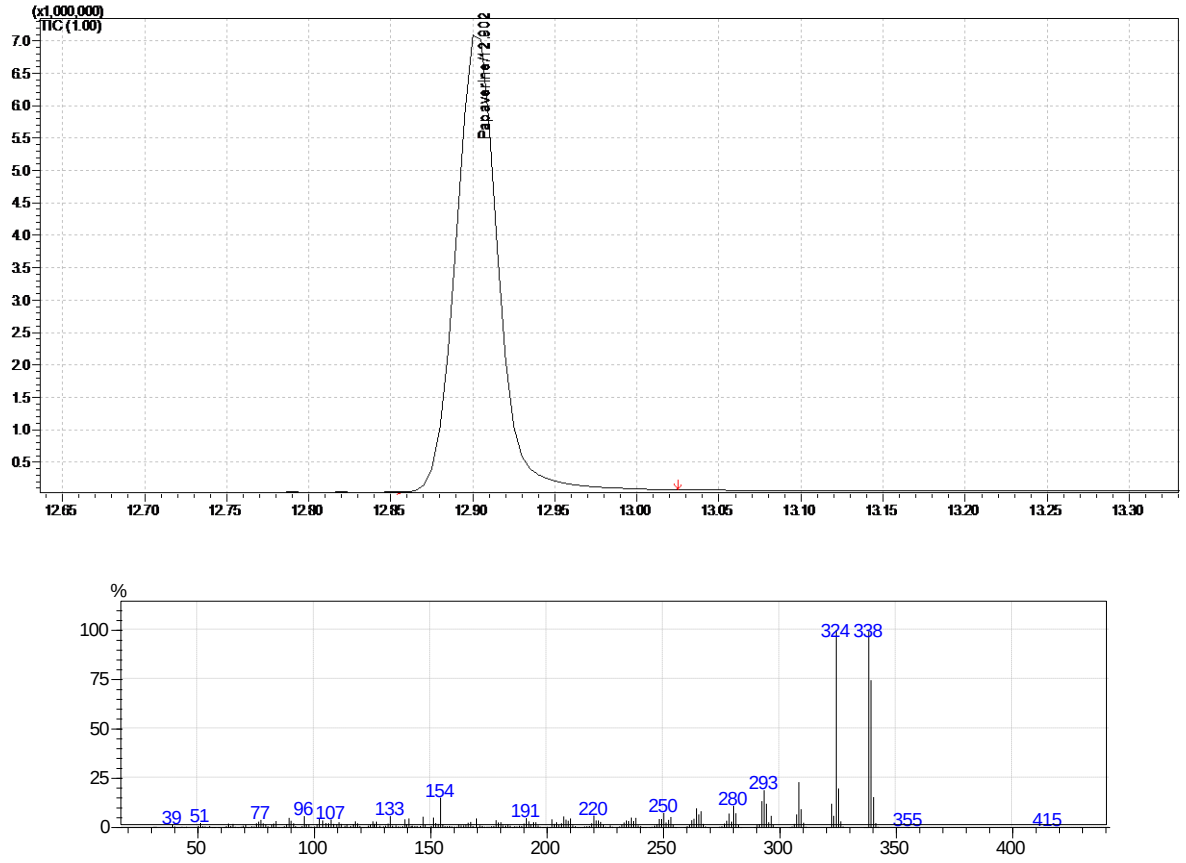


Figura 84. Cromatograma y espectro de masas de la papaverina.

Fuente: Realizado por el Autor.

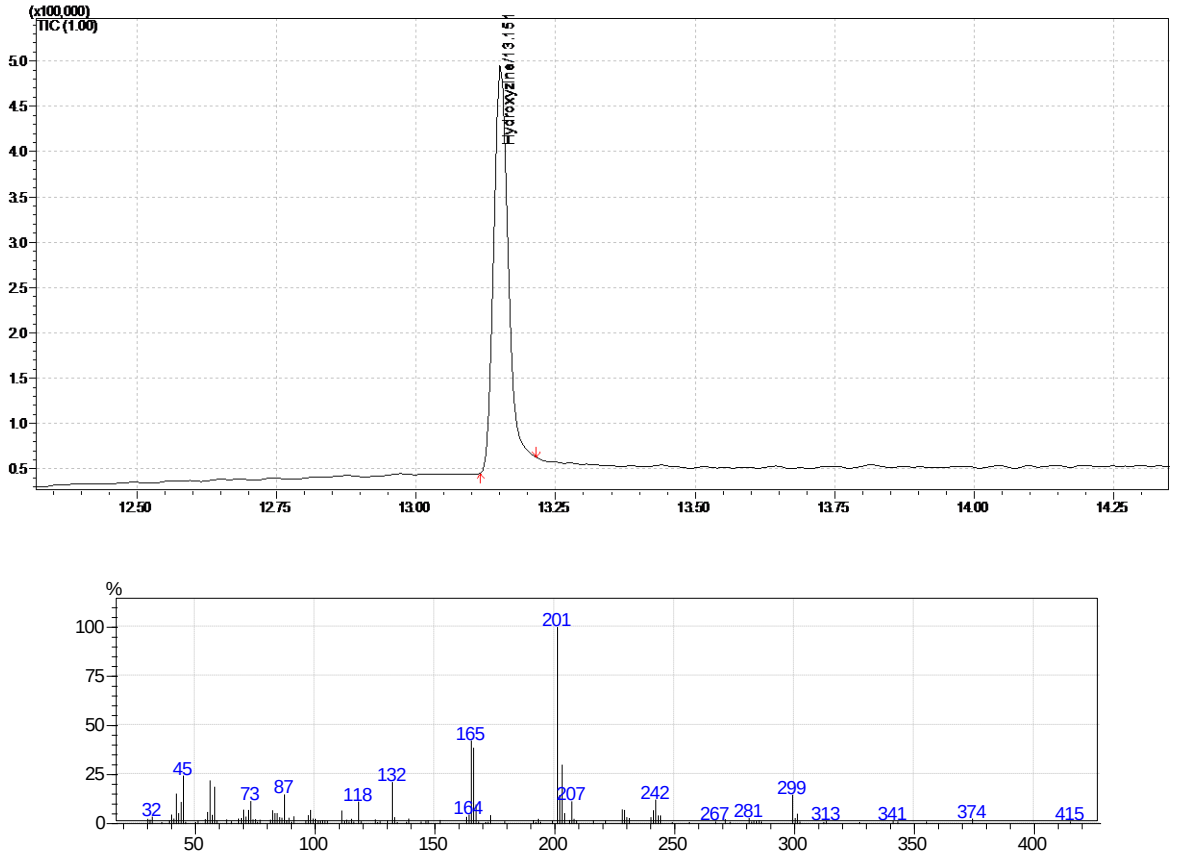


Figura 85. Cromatograma y espectro de masas de la hidroxicina.

Fuente: Realizado por el Autor.

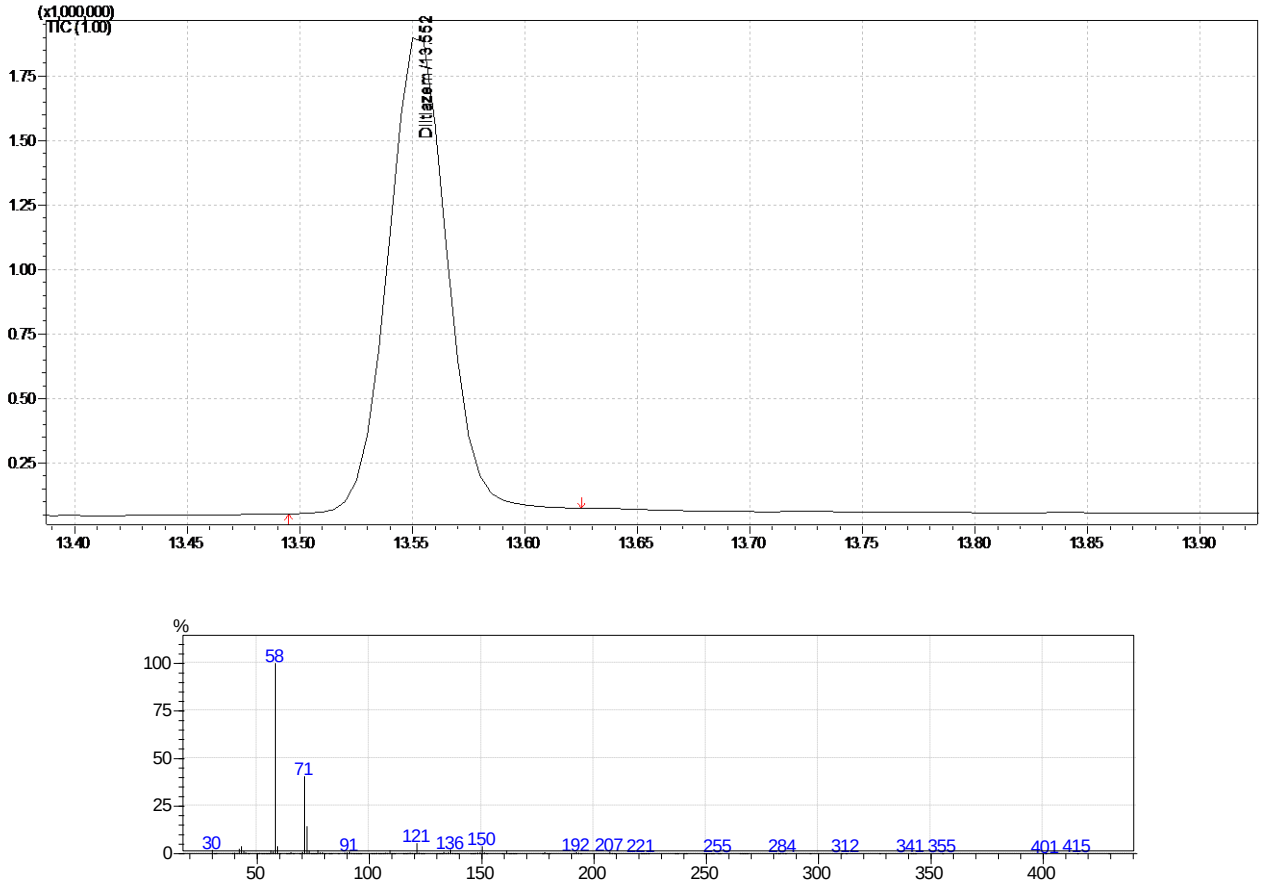


Figura 86. Cromatograma y espectro de masas de la diltiazem.

Fuente: Realizado por el Autor.

ANEXO 8. Cromatogramas de la mezcla usada para la determinación de selectividad y precisión de la cocaína y heroína.

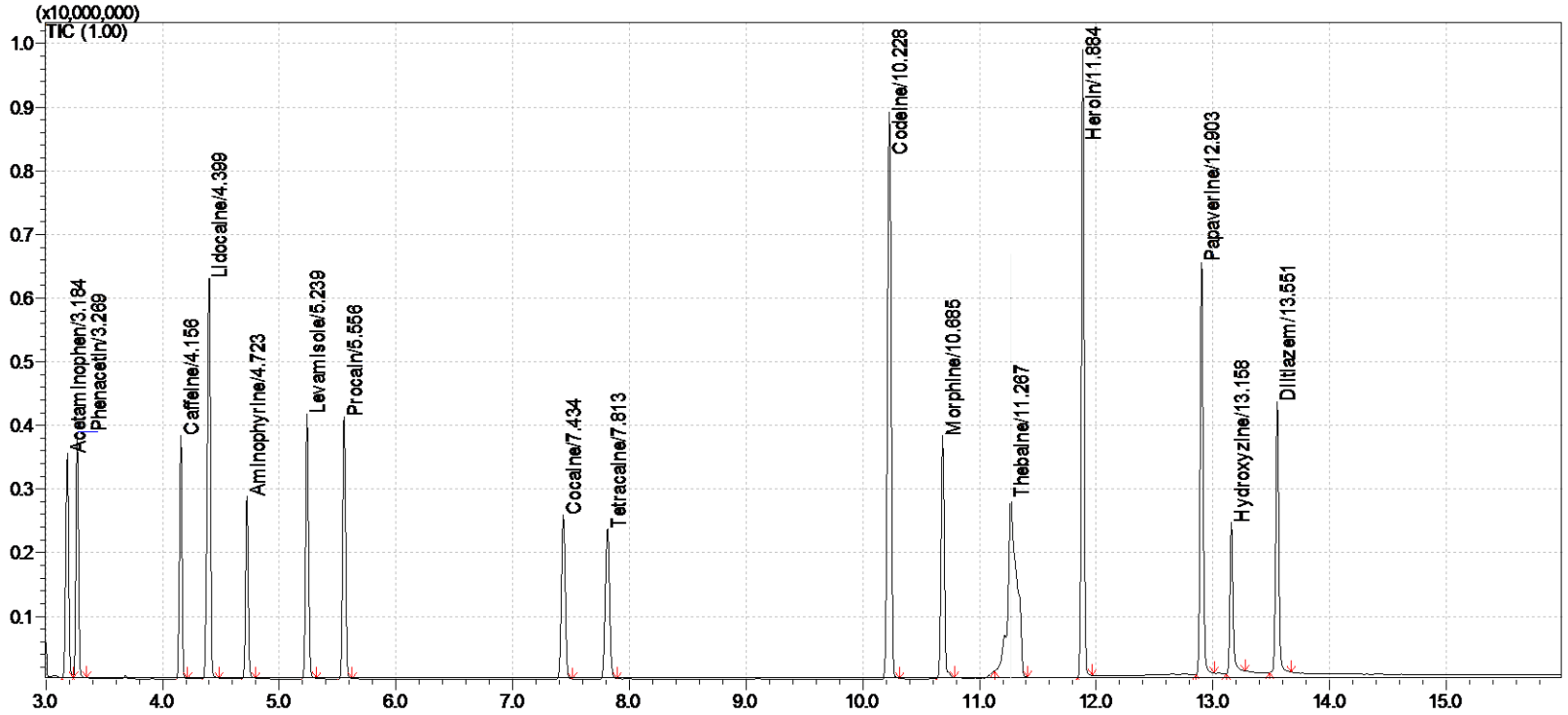


Figura 87. Cromatograma de la mezcla de cocaína, heroína y otras sustancias.

Fuente: Realizado por el Autor.

ANEXO 9. Cromatogramas de las soluciones de cocaína preparadas a diferentes concentraciones.

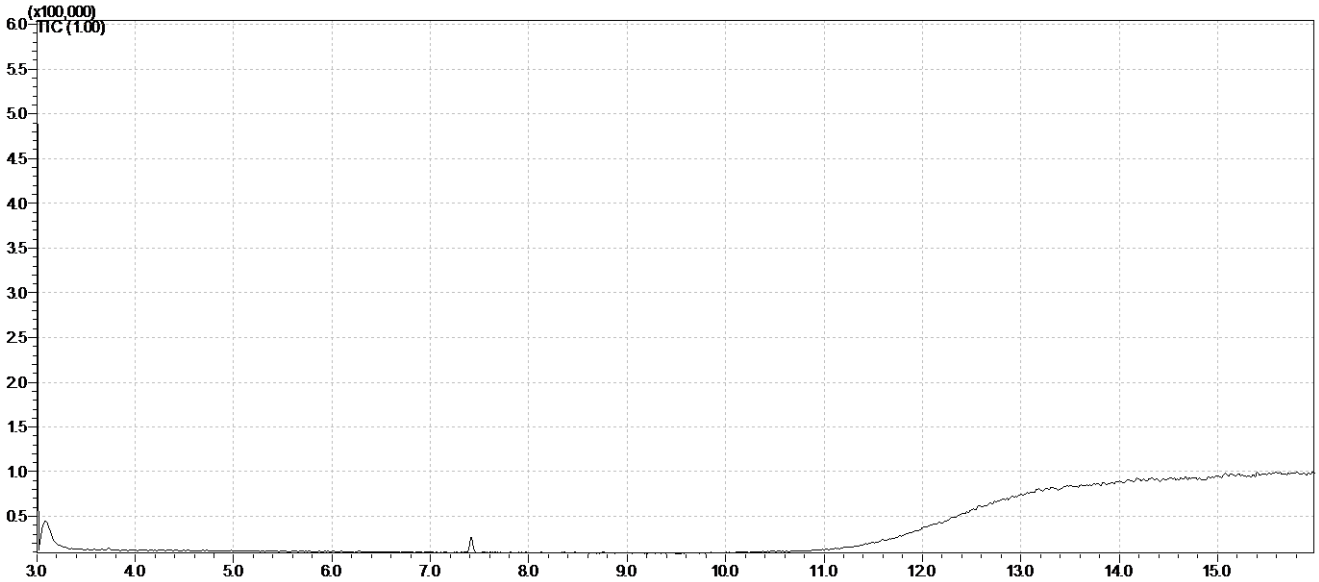


Figura 88. Cromatograma de la cocaína a 20 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

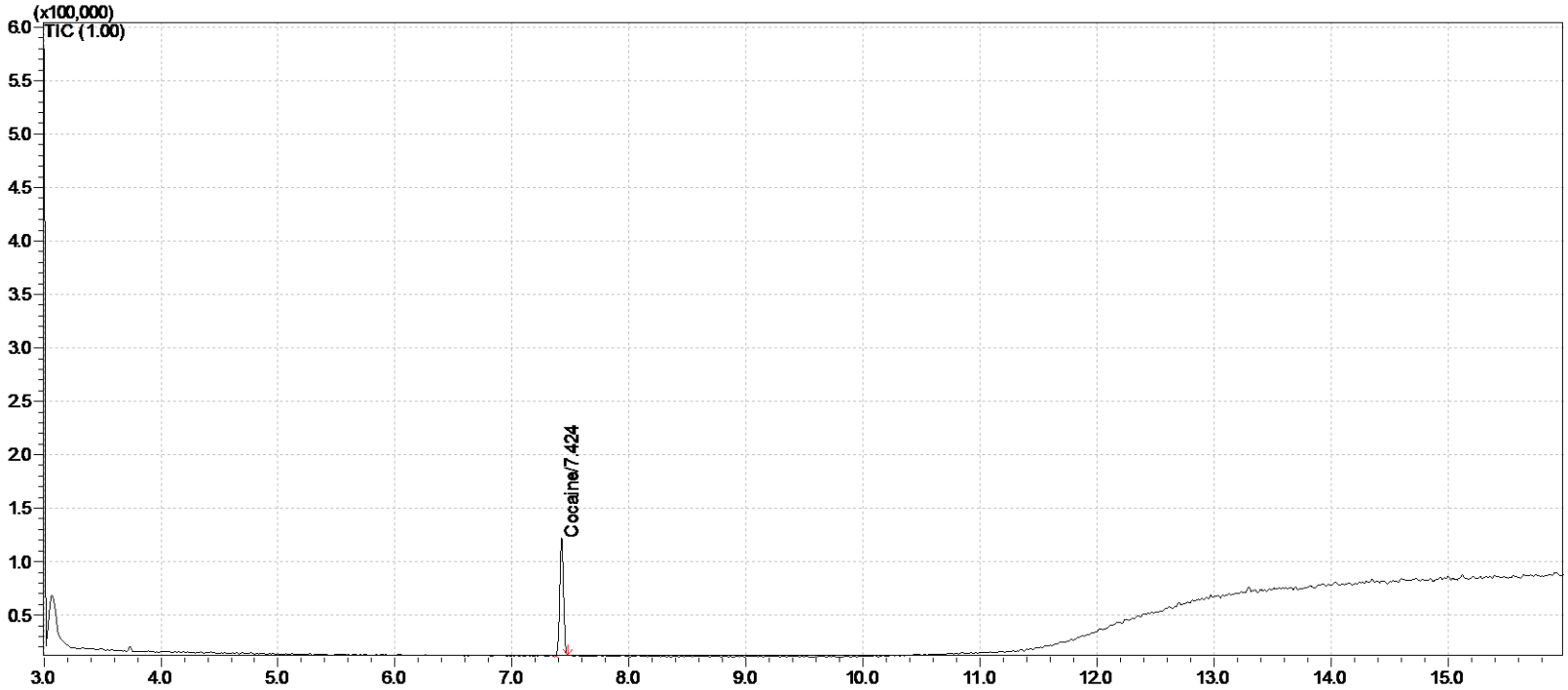


Figura 89. Cromatograma de la cocaína a 50 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

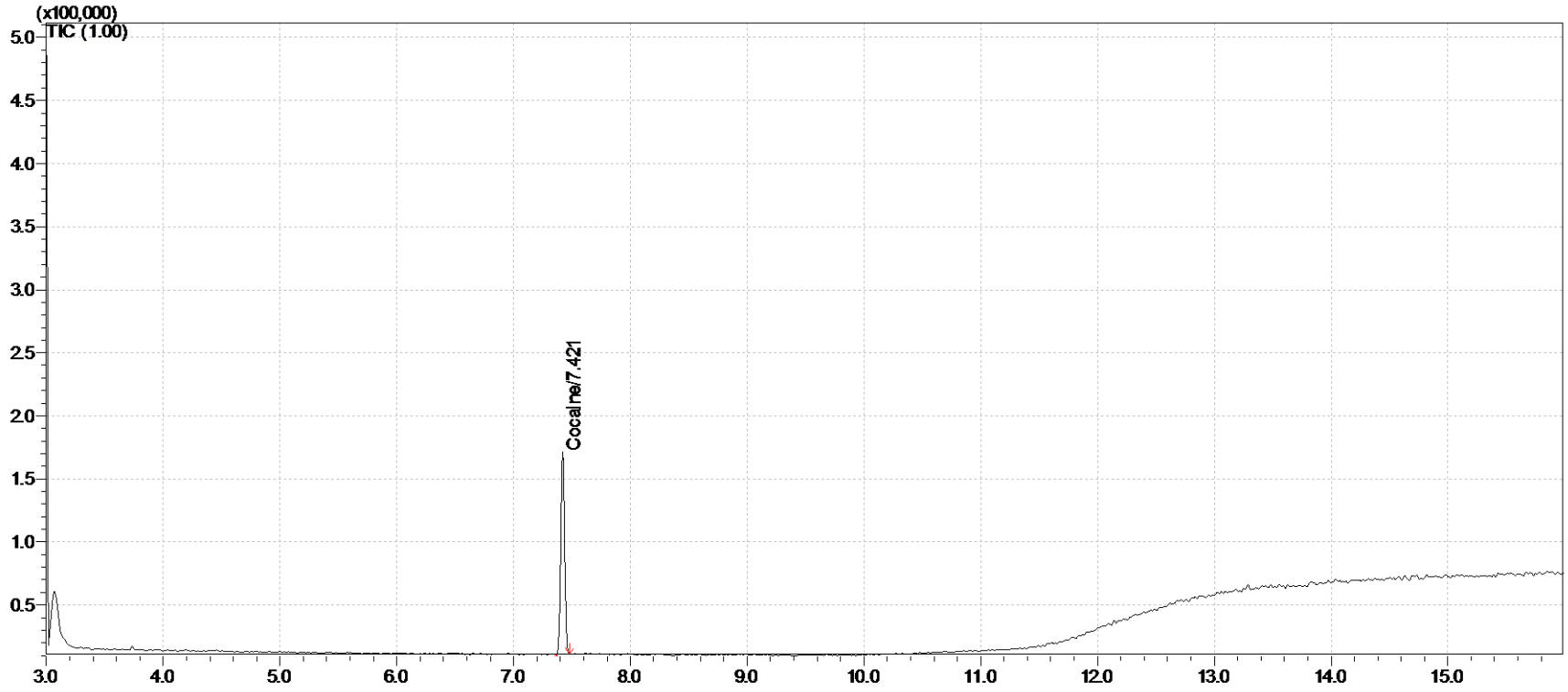


Figura 90. Cromatograma de la cocaína a 75 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

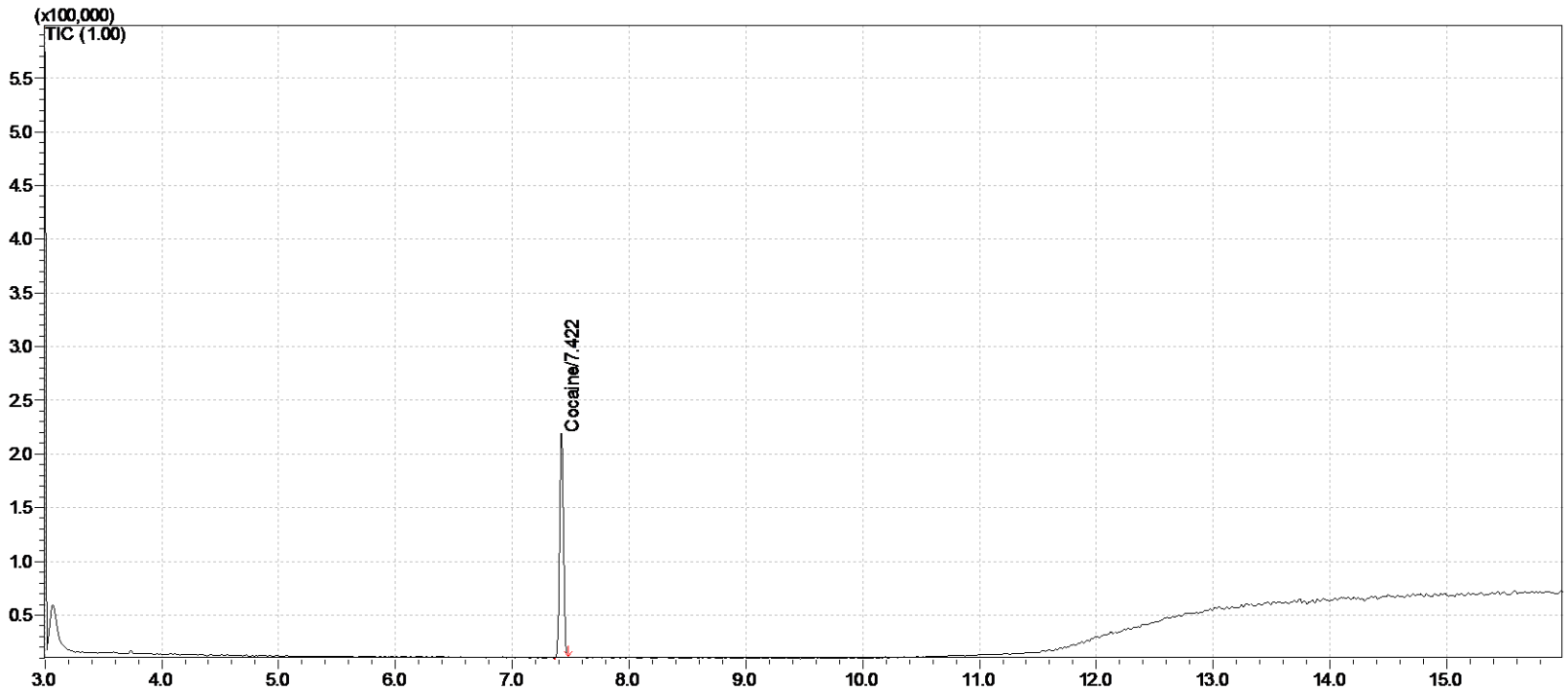


Figura 91. Cromatograma de la cocaína a 100 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

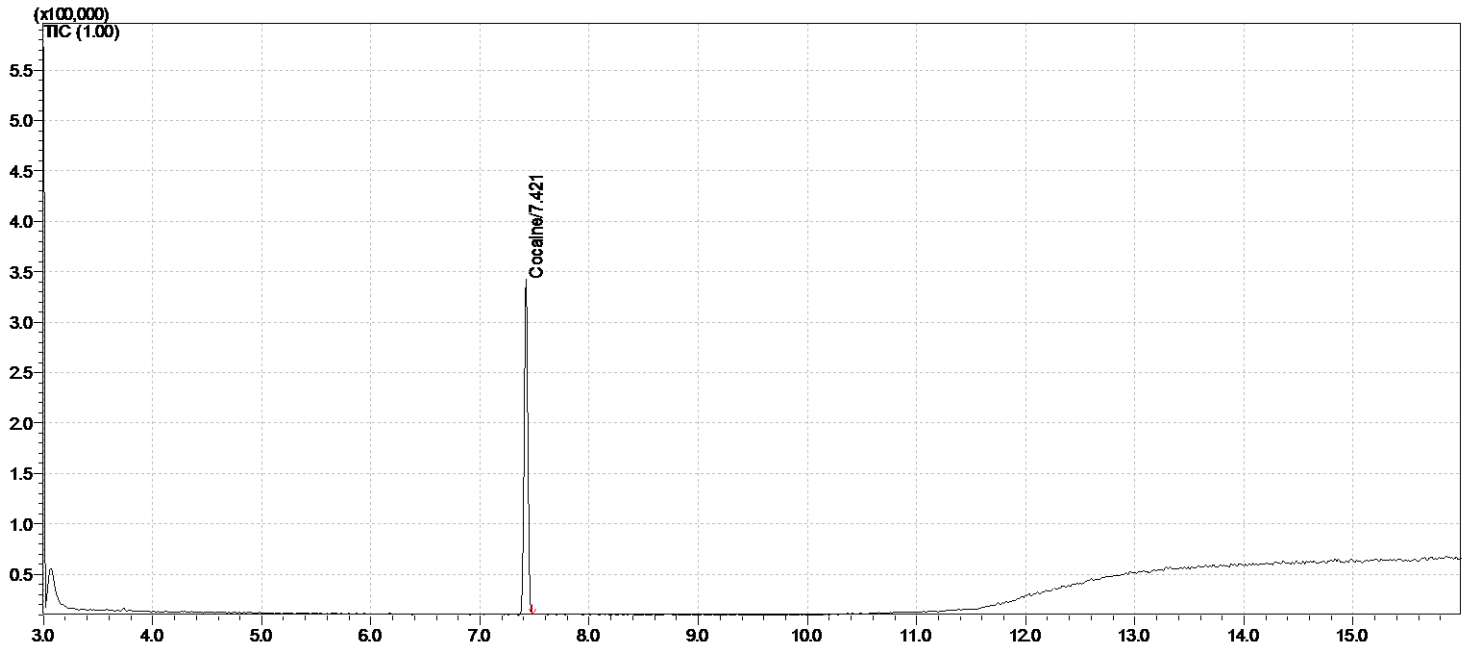


Figura 92. Cromatograma de la cocaína a 150 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

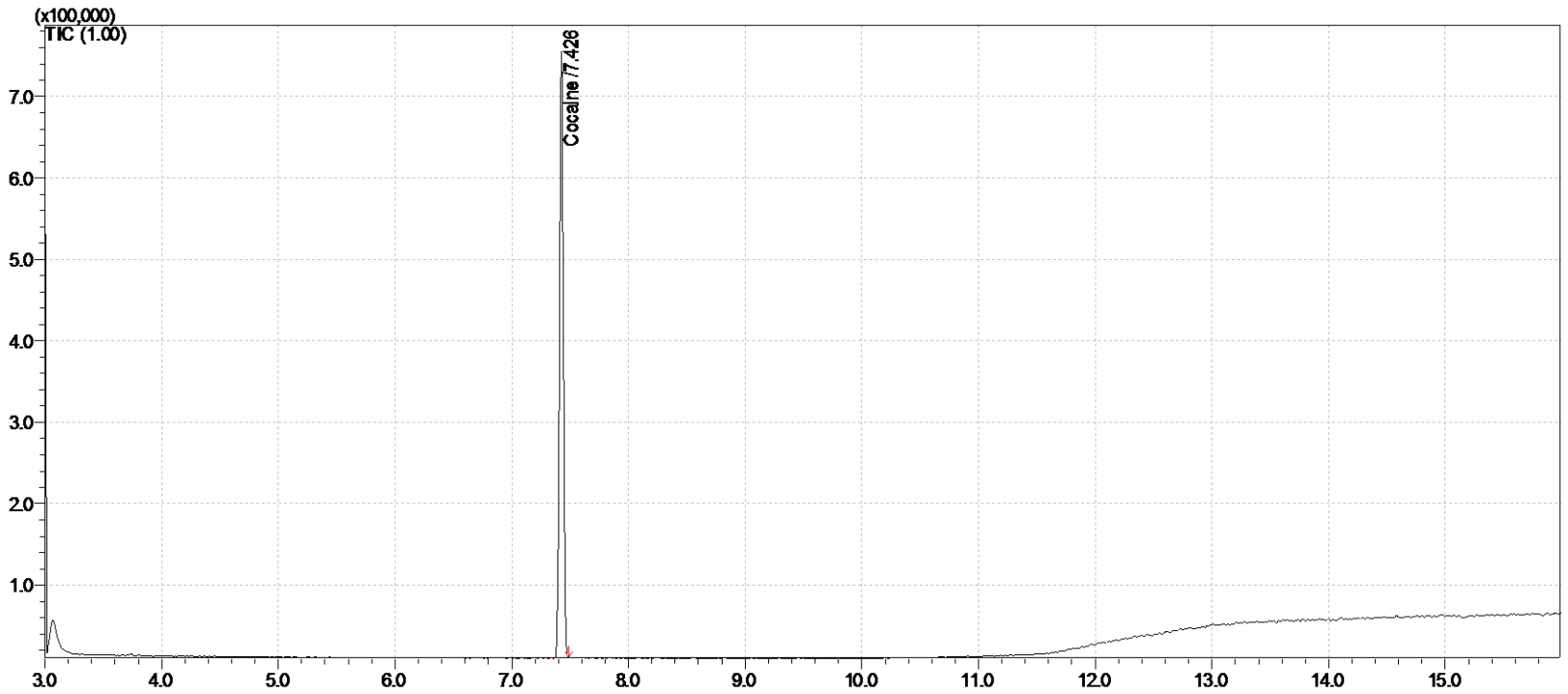


Figura 93. Cromatograma de la cocaína a 300 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

ANEXO 10. Cromatogramas de las soluciones de heroína preparadas a diferentes concentraciones.

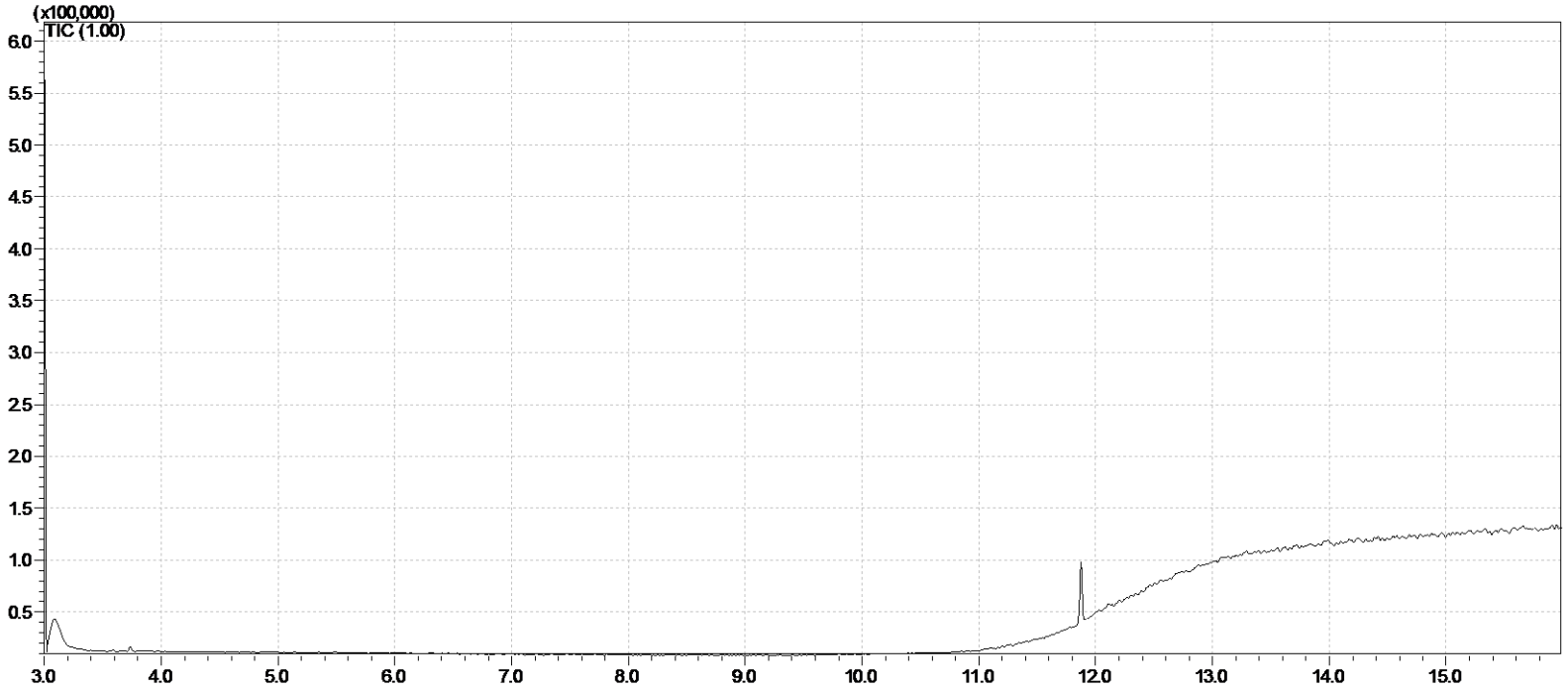


Figura 94. Cromatograma de la heroína a 40 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

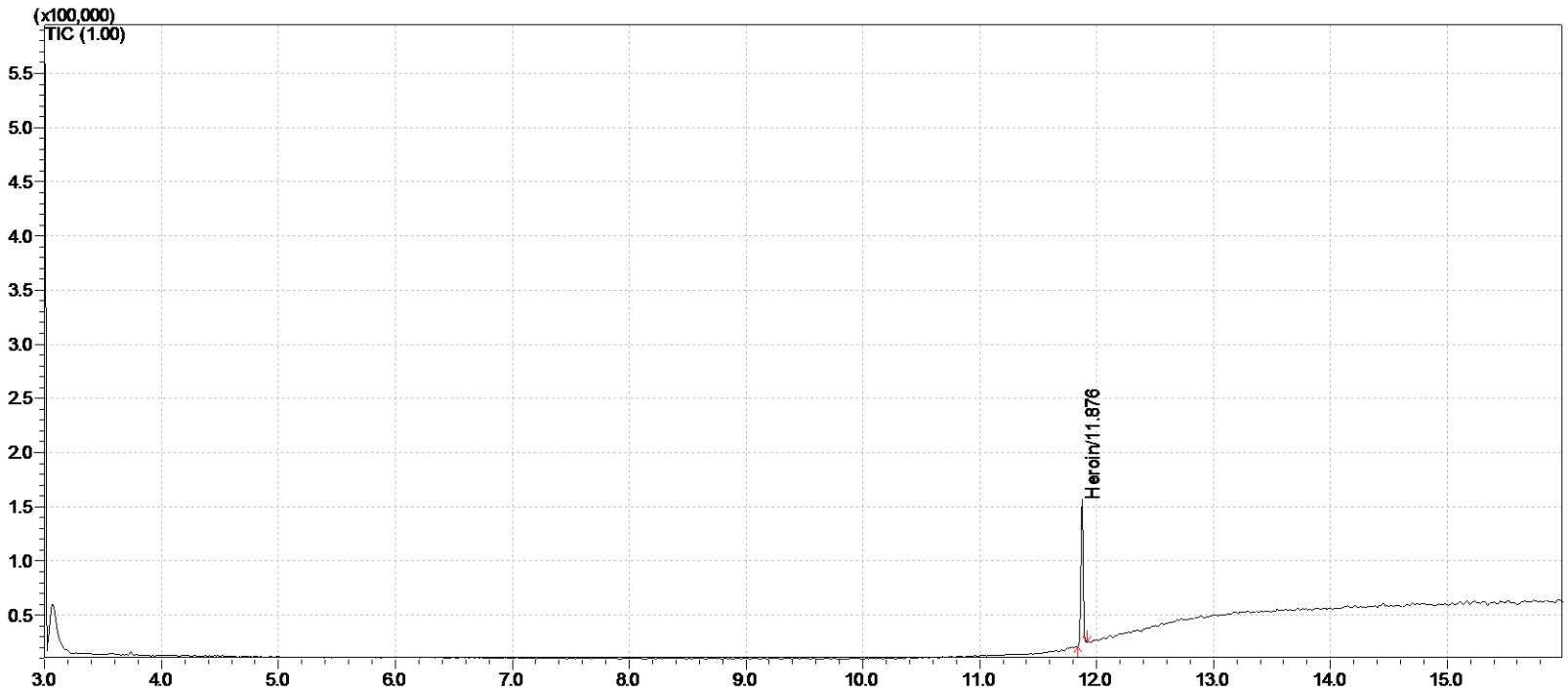


Figura 95. Cromatograma de la heroína a 80 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

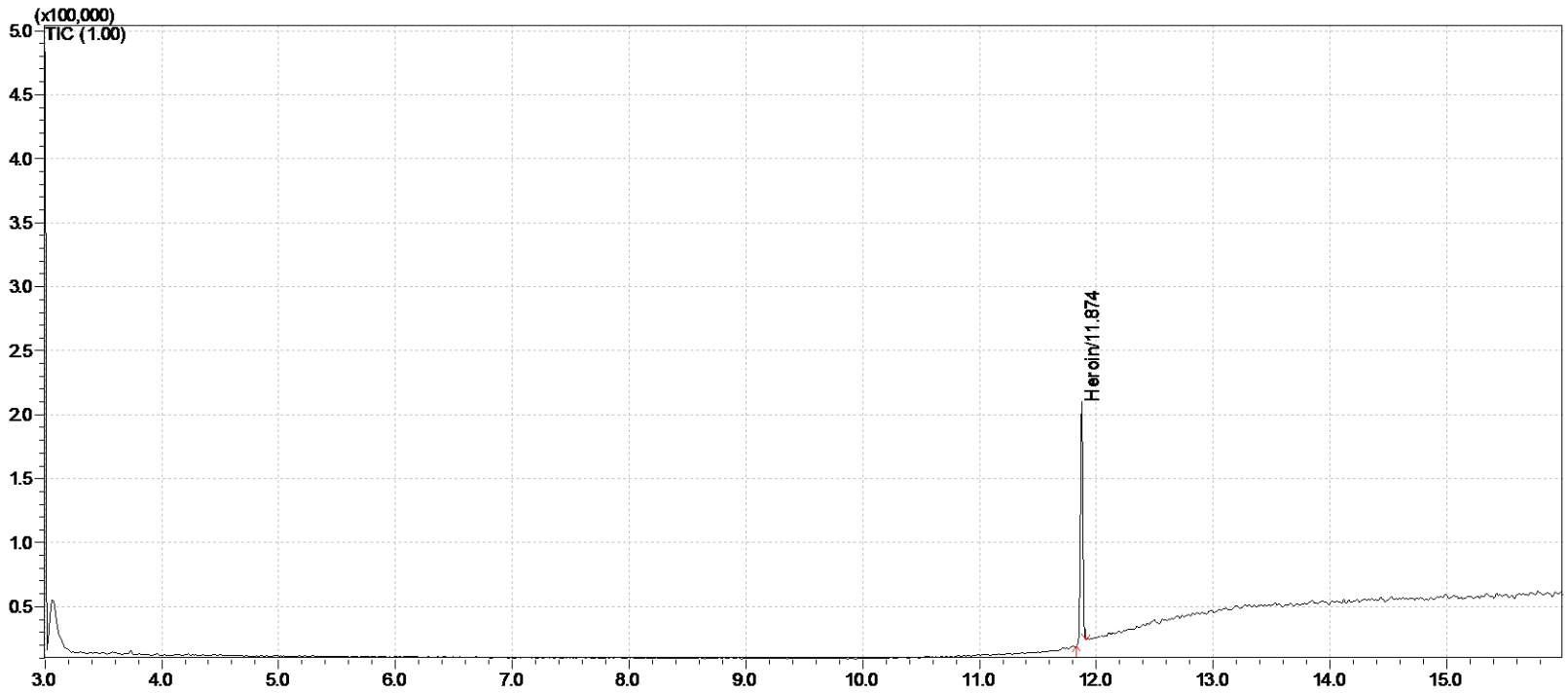


Figura 96. Cromatograma de la heroína a 100 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

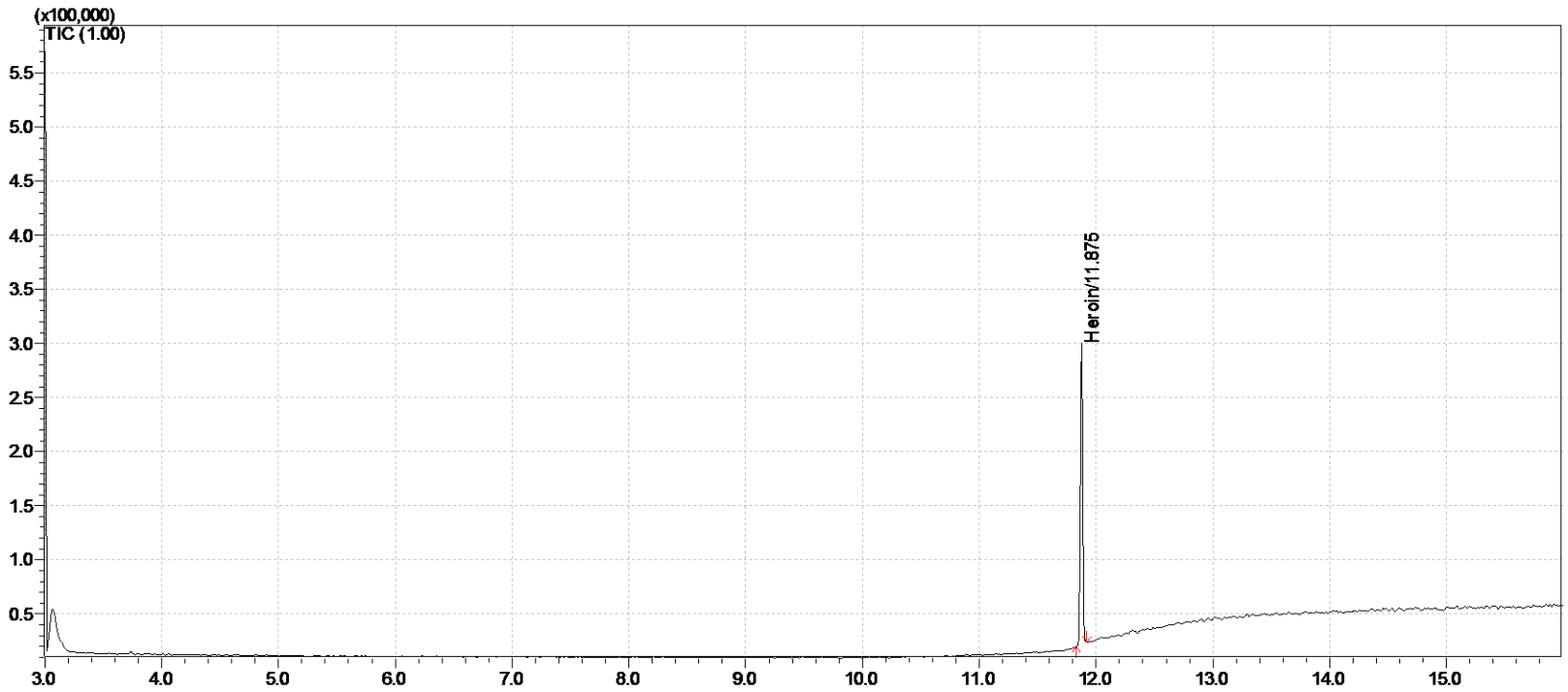


Figura 97. Cromatograma de la heroína a 150 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

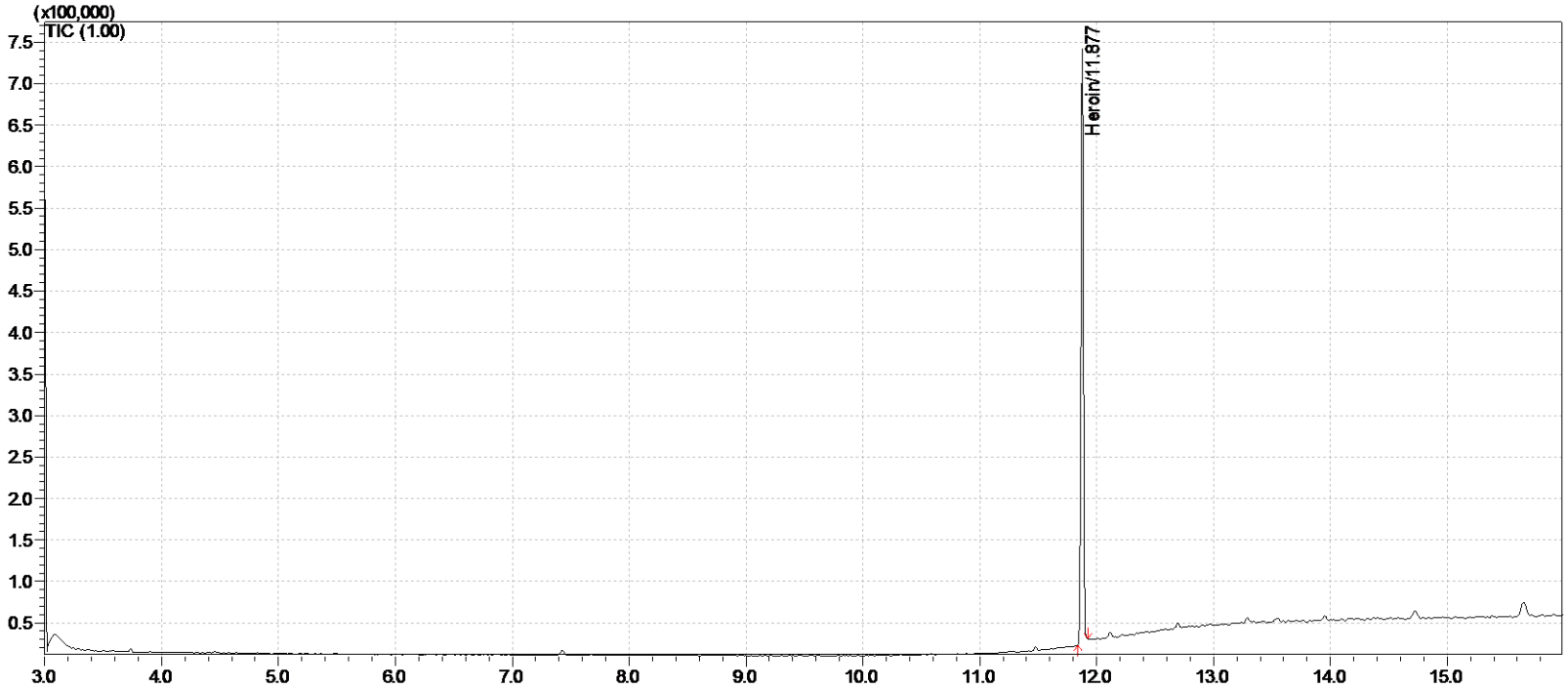


Figura 98. Cromatograma de la heroína a 300 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

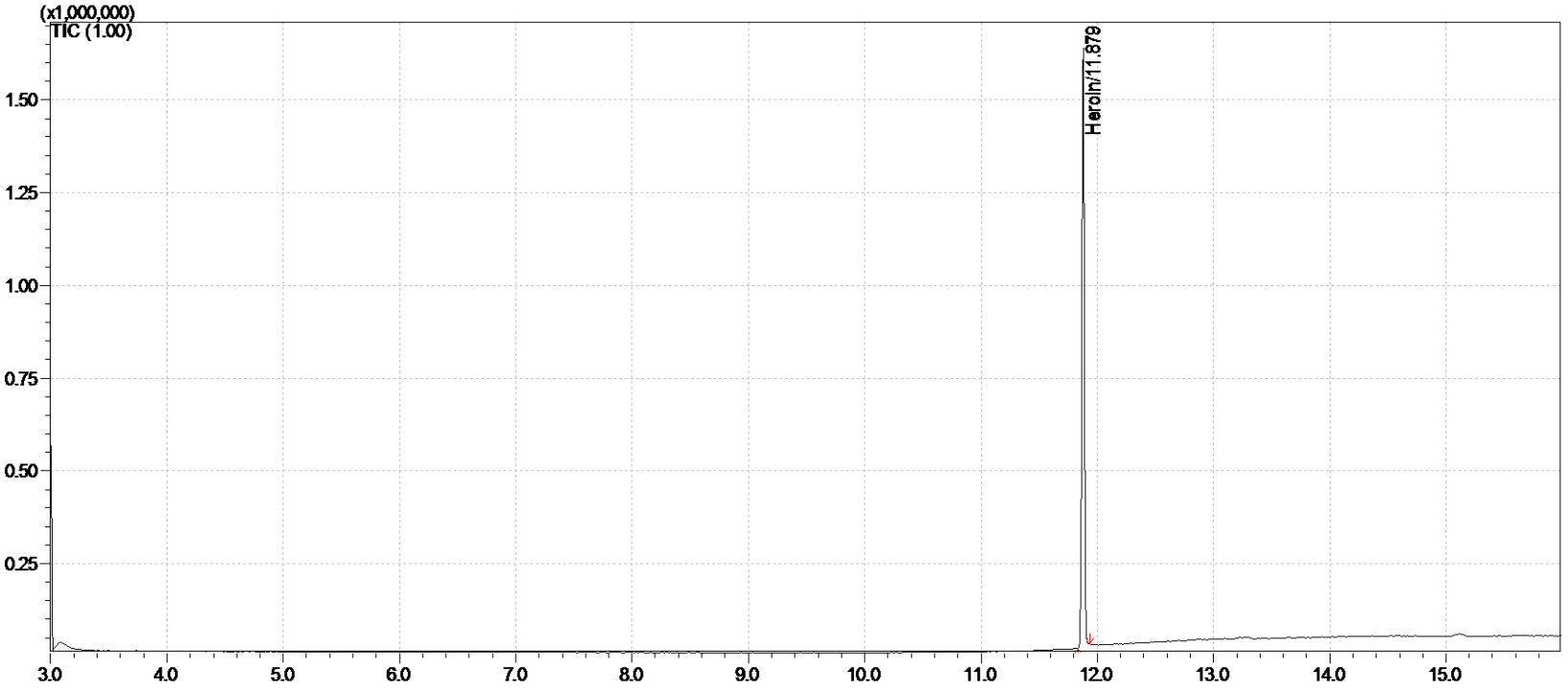


Figura 99. Cromatograma de la heroína a 600 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

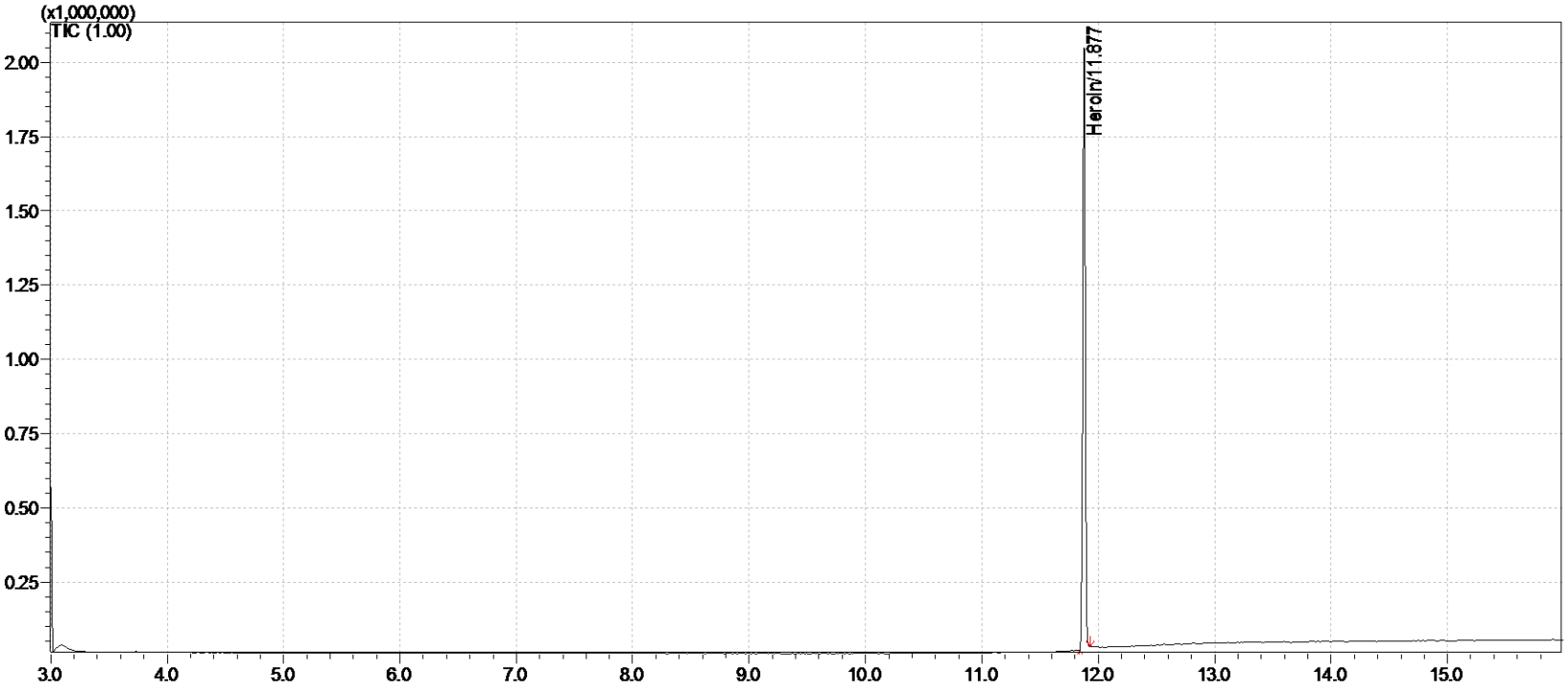


Figura 100. Cromatograma de la heroína a 700 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

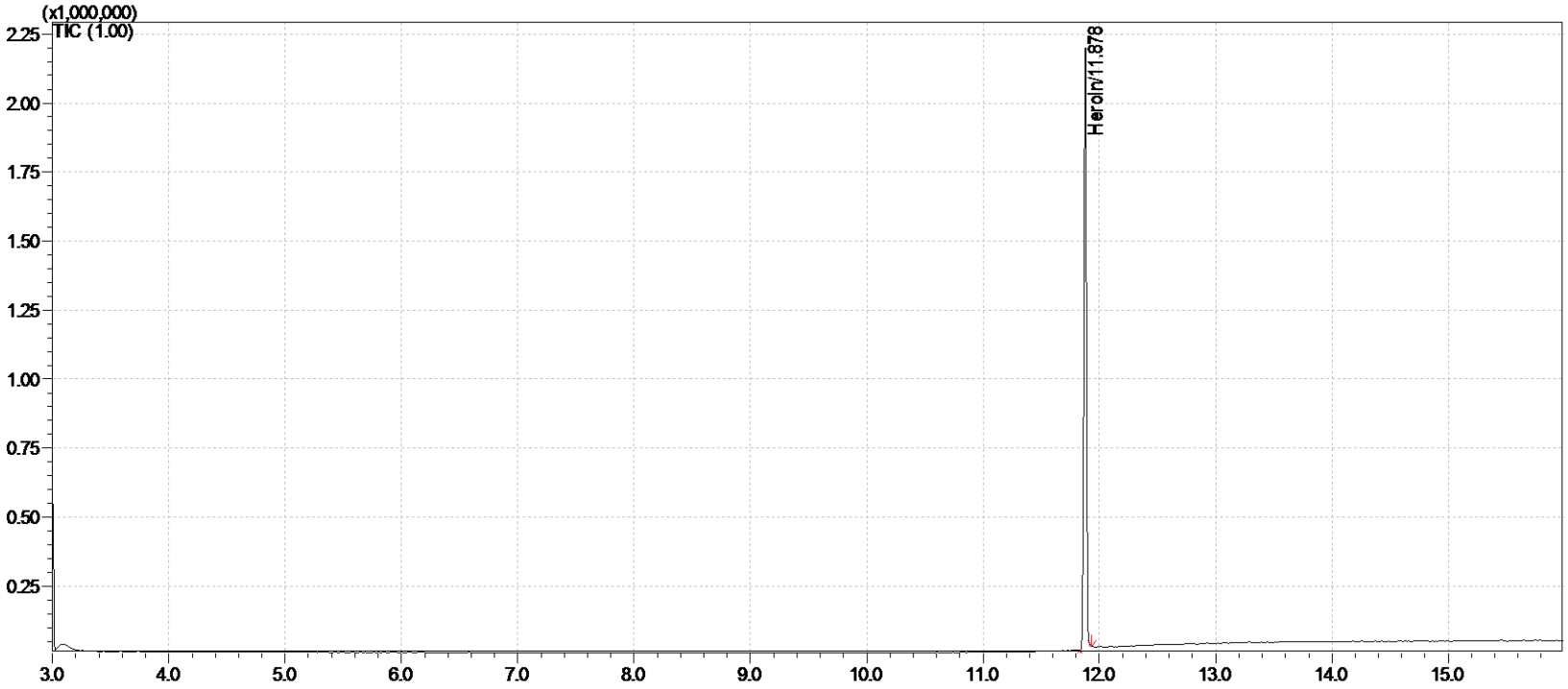


Figura 101. Cromatograma de la heroína a 750 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

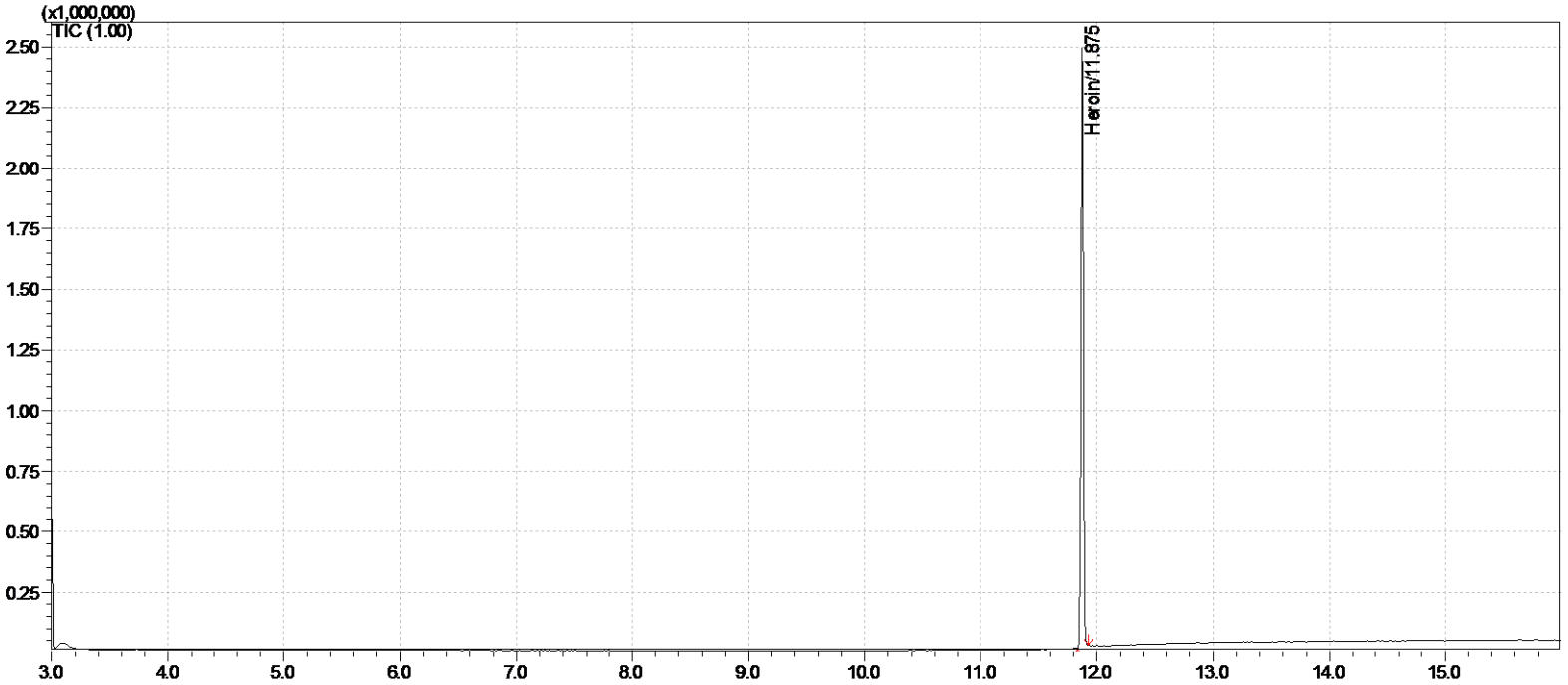


Figura 102. Cromatograma de la heroína a 800 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

ANEXO 11. Datos de variables de respuesta para el número de platos teóricos simetría, resolución y tiempo de retención para cocaína y heroína.

Tabla 48. Variables de respuesta para el número de platos teóricos simetría, resolución y tiempo de retención para cocaína

PLATOS TEORICOS								
ENSAYOS / REPLICAS	1	2	3	4	5	6	7	8
1	242051	198130	192871	220293	204001	182485	169249	208685
2	241910	208644	195966	217093	199144	182849	177952	198077
3	226920	206838	196045	217994	206070	175198	179022	202167
Promedio	**236960**	**204537**	**194961**	**218460**	**203072**	**180177**	**175408**	**202976**
	s	t	u	v	W	x	y	z
SIMETRÍA								
ENSAYOS / REPLICAS	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,986	0,969	0,955	0,967	0,970	0,878	0,892	0,967
2	1,020	0,937	0,950	1,001	0,969	0,895	0,897	0,964
3	0,990	0,949	0,953	0,983	0,965	0,891	0,895	0,964
Promedio	**0,999**	**0,952**	**0,953**	**0,984**	**0,968**	**0,888**	**0,895**	**0,965**
	s	t	u	v	w	x	y	z
RESOLUCIÓN								
ENSAYOS / REPLICAS	1	2	3	4	5	6	7	8
1	35,000	32,384	31,638	33,771	32,313	10,792	10,724	32,554
2	34,900	32,273	31,734	33,593	32,512	10,836	10,516	32,445
3	33,900	32,411	31,651	33,583	32,640	10,763	10,674	32,394
Promedio	**34,600**	**32,356**	**31,674**	**33,649**	**32,488**	**10,797**	**10,638**	**32,464**
	s	t	u	v	w	x	y	z
TIEMPO DE RETENCIÓN								
ENSAYOS / REPLICAS	1	2	3	4	5	6	7	8
1	7,434	7,423	7,432	7,425	7,430	7,438	7,431	7,420
2	7,432	7,423	7,432	7,423	7,429	7,436	7,429	7,422
3	7,434	7,423	7,434	7,426	7,428	7,436	7,430	7,422
Promedio	**7,433**	**7,423**	**7,433**	**7,425**	**7,429**	**7,437**	**7,430**	**7,421**
	s	t	u	v	w	x	y	z

Fuente: Realizado por el autor.

Tabla 49. Variables de respuesta para el número de platos teóricos simetría, resolución y tiempo de retención para heroína.

	PLATOS TEORICOS							
ENSAYOS / REPLICAS	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1180095	791165	791542	1107414	952910	494049	526975	957870
2	1175262	823174	826861	1135927	940857	515770	564303	918811
3	1115270	798766	799886	1122953	917428	497415	585565	953445
Promedio	**1156876**	**804368**	**806096**	**1122098**	**937065**	**502411**	**558948**	**943375**
	s	t	u	v	w	x	y	z
	SIMETRÍA							
ENSAYOS / REPLICAS	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,979	0,933	0,938	0,993	0,957	0,875	0,867	0,935
2	0,997	0,926	0,948	0,988	0,948	0,881	0,876	0,957
3	1,001	0,926	0,951	0,985	0,960	0,874	0,873	0,943
Promedio	**0,992**	**0,928**	**0,946**	**0,989**	**0,955**	**0,877**	**0,872**	**0,945**
	s	t	u	v	w	x	y	z
	RESOLUCIÓN							
ENSAYOS / REPLICAS	1	2	3	4	5	6	7	8
1	25,354	22,857	23,119	25,860	24,800	19,298	19,599	24,402
2	25,631	23,004	23,097	26,032	24,249	19,173	20,097	24,165
3	25,756	22,930	23,075	25,834	24,124	19,123	19,907	24,647
Promedio	**25,580**	**22,930**	**23,097**	**25,909**	**24,391**	**19,198**	**19,868**	**24,405**
	s	t	u	v	w	x	y	z
	TIEMPO DE RETENCIÓN							
ENSAYOS / REPLICAS	1	2	3	4	5	6	7	8
1	11,884	11,885	11,888	11,878	11,882	11,895	11,895	11,885
2	11,883	11,885	11,886	11,879	11,882	11,895	11,894	11,885
3	11,883	11,885	11,887	11,878	11,883	11,896	11,894	11,886
Promedio	**11,883**	**11,885**	**11,887**	**11,878**	**11,882**	**11,895**	**11,894**	**11,885**
	s	t	u	v	w	x	y	z

Fuente: Realizado por el autor.

Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz

ANEXO 12. Comatograma de los ensayos de robustez realizados a la cocaína y heroína.

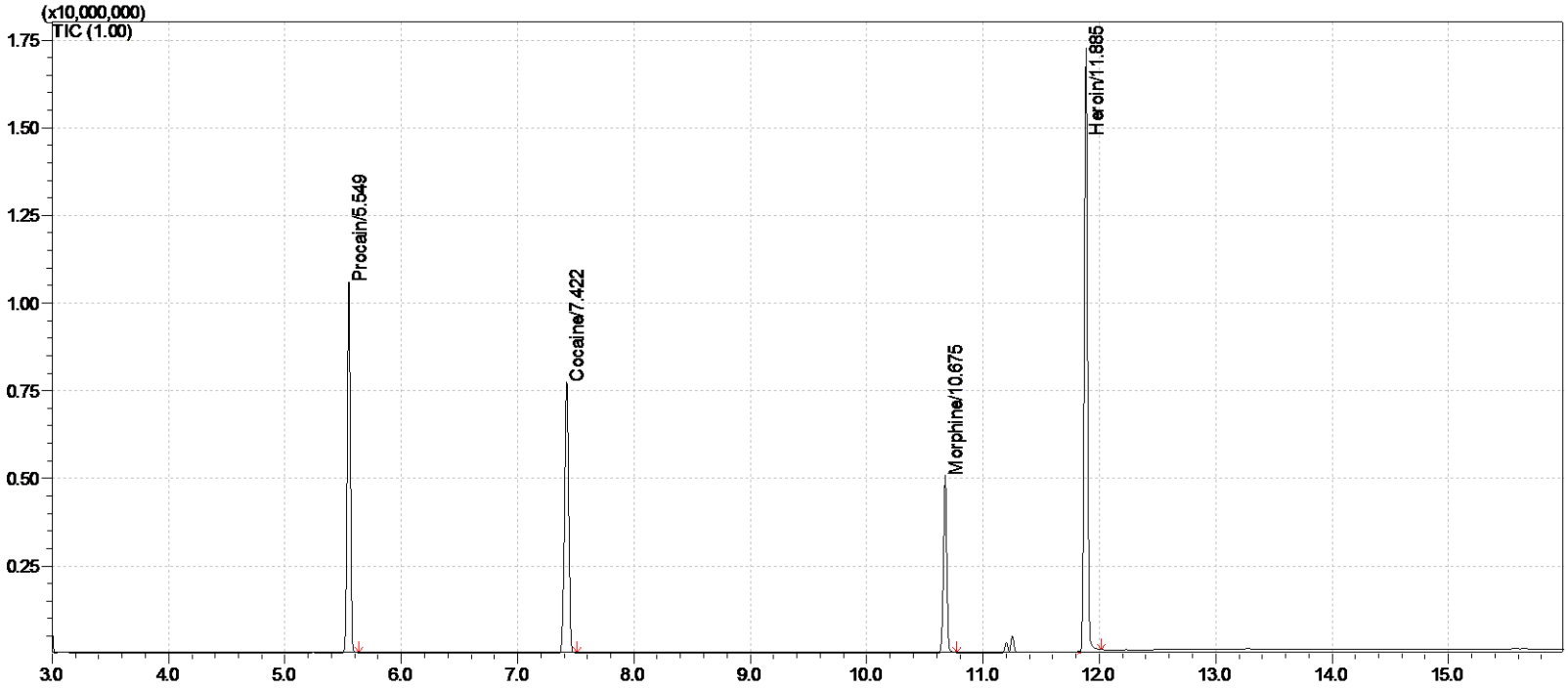


Figura 103. Cromatograma del ensayo 2 para el análisis de robustez de la cocaína y heroína.

Fuente: Realizado por el Autor.

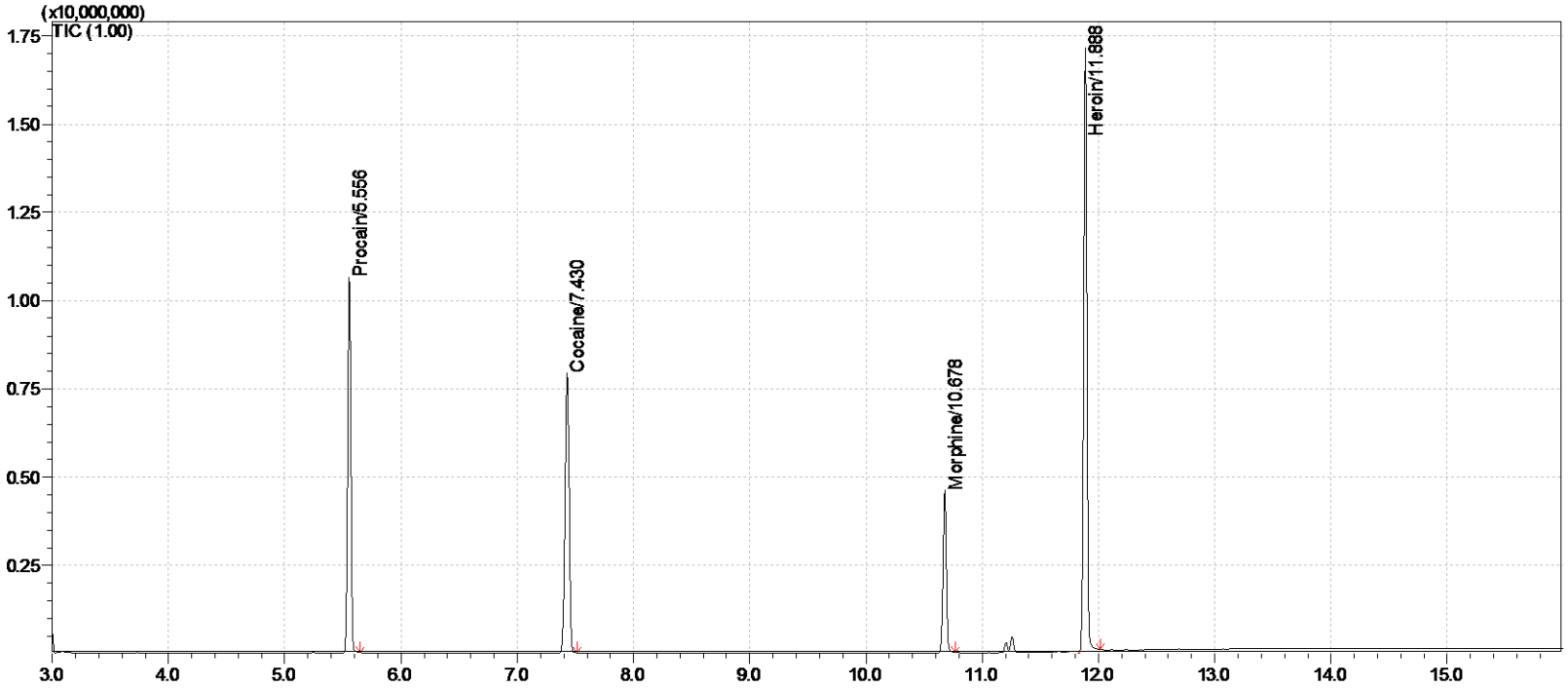


Figura 104. Cromatograma del ensayo 3 para el análisis de robustez de la cocaína y heroína.

Fuente: Realizado por el Autor.

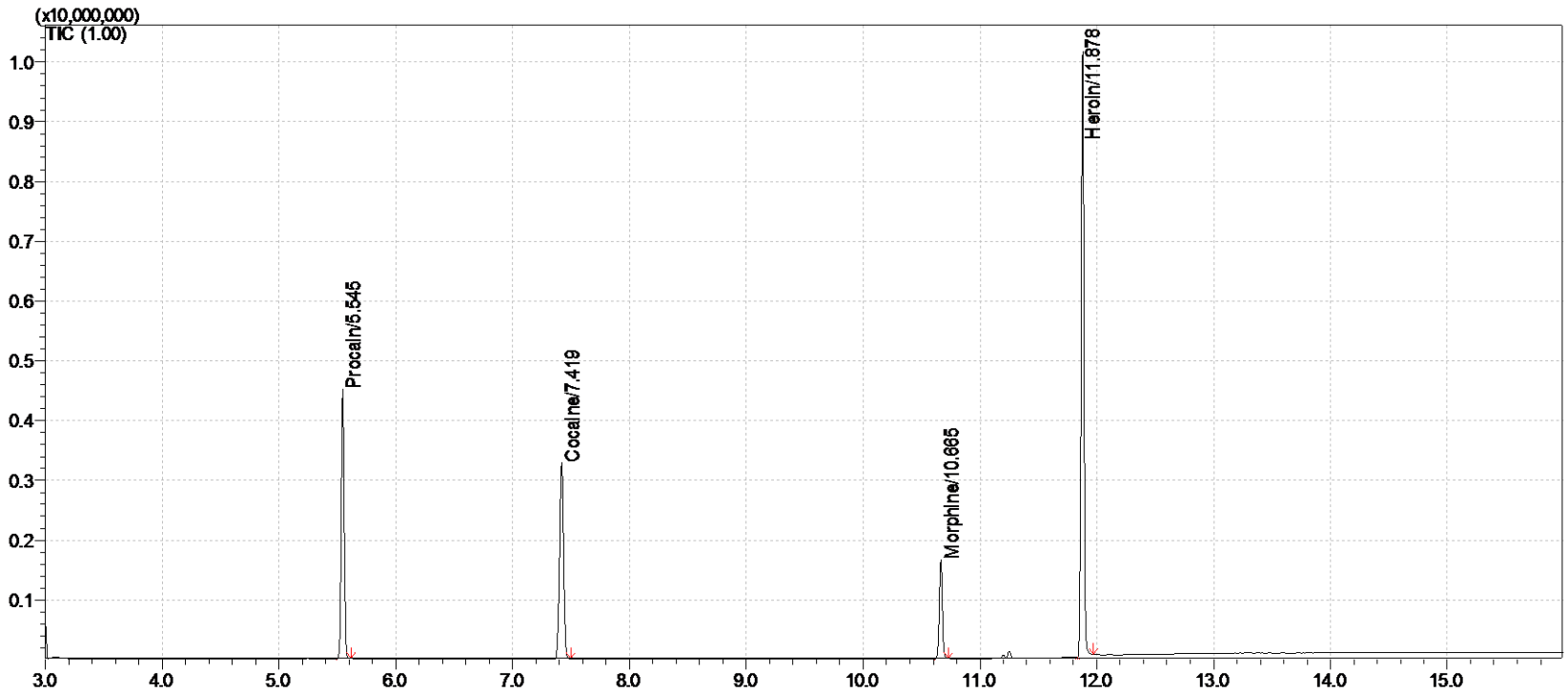


Figura 105. Cromatograma del ensayo 4 para el análisis de robustez de la cocaína y heroína.

Fuente: Realizado por el Autor.

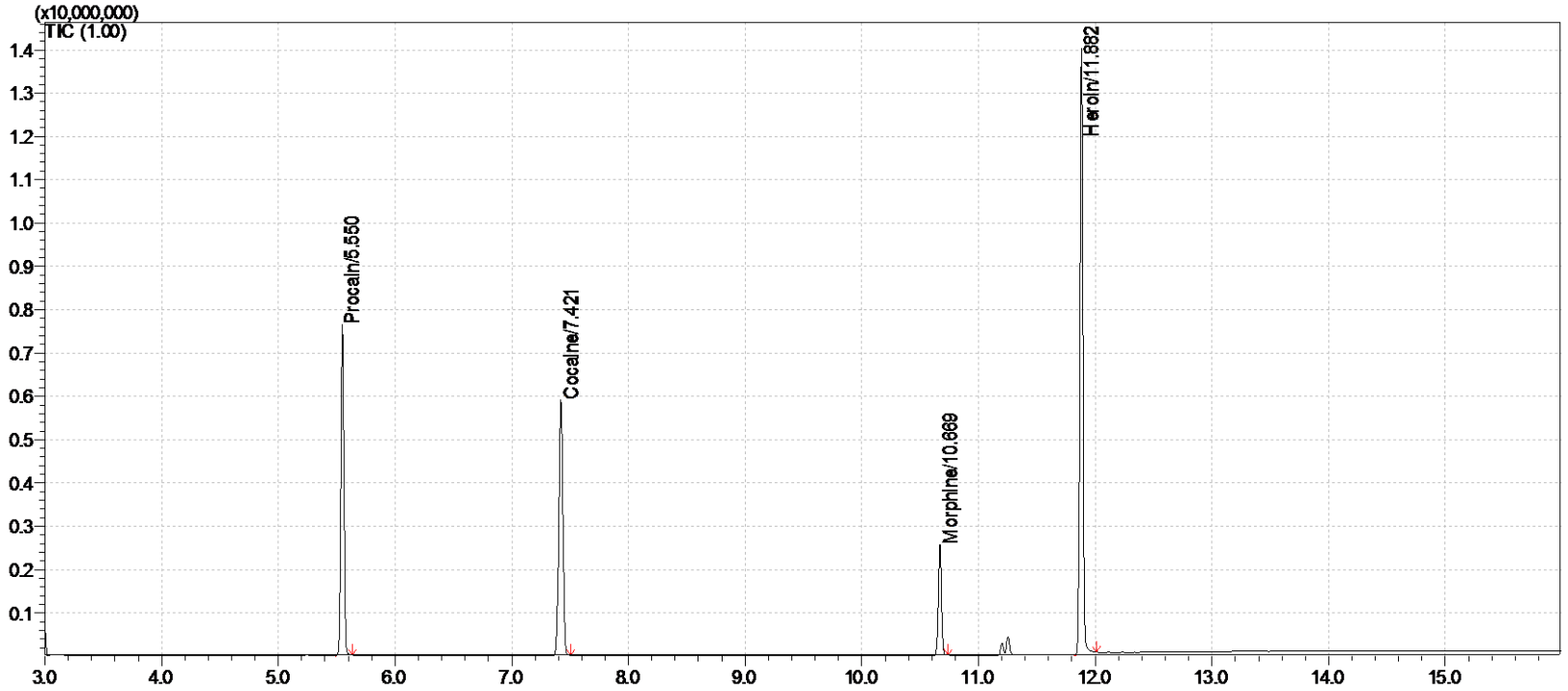


Figura 106. Cromatograma del ensayo 5 para el análisis de robustez de la cocaína y heroína.

Fuente: Realizado por el Autor.

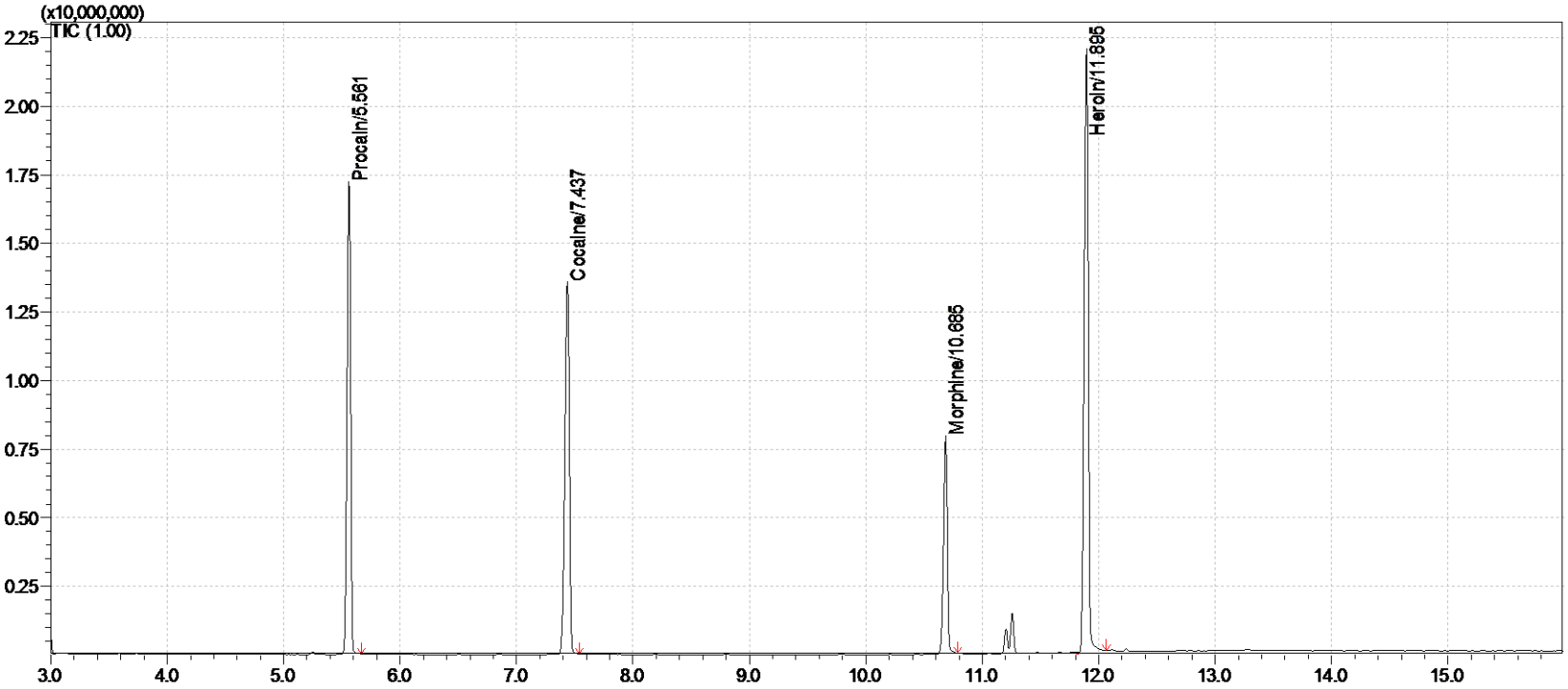


Figura 107. Cromatograma del ensayo 6 para el análisis de robustez de la cocaína y heroína.

Fuente: Realizado por el Autor.

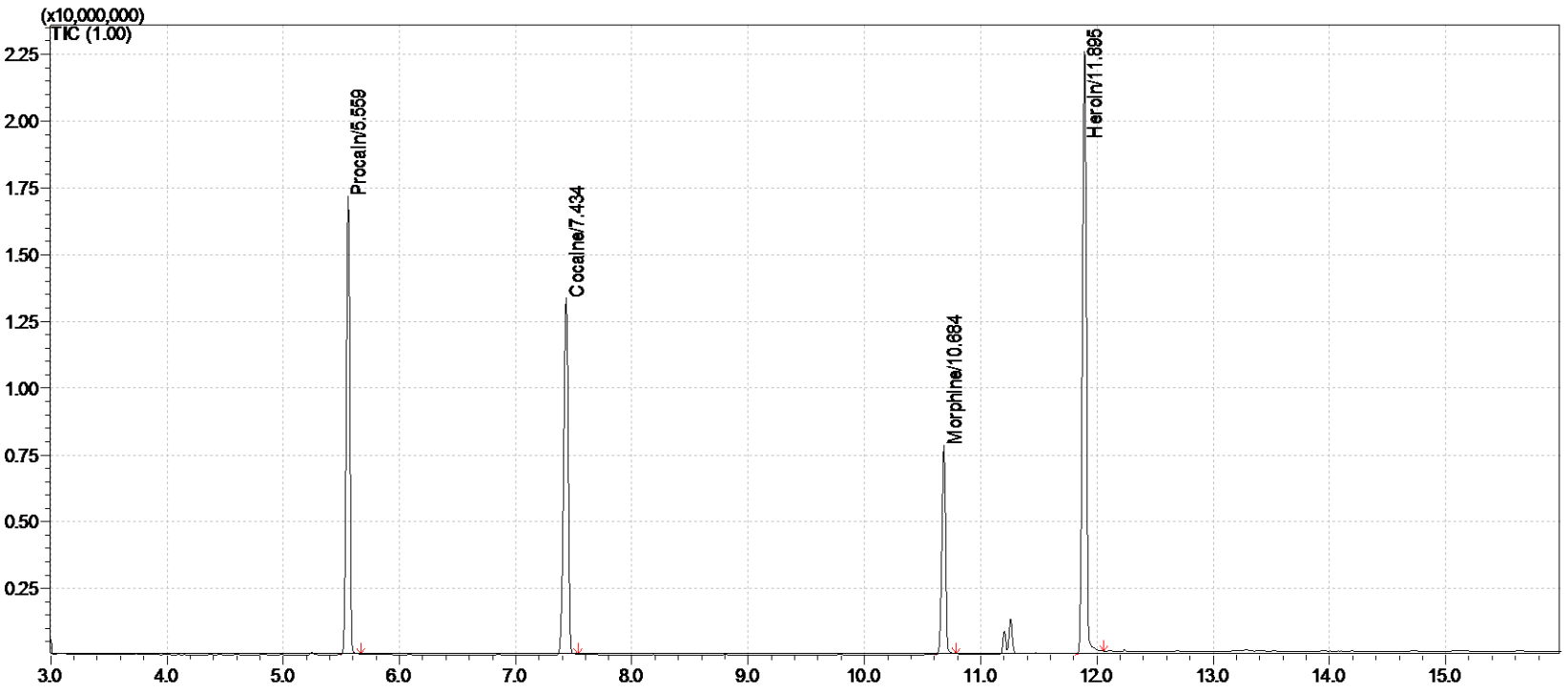


Figura 108. Cromatograma del ensayo 7 para el análisis de robustez de la cocaína y heroína.

Fuente: Realizado por el Autor.

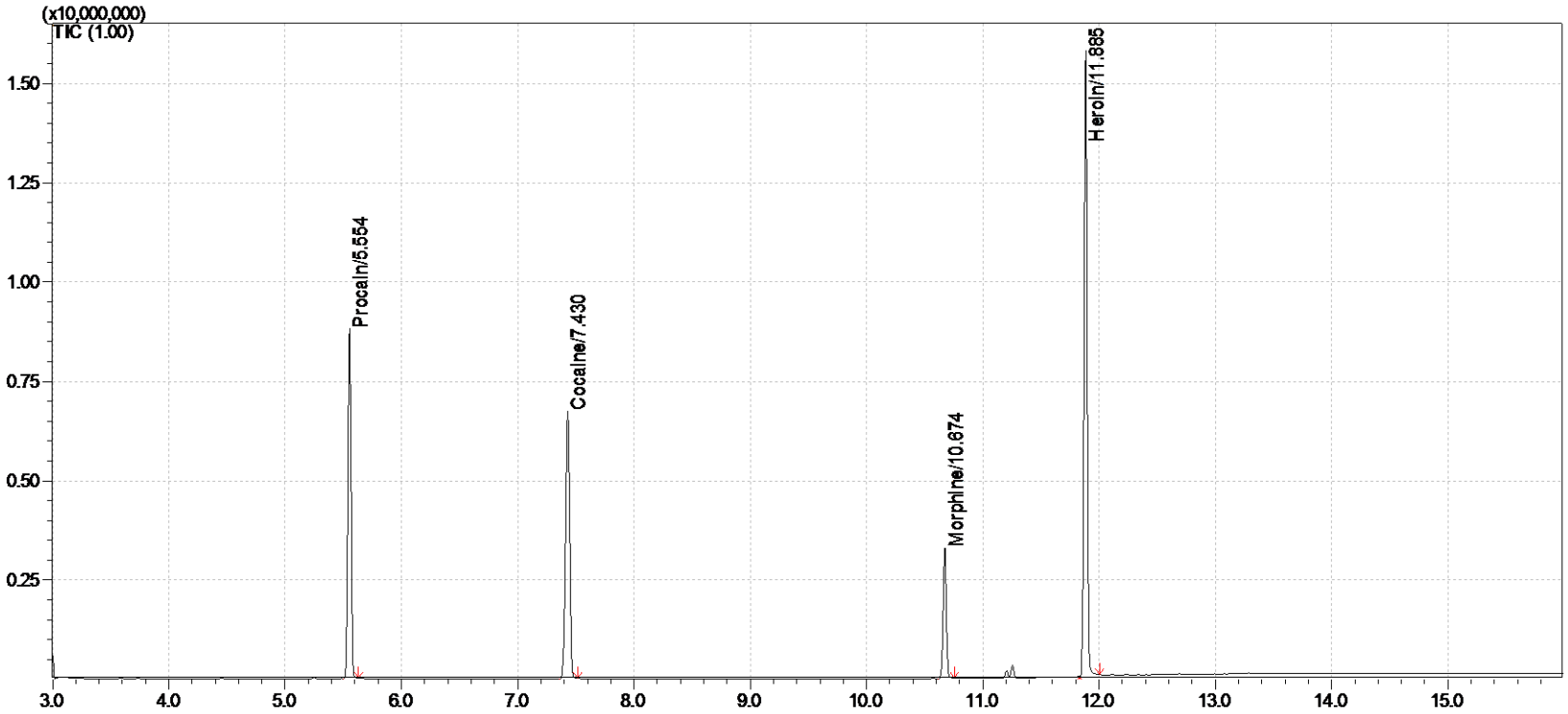


Figura 109. Cromatograma del ensayo 8 para el análisis de robustez de la cocaína y heroína.

Fuente: Realizado por el Autor.

ANEXO 13. Comatograma para la determinación de estabilidad de la cocaína y heroína.

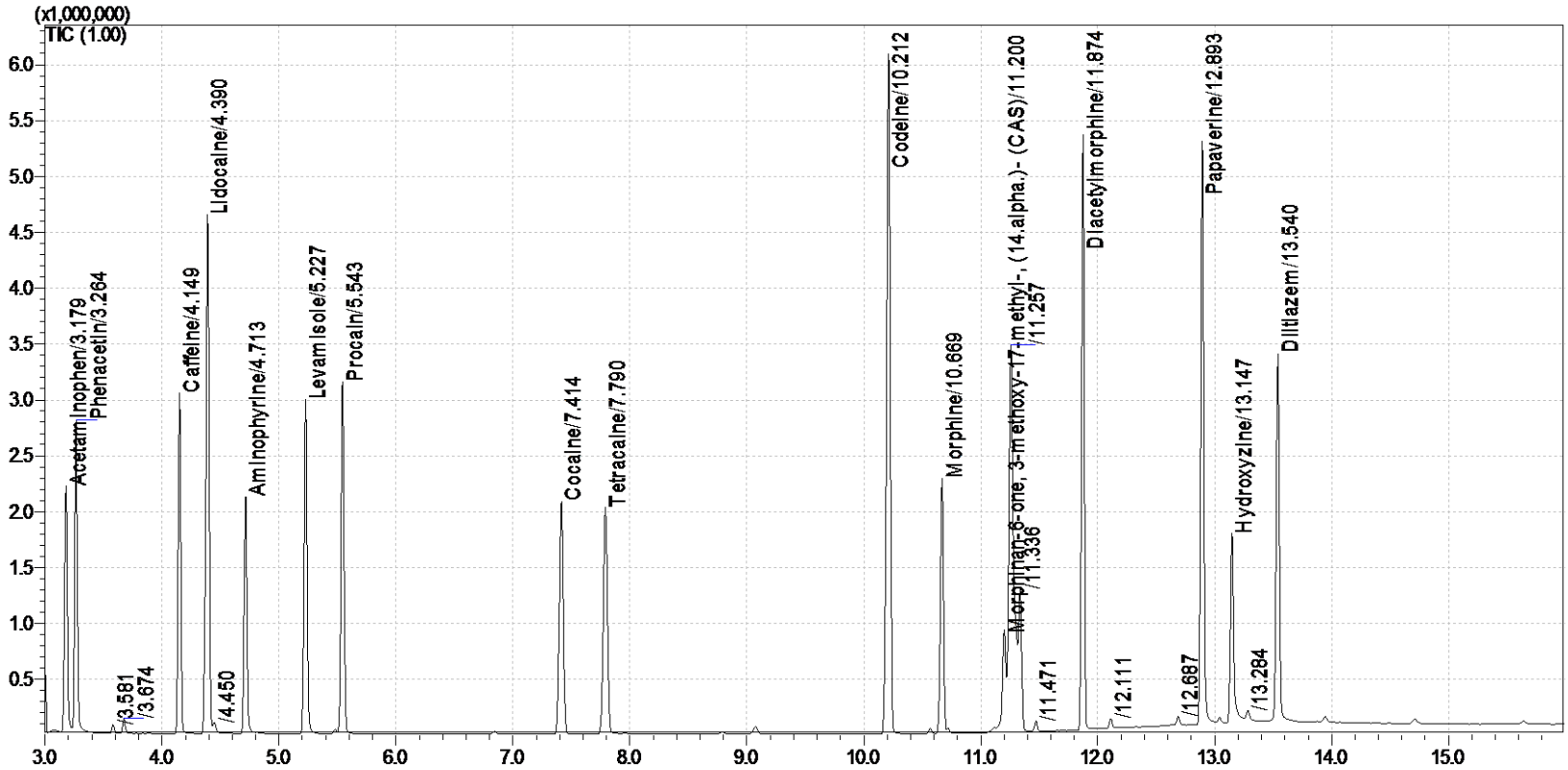


Figura 110. Cromatograma realizado el 2017-11-20 para el análisis de estabilidad de la cocaína y heroína.

Fuente: Realizado por el Autor.

ANEXO 14. Cromatogramas de las soluciones de Δ9-THC preparadas a diferentes concentraciones.

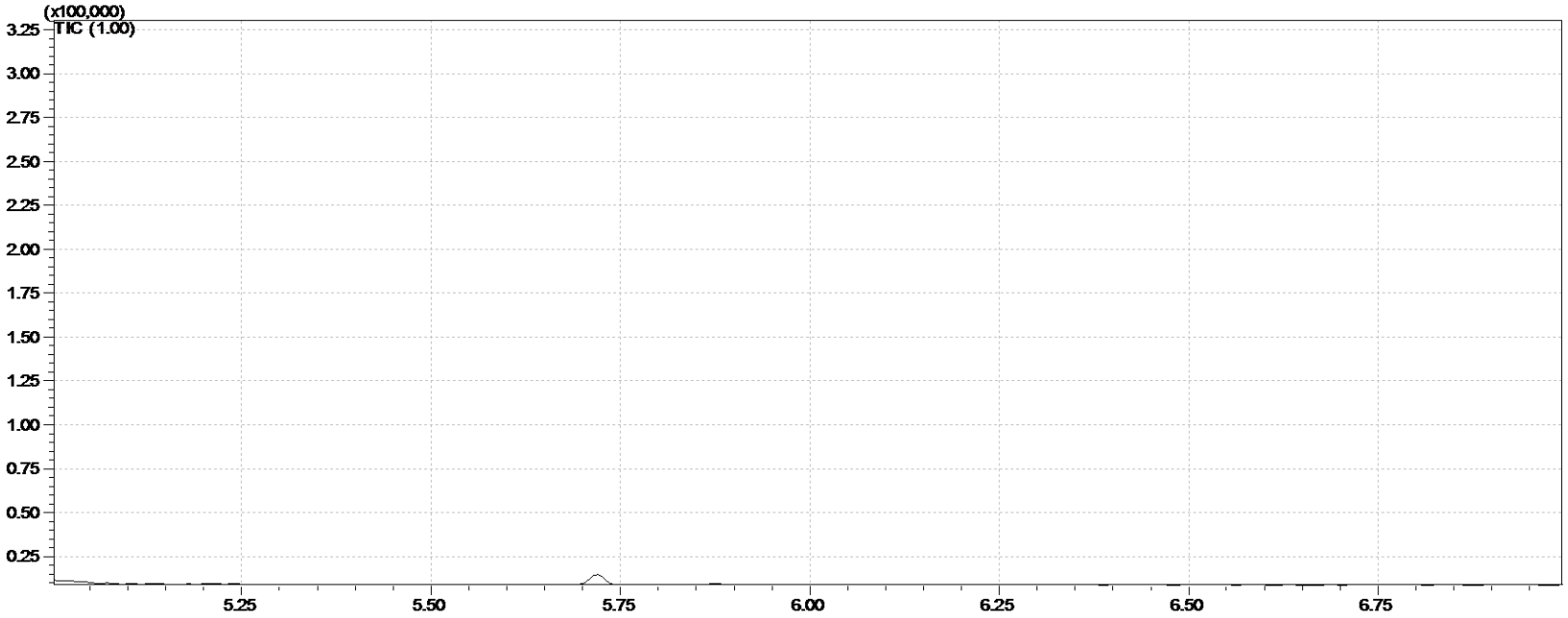


Figura 111. Cromatograma del Δ9-THC a 10 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz

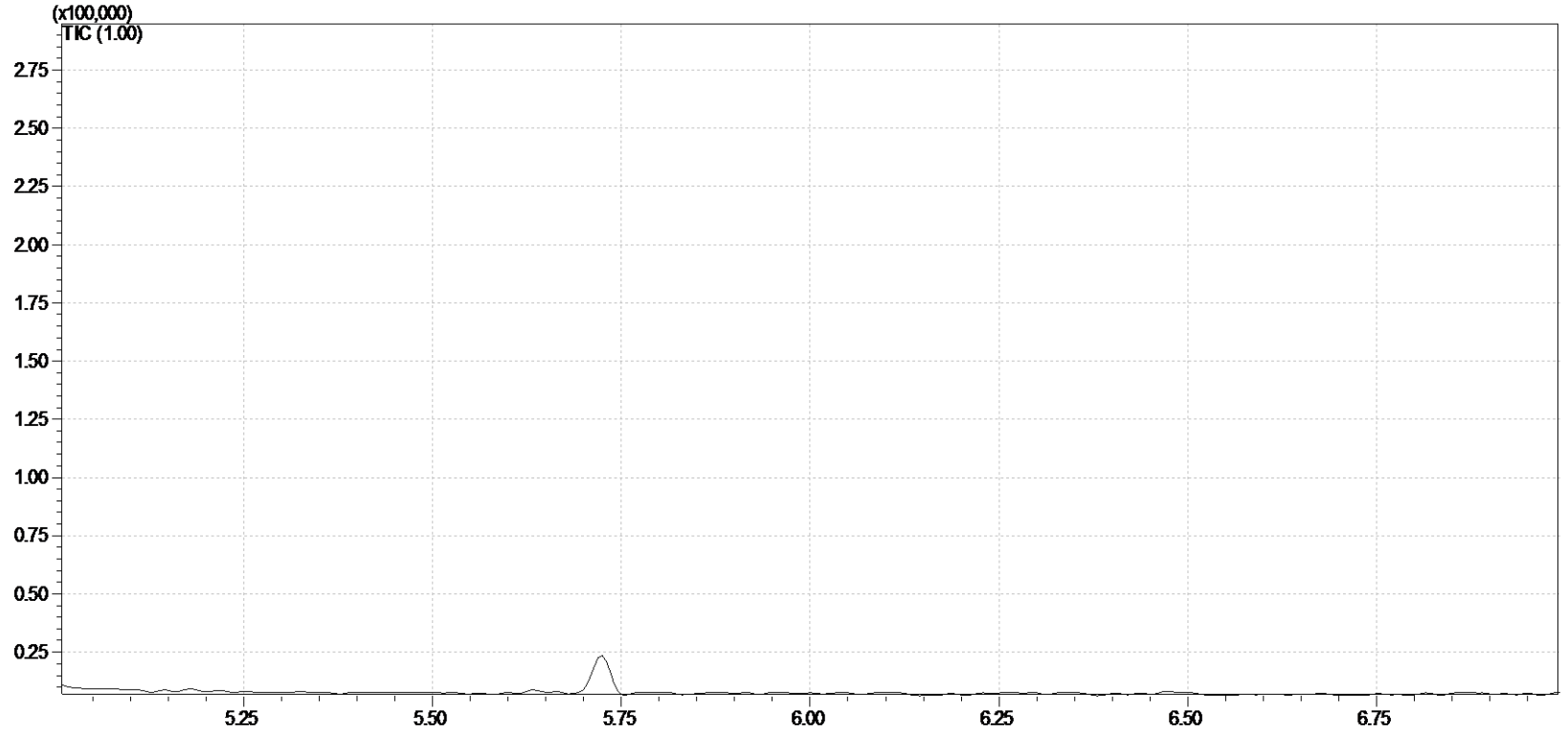


Figura 112. Cromatograma del Δ9-THC a 20 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

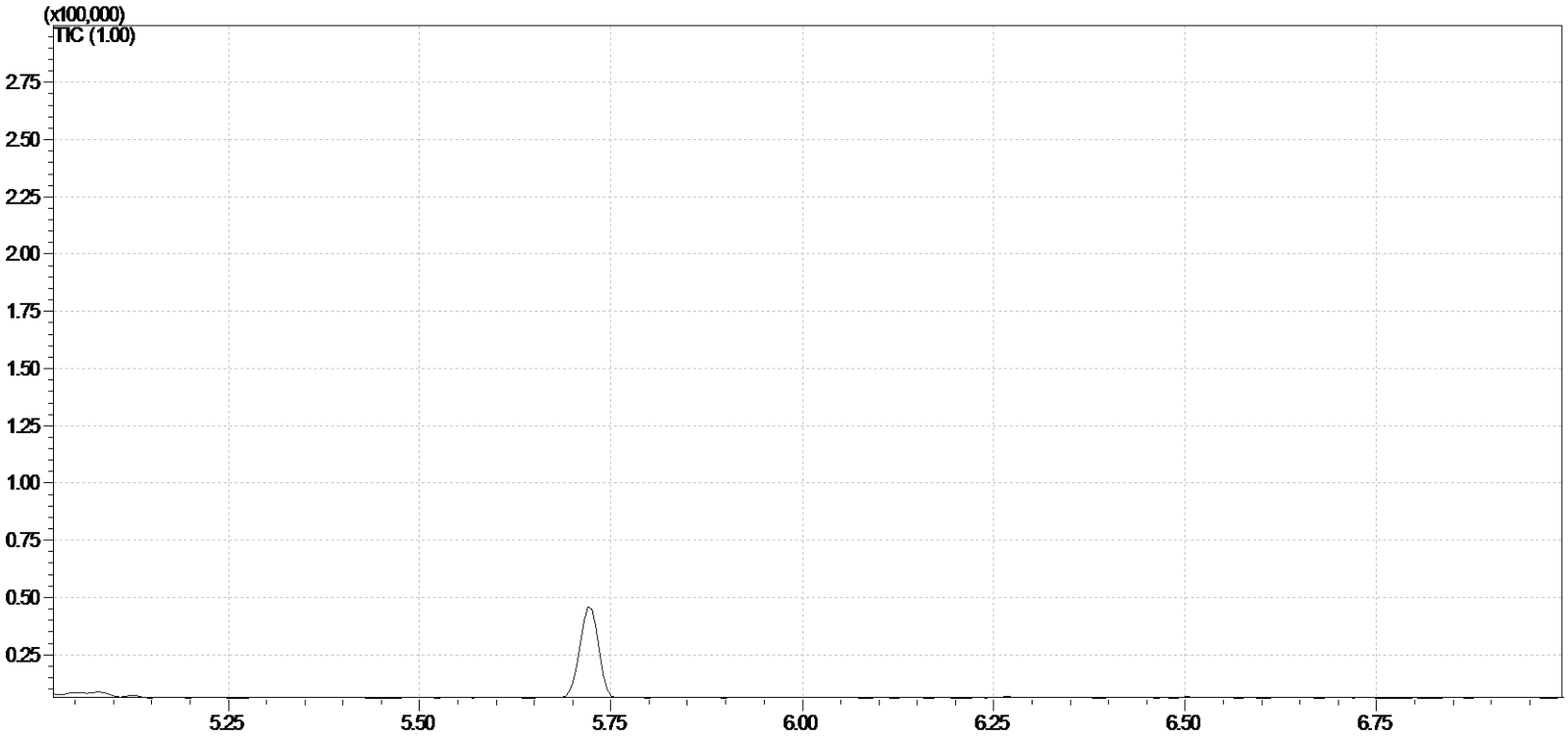


Figura 113. Cromatograma del Δ9-THC a 40 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

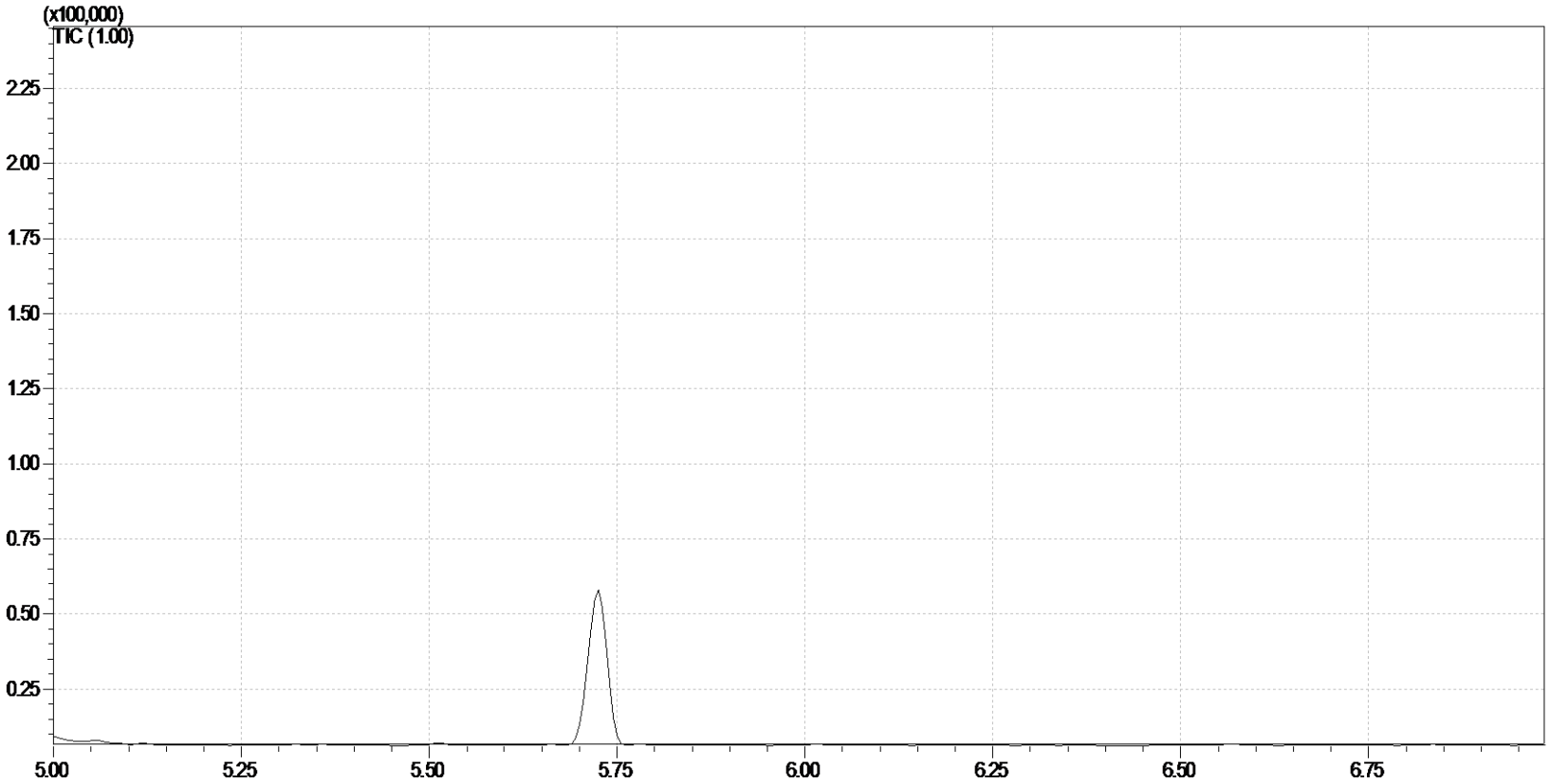


Figura 114. Cromatograma del Δ9-THC a 50 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

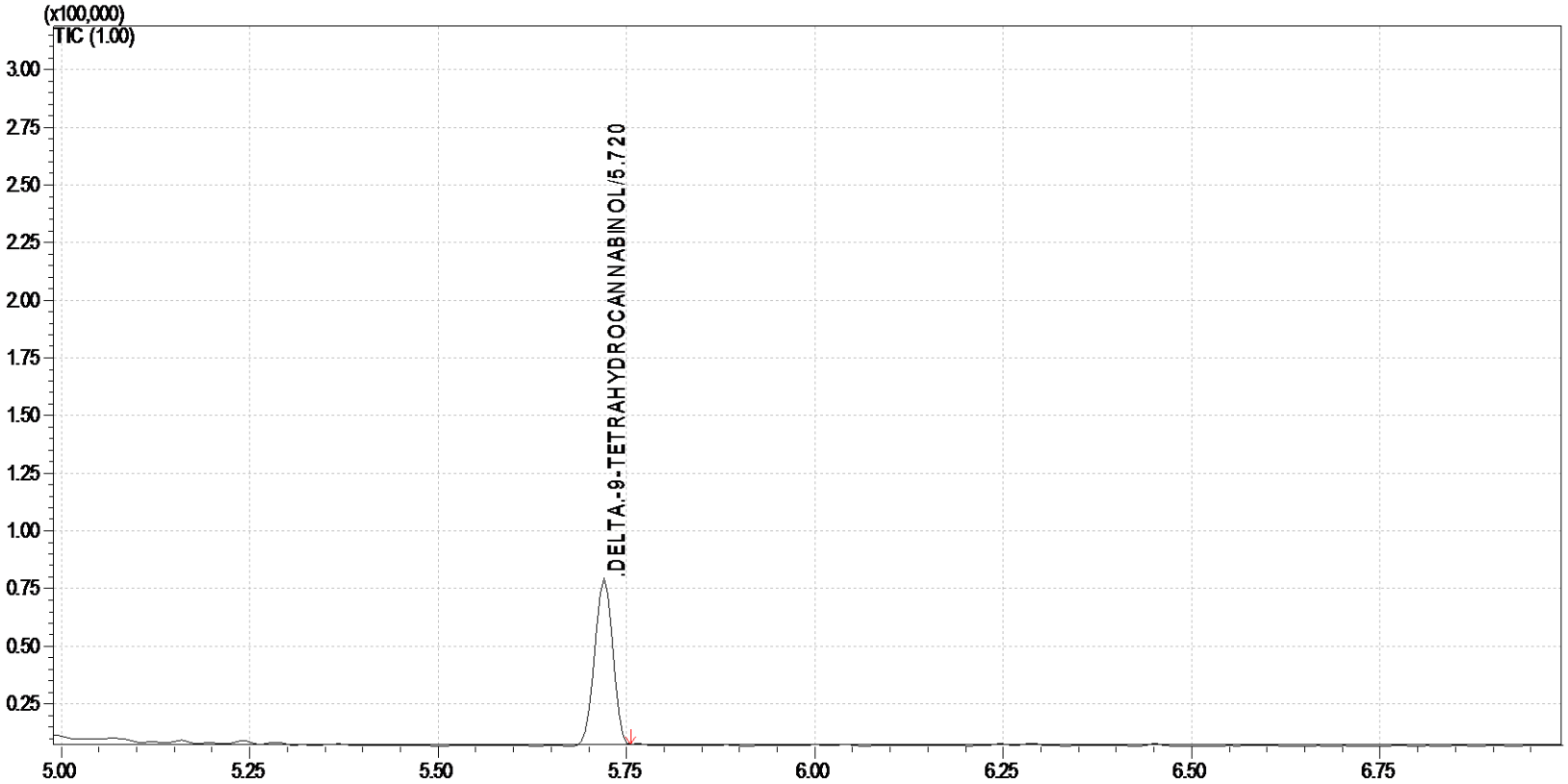


Figura 115. Cromatograma del Δ9-THC a 60 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

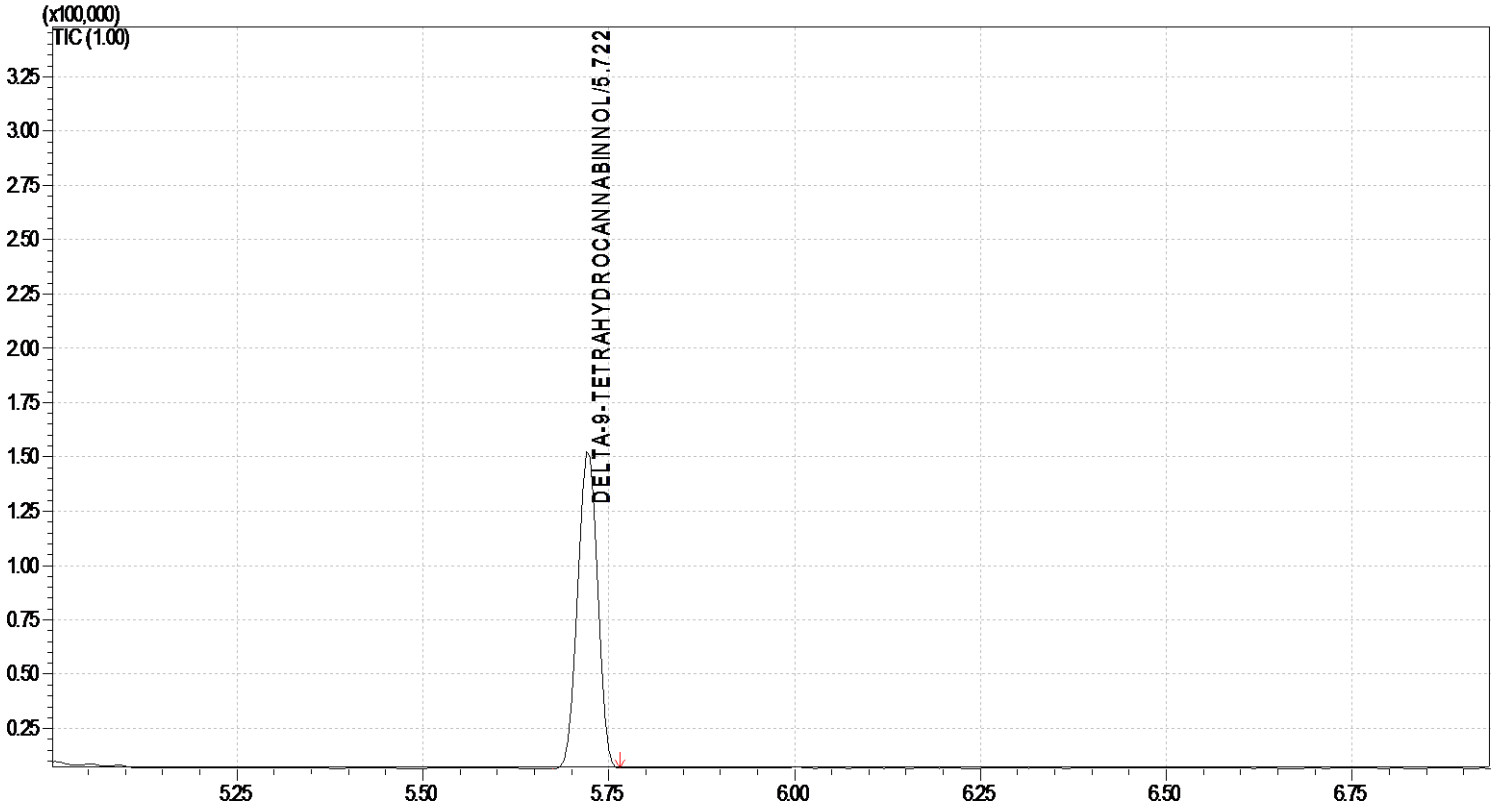


Figura 116. Cromatograma del Δ9-THC a 100 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

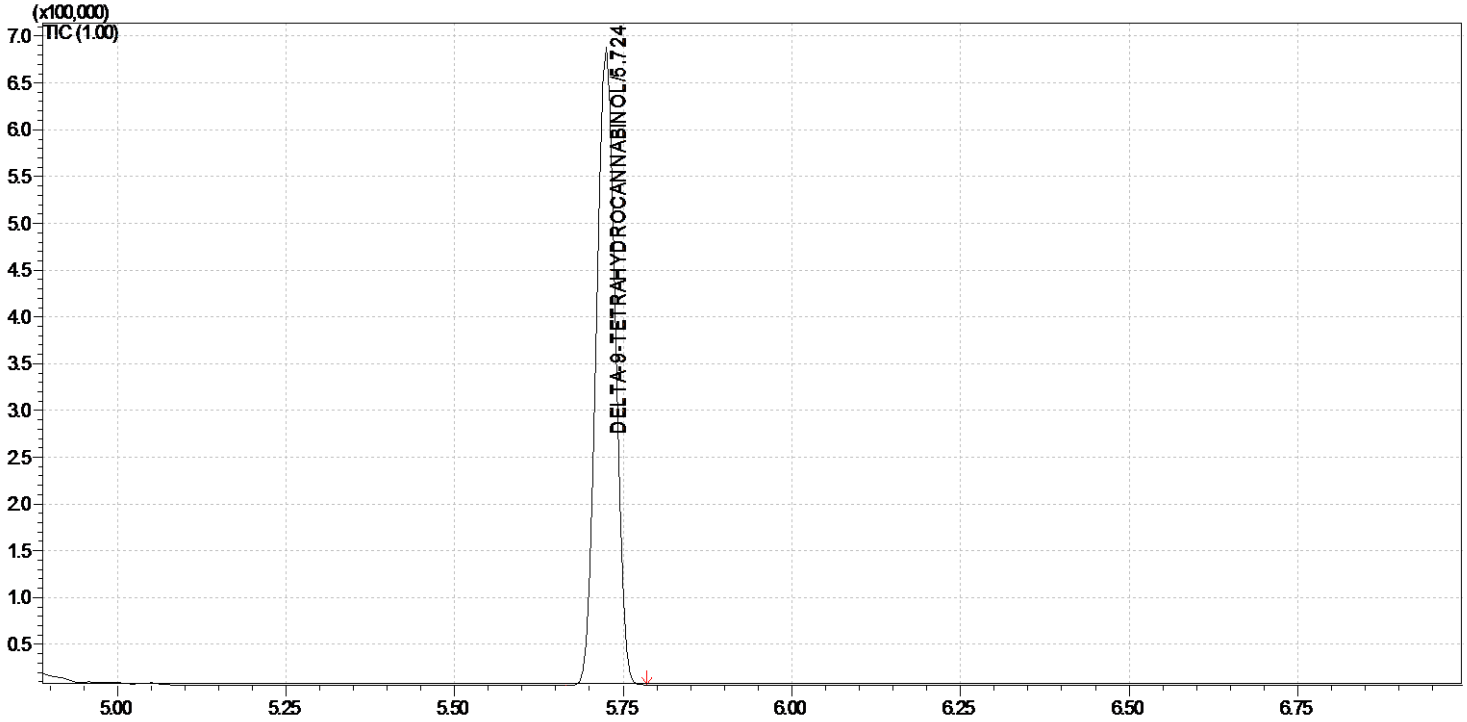


Figura 117. Cromatograma del Δ9-THC a 300 mg/L.

Fuente: Realizado por el Autor.

ANEXO 15. Datos de variables de respuesta para el número de platos teóricos simetría, resolución y tiempo de retención para el Δ9-THC.

Tabla 50. Variables de respuesta para el número de platos teóricos simetría, resolución y tiempo de retención para Δ9-THC.

	PLATOS TEORICOS							
ENSAYOS / REPLICAS	1	2	3	4	5	6	7	8
1	194024	173805	171911	189938	172327	160742	158606	168432
2	192056	175570	171519	195446	167665	159437	157699	171317
3	181725	169514	174504	186448	165420	154440	153439	152614
Promedio	**189268**	**172963**	**172645**	**190611**	**168471**	**158206**	**156581**	**164121**
	s	t	u	v	w	x	y	z
	SIMETRÍA							
ENSAYOS / REPLICAS	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1,015	1,007	1,045	1,04	1,059	1,041	1,012	1,013
2	1,017	1,011	1,041	1,055	1,043	1,025	1,004	0,998
3	1,021	1,016	1,065	1,028	1,037	1,037	0,986	0,989
Promedio	**1,018**	**1,011**	**1,050**	**1,041**	**1,046**	**1,034**	**1,001**	**1,000**
	s	t	u	v	w	x	y	z
	RESOLUCIÓN							
ENSAYOS / REPLICAS	1	2	3	4	5	6	7	8
1	15,893	15,159	15,213	15,818	14,929	14,521	14,487	14,978
2	15,569	15,099	15,138	15,814	14,885	14,384	14,353	15,104
3	15,492	15,084	15,106	15,637	14,812	14,384	14,237	15,105
Promedio	**15,651**	**15,114**	**15,152**	**15,756**	**14,875**	**14,430**	**14,359**	**15,062**
	s	t	u	v	w	x	y	z
	TIEMPO DE RETENCIÓN							
ENSAYOS / REPLICAS	1	2	3	4	5	6	7	8
1	5,72	5,727	5,728	5,721	5,723	5,723	5,722	5,713
2	5,719	5,726	5,727	5,719	5,723	5,723	5,722	5,715
3	5,717	5,726	5,727	5,721	5,723	5,721	5,722	5,716
Promedio	**5,719**	**5,726**	**5,727**	**5,720**	**5,723**	**5,722**	**5,722**	**5,715**
	s	t	u	v	w	x	y	z

Fuente: Realizado por el autor.

ANEXO 16. Comatograma de los ensayos de robustez realizados para el método de cannabis.

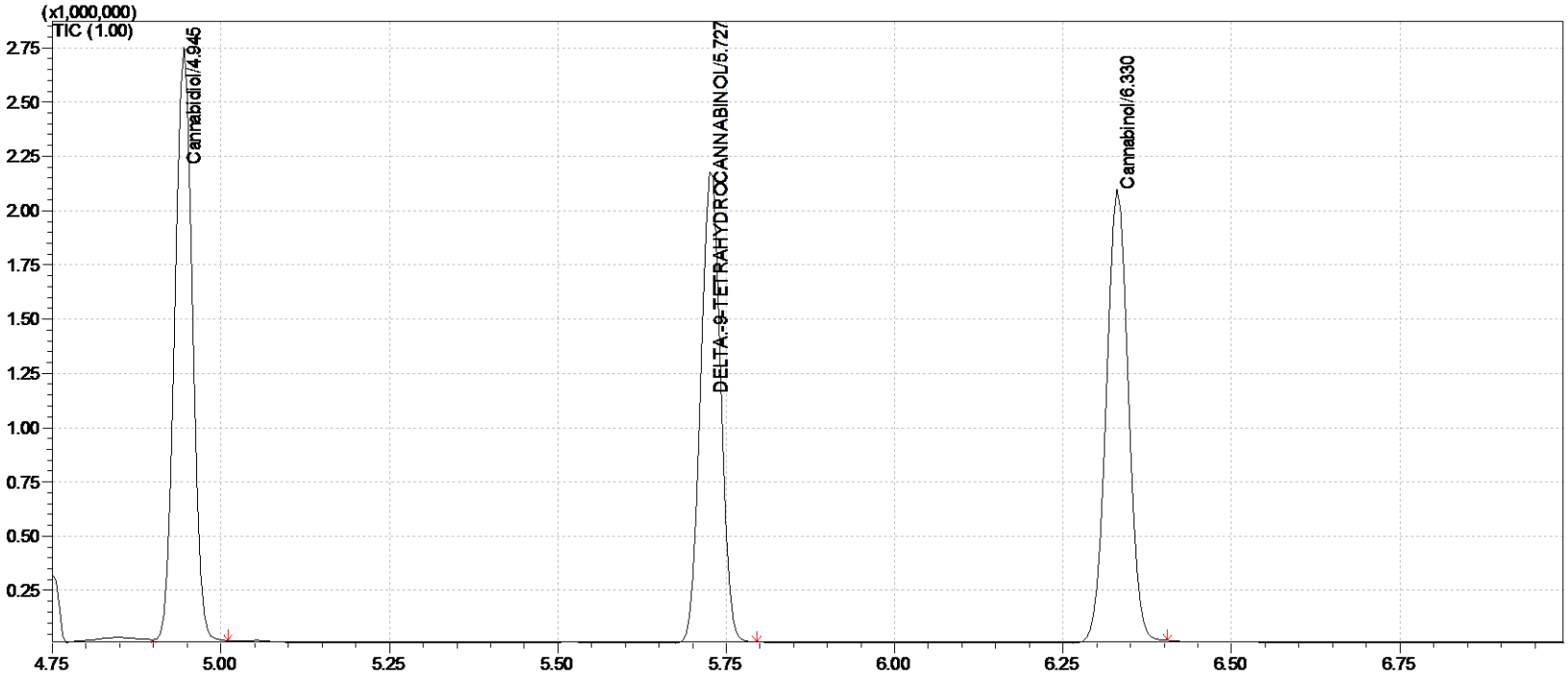


Figura 118. Cromatograma del ensayo 2 para el análisis de robustez del Δ9-THC.

Fuente: Realizado por el Autor.

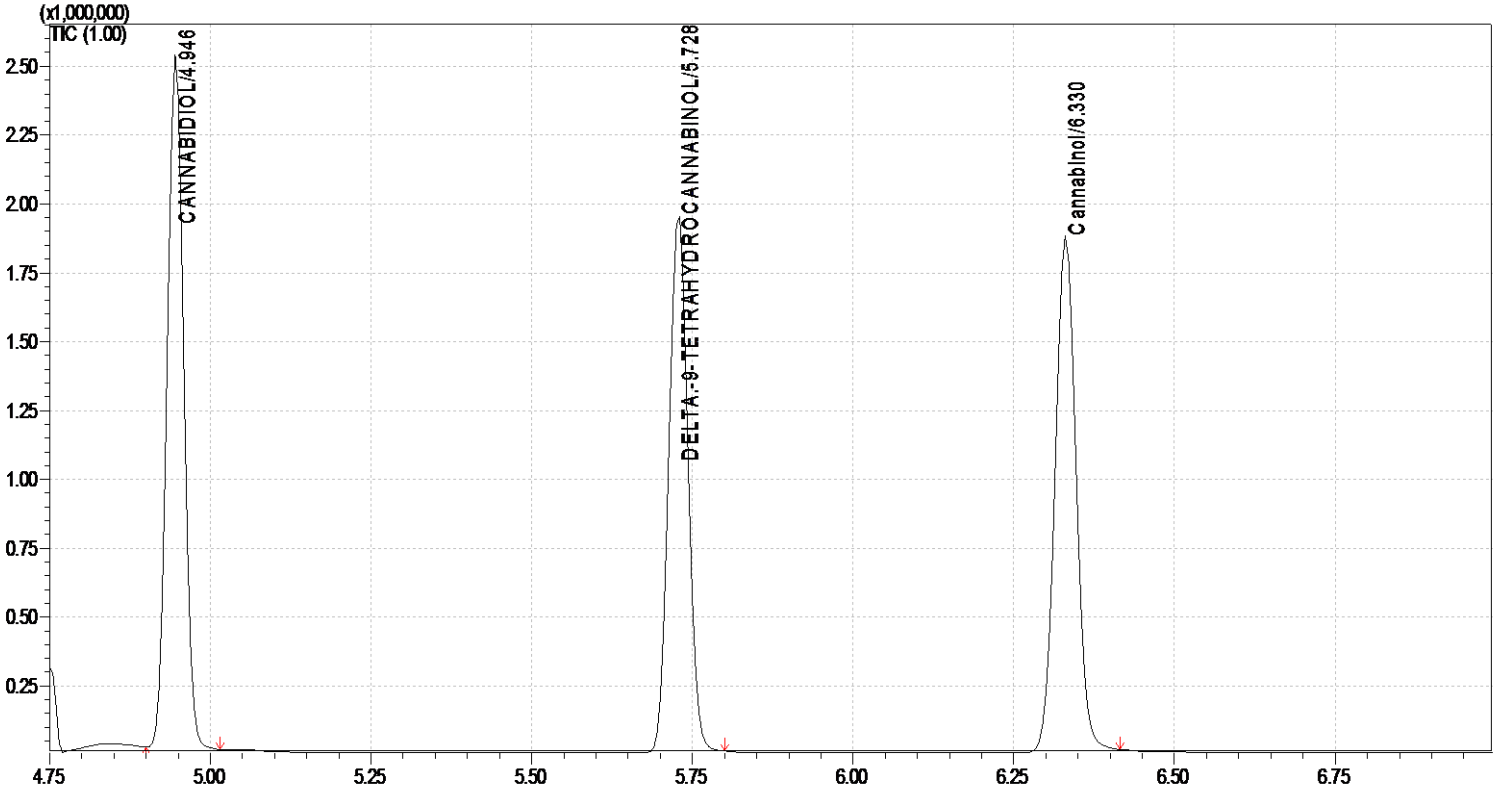


Figura 119. Cromatograma del ensayo 3 para el análisis de robustez del Δ9-THC.

Fuente: Realizado por el Autor.

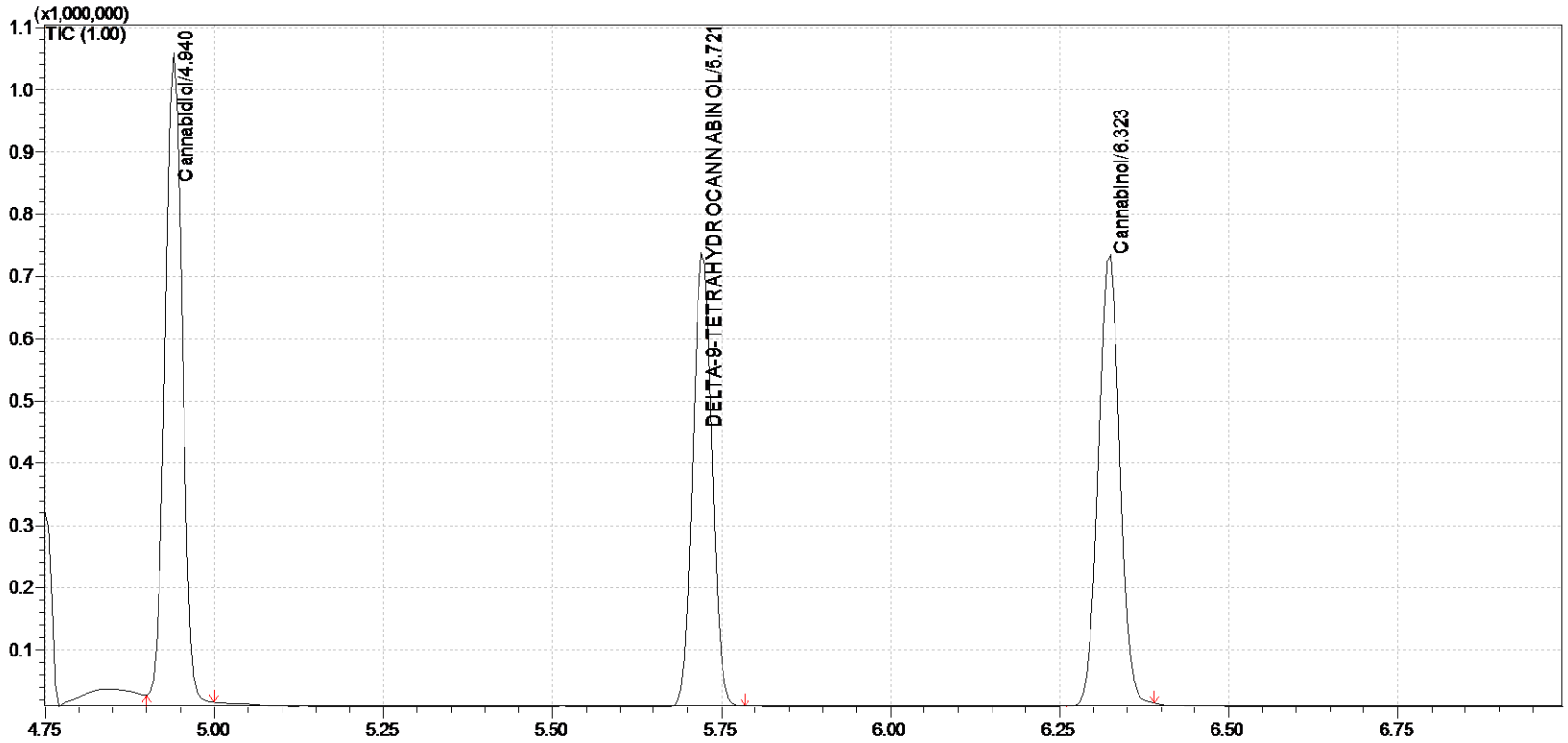


Figura 120. Cromatograma del ensayo 4 para el análisis de robustez del Δ9-THC.

Fuente: Realizado por el Autor.

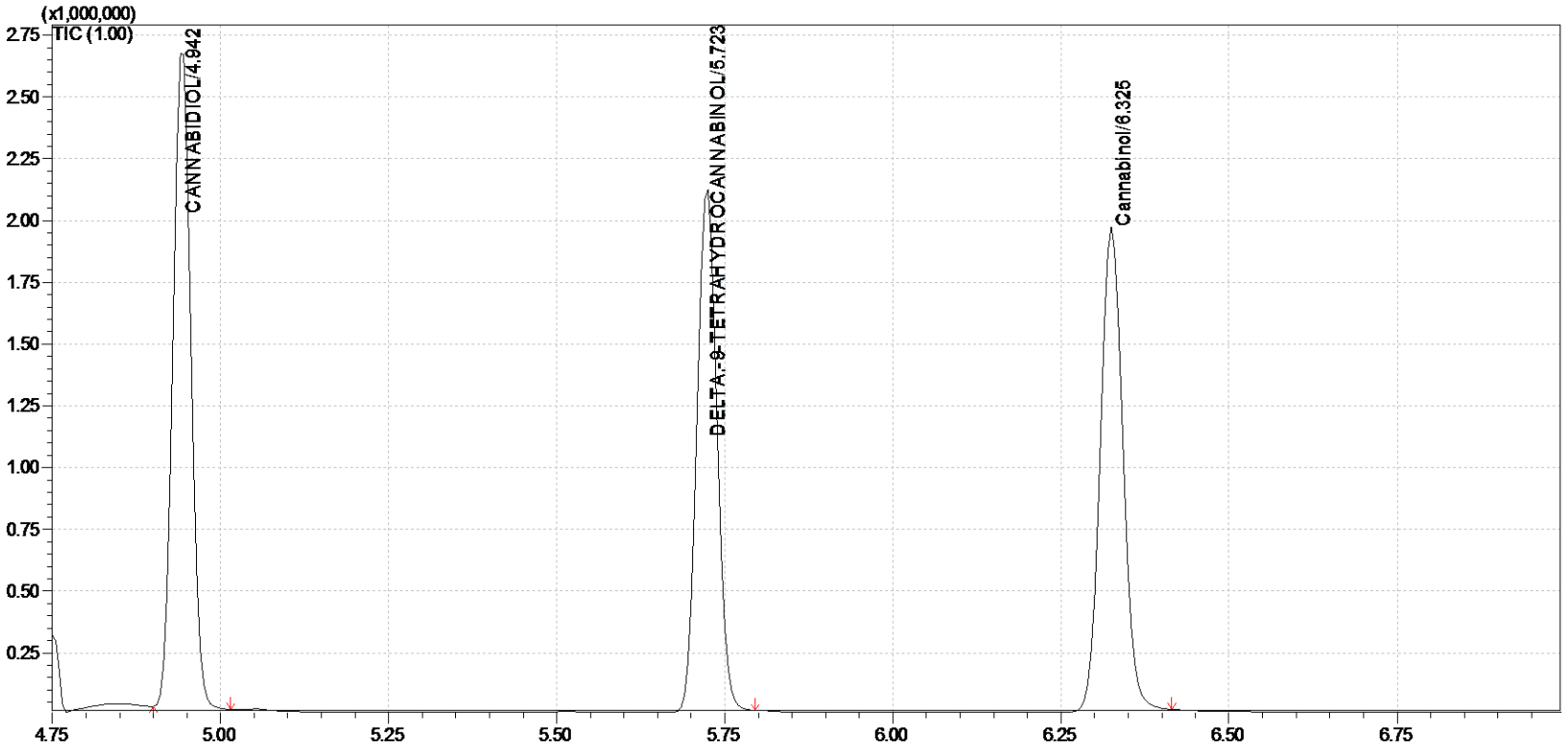


Figura 121. Cromatograma del ensayo 5 para el análisis de robustez del Δ9-THC.

Fuente: Realizado por el Autor.

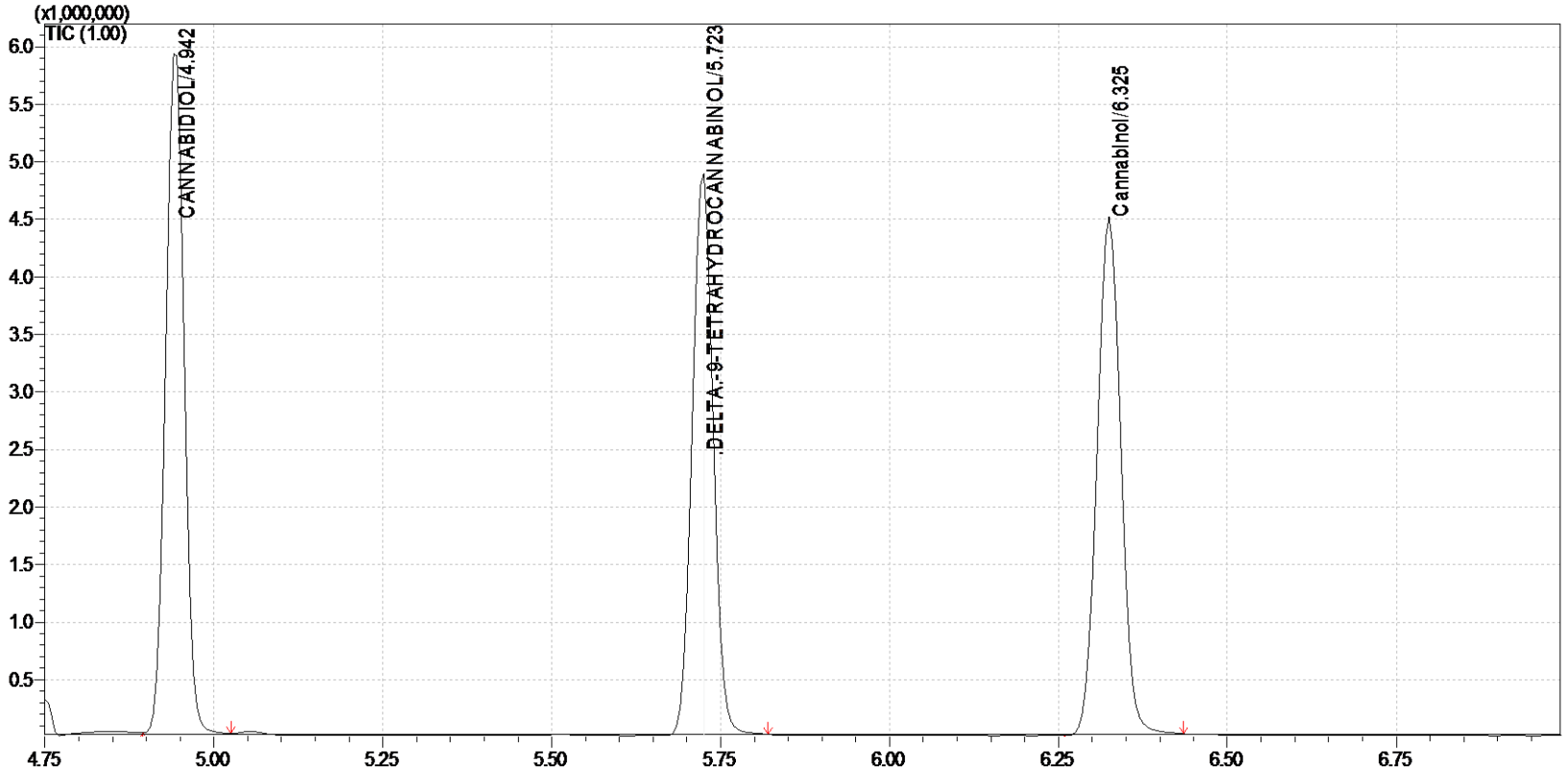


Figura 122. Cromatograma del ensayo 6 para el análisis de robustez del Δ9-THC.

Fuente: Realizado por el Autor.

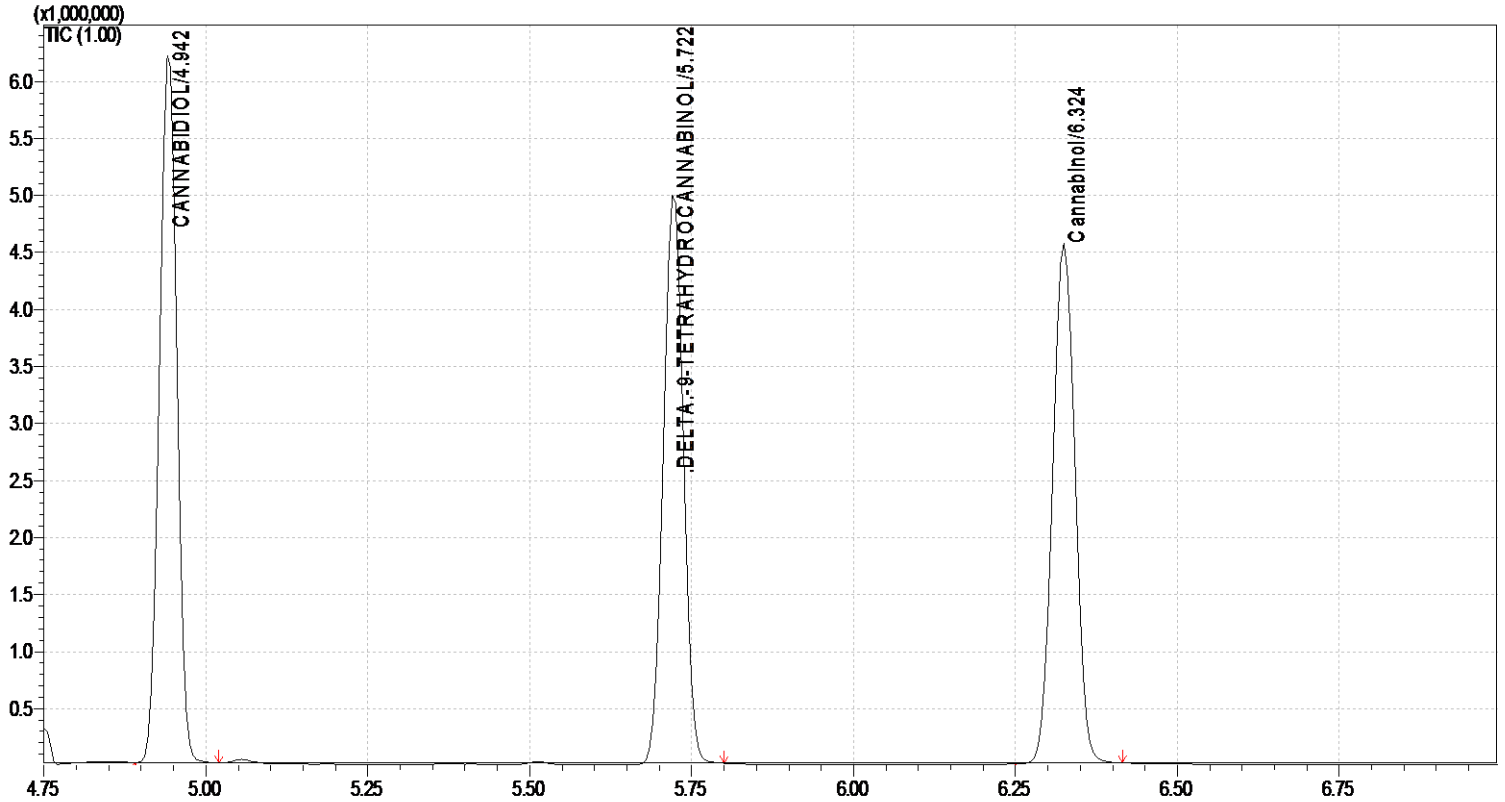


Figura 123. Cromatograma del ensayo 7 para el análisis de robustez del Δ9-THC.

Fuente: Realizado por el Autor.

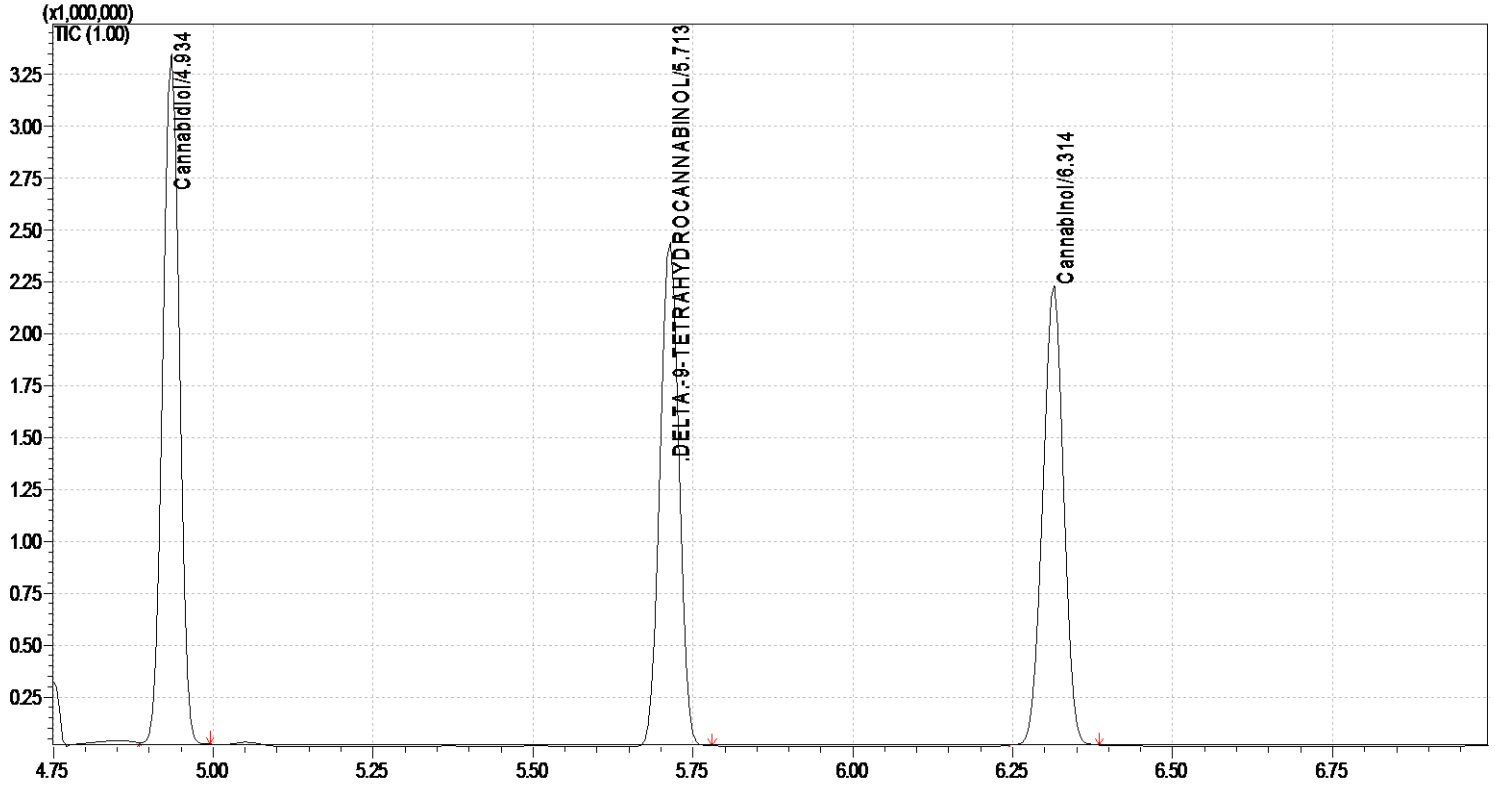


Figura 124. Cromatograma del ensayo 8 para el análisis de robustez del Δ9-THC.

Fuente: Realizado por el Autor.

ANEXO 17. Comatograma para la determinación de estabilidad del *Cannabis Sativa*.

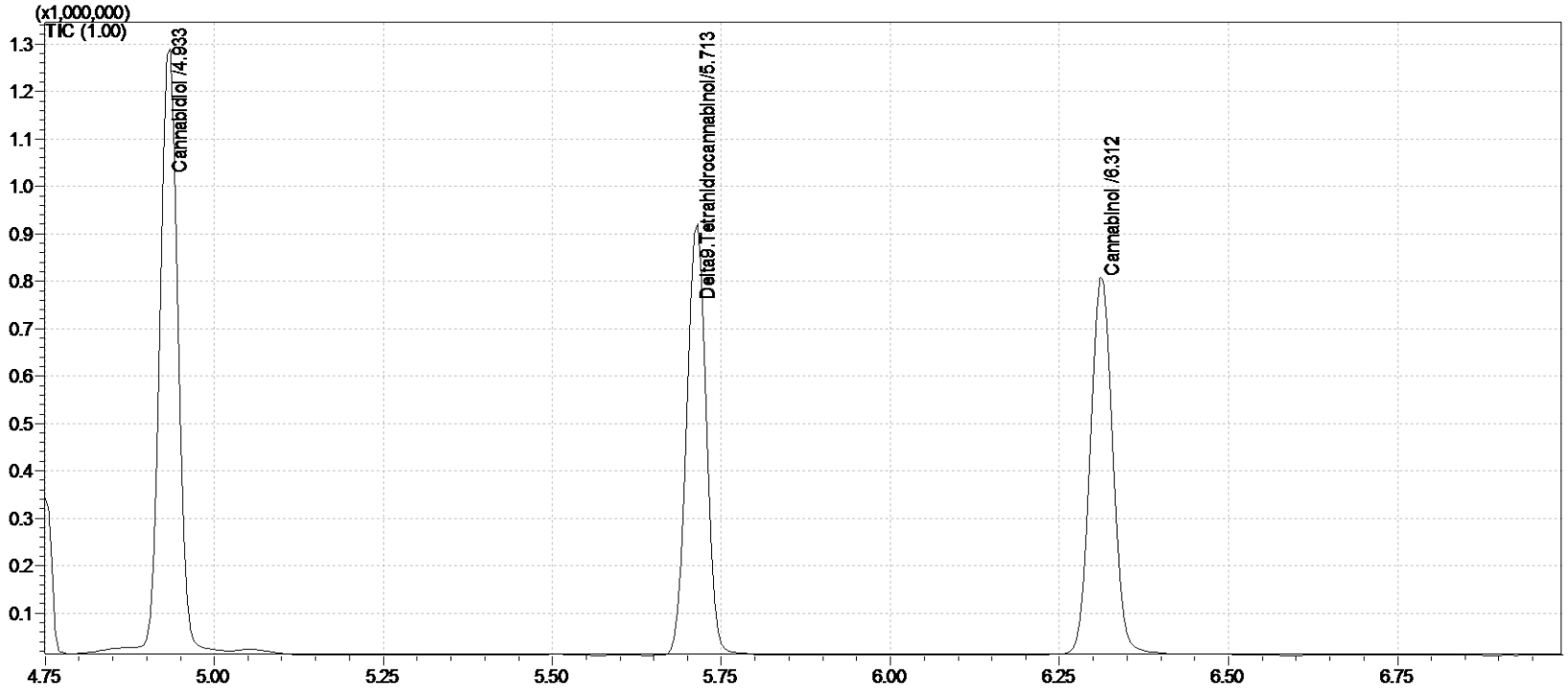


Figura 125. Cromatograma realizado el 2017-11-20 para el análisis de estabilidad del Δ9-THC.

Fuente: Realizado por el Autor.