

**Verificación del método de análisis cualitativo de cannabinoides por
cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas**

Julián Alexis Velasco Rodríguez

Universidad Icesi

Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Ciencias Farmacéuticas

Programa de Química Farmacéutica

2018

Verificación del método de análisis cualitativo de cannabinoides por cromatografía
de gases acoplada a espectrometría de masas

Julián Alexis Velasco Rodríguez

Planeación de proyecto de grado

Director

Frankly Javier Urbano Cerón, M.Sc.

Codirector

Giovanni Rojas Jiménez, Ph. D

Universidad Icesi


Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Ciencias Farmacéuticas

Programa de Química Farmacéutica

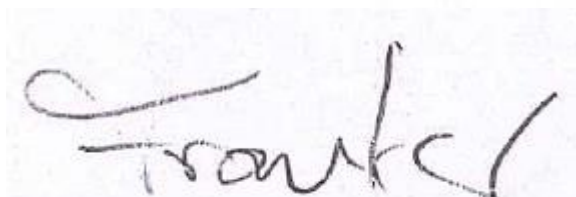
2018



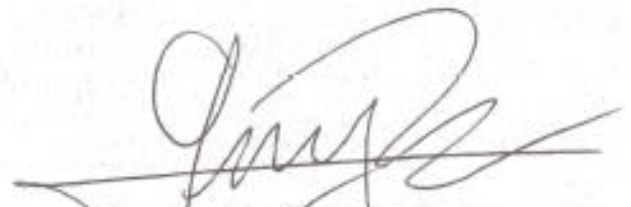
APROBADO POR:



Guillermo León Montoya Peláez
Evaluador



Frankly Javier Urbano Cerón
Tutor del proyecto



Giovanni Rojas Jimenez
Co-tutor del proyecto

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis compañeros, quienes vivieron conmigo este recorrido ayudándome a afrontar momentos difíciles y compartiendo momentos de alegría.

A mis profesores, que a lo largo de la carrera me ofrecieron sus conocimientos, guía y apoyo para materializar mis objetivos académicos.

A mi tutor Frankly Urbano, por su guía e incondicional apoyo en la realización de este proyecto.

Al profesor Giovanni Rojas, por estar pendiente del desarrollo y progreso del proyecto.

Al Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, por brindarme la oportunidad de trabajar en sus instalaciones.

Al señor Osmiro Coneo, por sus enseñanzas y por dedicar su tiempo a apoyarme en el desarrollo del proyecto.

A la Universidad Icesi por proveerme los recursos y herramientas necesarias para conseguir una formación integral y de alta calidad.

Agradezco mis amigos, Giovanny, Camila, Andrea, Ana María, Juliana, José David, Laura, Germán, Alberto, Keving, Camila, Leydi, Camilo, Yordy, por estar cerca en todo momento para brindarme apoyo y cariño durante el proyecto y todos los años en los que hemos convivido.

A mi novia Daniela Hincapié, por estar siempre presente para ayudarme a superar momentos de dificultad y compartir momentos de victoria, demostrándome su amor y apoyo incondicional.

A mi familia, por servirme de apoyo moral en todo momento, brindarme su cariño y confianza y siempre creer en mí.

Agradezco especialmente a mi madre, Esperanza Rodríguez, por ser la persona más influyente en mi vida, por criarme con amor y total compromiso y enseñarme el camino correcto en todo momento. Por creer en mí y brindarme el sustento necesario para salir adelante a pesar de cualquier dificultad.

Finalmente, agradezco enormemente a mi padre, Germán Velasco, quien ha sido mi motivación para cumplir todos mis objetivos y me ha permitido tomar buenas decisiones en mi vida.

CONTENIDO

RESUMEN DEL PROYECTO	6
1 INTRODUCCIÓN.....	8
2 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	10
2.1 Planteamiento del problema y justificación.....	10
2.2 Marco teórico y estado el arte	11
2.2.1 Cannabinoides en el contexto colombiano.....	11
2.2.2 Compuestos cannabinoides	11
2.2.3 Validación de métodos analíticos	12
2.2.4 Cromatografía de gases.....	13
2.2.5 Espectrometría de masas	14
2.2.6 Extracción en fase sólida	15
2.3 Objetivos.....	16
2.3.1 Objetivo general	16
2.3.2 Objetivos específicos	16
2.4 Metodología.....	17
2.4.1 Equipos, materiales y reactivos.....	17
2.4.2 Preparación de soluciones estándar.	18
2.4.3 Preparación de muestras	19
2.4.4 Preparación de soluciones para límite de detección	20
2.4.5 Análisis cromatográfico por GC-MS	20
2.4.6 Determinación de la resolución.	22
2.4.7 Evaluación de selectividad	22
2.4.8 Evaluación del límite de detección	23
2.4.9 Evaluación de especificidad	23
2.4.10 Evaluación de la repetibilidad	24
2.4.11 Matriz de marco lógico.....	25
2.5 Resultados.....	26
2.6 Análisis de resultados.....	32
2.7 Conclusiones	33
2.8 Recomendaciones	34
3 Referencias.....	35

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Propiedades de los compuestos cannabiniodes más relevantes	12
Tabla 2	Equipos y requerimientos tecnológicos	17
Tabla 3	Materiales y elementos.....	18
Tabla 4	Reactivos.....	18
Tabla 5	Características de los materiales de referencia utilizados	19
Tabla 6	Preparación de muestras de material vegetal según el PET	19
Tabla 7	Variables de la corrida cromatográfica	20
Tabla 8	Corridas realizadas en el cromatógrafo	21
Tabla 9	Iones característicos y abundancia relativa de los analitos de interés.....	23
Tabla 10	Matriz de marco lógico.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 11	Resultados obtenidos de corridas cromatográfica de patrones	26
Tabla 12	Resolución de bandas en cromatogramas de patrones 100 ppm.....	27
Tabla 13	Valores de " <i>Match Quality</i> " de espectros de soluciones patrón.....	27
Tabla 14	Tiempos de retención promedio de cada analito	27
Tabla 15	Coeficiente de variación de cada analito	28
Tabla 16	Resultados de límite de detección de $\Delta 9$ -THC	28
Tabla 17	Resultados de límite de detección de CBD	29
Tabla 18	Resultados de límite de detección de CBN	29
Tabla 19	Resultados obtenidos de corridas cromatográfica de muestras	30
Tabla 20	Prueba t de dos colas para análisis de medias	31
Tabla 21	Resolución de bandas en cromatogramas de muestras incautadas.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del THC.....	12
Figura 2. Estructura del CBD	12
Figura 3. Estructura del CBN	12
Figura 4. Estructura de un cromatograma.....	14
Figura 5. Espectro de masas del Δ 9-THC (NIST,2011)	22
Figura 6. Espectro de masas del CBD (NIST,2011).....	22
Figura 7. Espectro de masas del CBN (NIST,2011).....	23
Figura 8. Ejemplo de ruido cromatográfico analizado	28

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Cromatogramas de patrones 100 ppm.....	37
Anexo 2. Espectros de masas de patrón 100 ppm.....	40
Anexo 3. Cromatogramas y Espectros de masas de muestras problema.....	41

RESUMEN DEL PROYECTO

Los compuestos cannabinoides son los componentes principales de las drogas elaboradas a partir de las plantas del género cannabis. Entre los más relevantes se encuentran el tetrahidrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD) y cannabinol (CBN). Su consumo genera efectos psicotrópicos que incluyen relajación y agudización de los sentidos. Debido a su relación con la ocurrencia de actos delictivos, se consideran ilegales las drogas elaboradas a partir de esta planta. Sin embargo, la marihuana (principal droga derivada de cannabis) es la sustancia psicoactiva ilegal más consumida en Colombia. El Instituto Nacional De Medicina Legal y Ciencias Forenses (INMLCF) es una de las entidades colombianas que entre sus funciones se encuentra la de prestar servicios de análisis de estupefacientes en el territorio nacional. De los cuales se generan resultados que son utilizados como evidencia en la toma de decisiones legales. El presente trabajo tiene como propósito de enriquecer las metodologías de análisis cualitativo de sustancias psicoactivas del INMLCF, mediante la verificación del método de identificación de cannabis y sus metabolitos por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), haciendo uso de materiales de referencia certificados. Con el fin de evidenciar la confiabilidad de los resultados de laboratorio generados en la institución e incrementar los estándares de calidad de esta. El método se verificó mediante la aplicación de los parámetros propuestos por la Oficina de Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC) por lo que debe contar con exigencias de selectividad, límite de detección y precisión. Esto mediante la utilización de materiales de referencia y muestras incautadas analizadas en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas. Se obtuvieron cromatogramas bien definidos que permitieron la evaluación de todos los puntos propuestos y se analizaron muestras vegetales problema, identificando estos compuestos en ellas al llevar a cabo el proceso a verificar. Con lo que se puede concluir que el método es viable para llevar a cabo el análisis de identificación de los compuestos cannabinoides descritos.

Palabras clave: Cannabinoides, marihuana, validación/verificación de métodos analíticos, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

ABSTRAC

Cannabinoid compounds are the main components of drugs made from cannabis plants. Some of the most relevant are tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD) and cannabinol (CBN). Its consumption generates psychotropic effects that include relaxation and sharpening of the senses. Due to its relationship with the occurrence of criminal acts, drugs made from this plant are also illegal. However, marijuana is the most consumed illegal psychoactive substance in Colombia. The Instituto Nacional De Medicina Legal y Ciencias Forenses (INMLCF) is the Colombian entity that, among its functions, it oversees providing services of narcotics analysis on the national territory. This analysis generates results, and they are used as evidence in making legal decisions. The present project has the purpose of enriching the methodologies of qualitative analysis of psychoactive substances of the INMLCF, by means of the verification of the method of identification of cannabis and its metabolites by means of gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS), making use of certified reference materials. In order to demonstrate the reliability of laboratory results generated in the institution. To increase the quality standards of them. The method was verified through the application of the parameters proposed by the United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), so it must have selectivity, limit of detection and precision requirements. This refers to the use of reference materials and samples analyzed in a gas chromatograph coupled to masses. Chromatograms were obtained, and these problems were defined, these compounds were identified in them and carried out. And finally, it allows conclude that this method is viable to do the identification analysis of cannabinoids.

Keywords: Cannabinoid compounds, validation/verification of analytical methods, gas chromatography-mass spectrometry.

1 INTRODUCCIÓN

Los narcóticos son drogas que en pequeñas dosis tienen un efecto significativo en los sentidos, como disminución de la atención, alivio del dolor o inducción al sueño, pero en dosis más grandes tienen efectos peligrosos. Este grupo incluye desde la morfina (que es usada como medicamento) hasta la heroína (que es usada ilegalmente). La marihuana se encuentra en algún punto entre esos dos extremos, pudiendo considerarse como un medicamento efectivo para algunas clases de dolores neuropáticos pero usada principalmente con fines de recreación o abuso. (Sánchez, G 2015)

En Colombia, la marihuana es considerada una droga completamente ilegal, debido a su relación con la incidencia de actos delictivos, por lo que su porte puede dar lugar a sanciones legales. De aquí nace la importancia que una entidad de encargo de verificar si estos materiales motivo de disputa, en realidad lo son. A pesar esta naturaleza ilegal, el consumo de sustancias psicoactivas en Colombia ha incrementado drásticamente y este incremento ha sido casi exclusivamente al consumo de marihuana y se ha reflejado en todas las clases sociales sin discriminación de género, edad, estrato o ubicación geográfica. Por lo que los mecanismos de justicia están obligados a tener herramientas de alta calidad para el análisis de estos materiales como elementos probatorios.

El instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses tiene como objetivo principal participar en la administración de la justicia, razón por la cual debe estar a la vanguardia en temas de aseguramiento de la calidad de su trabajo. En este sentido se propuso la verificación del método de análisis de compuestos cannabinoides por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, de forma que se cubran los requerimientos de calidad para el análisis de esta sustancia tan consumida actualmente. (Castrillón & Días, 2015)

Mediante la realización del proyecto se pretende que se supla la necesidad de elevar los estándares de calidad de los análisis de estupefacientes, aunque este es un proceso que está en constante cambio y reinvención, por lo que el aseguramiento de este tipo de calidades es un trabajo conjunto de los miembros de una compañía.

El contar con un equipo de cromatografía de gases acoplado a masas es una gran ventaja por parte del instituto, puesto que supera la eficiencia de muchos otros equipos de su clase, al permitir analizar gran número de muestras en la jornada laboral. Esta técnica, como su nombre indica posee un detector de masas que es la principal razón de su eficiencia, junto a la capacidad de volatilizar la muestra para una mejor ionización.

El proyecto se realizó en el laboratorio de estupefacientes del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, que es el lugar donde está ubicado todo el equipamiento necesario para los análisis, compila varios fundamentos teóricos de validación de metodologías analíticas descritas por las normas ICH y por la Oficina de Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC). Con el fin de mantener el cumplimiento de altos estándares internacionales en materia de validación y verificación.

2 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 Planteamiento del problema y justificación

El porte, consumo y comercialización de sustancias psicoactivas es una de las mayores problemáticas que presenta la sociedad actual, puesto que se evidencian daños físicos y problemas conductuales en las personas quienes hacen uso de estas sustancias, lo que posiciona el consumo de estupefacientes como un factor que incrementa en gran medida la ocurrencia de fenómenos delictivos. Como consecuencia, se han generado diversas legislaciones relacionadas con el consumo y porte de estas sustancias, donde se determinan penalizaciones legales según el tipo y peligrosidad de las sustancias involucradas. Por lo que, en últimas instancias, los dictámenes judiciales frente a estos casos se ven apoyados por la evidencia científica de las pruebas de laboratorio. Por esa razón, es necesario que los análisis que se llevan a cabo en las entidades territoriales cumplan con confiabilidad y certeza.

Dentro del territorio colombiano, el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses (INMLCF) es el organismo encargado de Servir de apoyo técnico científico a la administración de justicia, sustentados en la investigación científica y la idoneidad del talento humano en un marco de calidad, imparcialidad, competitividad y respeto por la dignidad humana (INMLCF, 2018). Dentro de su estructura organizacional se encuentra el laboratorio de estupefacientes, que se encarga del análisis de materiales incautados que tengan sospecha de contenido de drogas ilegales. En su posición como laboratorio analítico se debe garantizar la fiabilidad de los resultados que se generen.

Una de las sustancias de mayor historial de consumo y abusos en Colombia es la marihuana y sus derivados, que es una droga elaborada a partir de las plantas del género Cannabis. El laboratorio de estupefacientes de INMLCF está encargado de realizar los análisis respectivos a material de incautación y uno de ellos es la determinación de compuestos cannabinoides, siguiendo las instrucciones del procedimiento estandarizado de trabajo de “análisis cualitativo del delta-9-tetrahidrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD) y cannabinol (CBN) por cromatografía de gases acoplada a detector selectivo de masas (GC-MS)”.

La verificación de un método validado es una manera de asegurar que los procedimientos registrados generan resultados confiables y seguros, y se minimiza el riesgo de incurrir en errores de cualquier tipo, por lo que el proyecto propone realizar la validación de la metodología de análisis cualitativo de compuestos cannabinoides que actualmente se utiliza en los laboratorios de estupefacientes del INMLCF regional suroccidente de la ciudad de Cali, y de esa manera, demostrar más altos estándares de calidad en la institución.

2.2 Marco teórico y estado el arte

2.2.1 Cannabinoides en el contexto colombiano

El consumo de sustancias psicoactivas es una problemática social de salud pública tanto en Colombia como en el resto del mundo. De acuerdo con Barbieri et al (2012) se pueden ver afectados diversos grupos sociales y etarios, siendo el alcohol, el tabaco y la marihuana las drogas de abuso más utilizadas siendo la última usada por al menos una vez en su vida por el 9,2 % de la población . El alcohol y el tabaco son drogas legales en Colombia pero con varios decretos que regulan entre otras cosas su venta, consumo y publicidad (UNODC, 2018b). Sin embargo, la marihuana pende entre la ilegalidad y la legalidad, ya que de acuerdo con la ley 30 de 1986 y sus respectivas modificaciones, se establece esta droga como un estupefaciente de uso, cultivo, conservación y financiación castigables, estableciendo una dosis de uso personal de 20 g (Ley 30, 1986); Por otro lado, según la ley 1787 de 2016, se crea un marco regulatorio para el uso médico y científico del cannabis (planta de la cual se elabora la droga), generando consigo normativas de legalidad en el consumo, cultivo, conservación y comercialización (Ley 1787, 2016).

Las sustancias utilizadas como drogas de abuso se consumen con la finalidad de alterar el estado mental, a lo que se le conoce como efecto psicotrópico o psicoactivo, lo que significa que genera cambios en la percepción, conciencia y conducta de las personas. Los criterios para definir la legalidad de estas sustancias se determinan por el nivel de relación de su consumo con ocurrencia de casos delictivos como: homicidios, abusos sexuales, hurtos, entre otros (UNODC, 2018b).

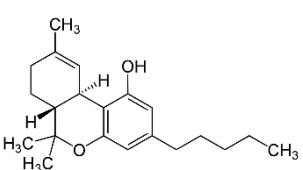
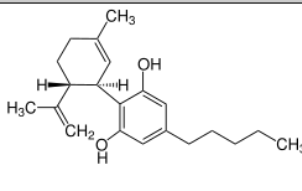
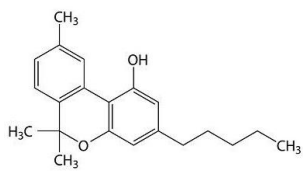
2.2.2 Compuestos cannabinoides

Los compuestos cannabinoides son los principales componentes del cannabis, que es una planta utilizada como droga ilícita y por lo general se consume fumada, por ingestión oral de la resina y aceite o por infusión de té (UNODC, 2018a). Los efectos psicoactivos de su consumo incluyen la inducción de un estado de relajación y aumento de la percepción sensorial y consiguiente agudización de los sentidos de la vista, el olfato el gusto y el oído (UNODC, 2018a). Este efecto se debe a que los compuestos presentes en la planta actúan como agonistas de receptores cannabinoides (CB1) ubicados en el sistema nervioso central (SNC), cuya activación genera la inhibición de la adenilato ciclasa y consecuente reducción de la concentración de AMPc, lo que fisiológicamente resulta en relajación generalizada (Elphick & Egertova, 2001).

La planta contiene numerosos compuestos cannabinoides, de los cuales unos 60 poseen características comunes, el más potente es el tetrahidrocannabinol (THC) también conocido como delta-9-tetrahidrocannabinol (Bataller & Balaguer, 2004). Entre los otros compuestos cannabinoides relevantes se encuentra el cannabidiol

(CBD) que se considera el más abundante, representando hasta el 40 % de los extractos de la planta (Grlic, 1976). La degradación de los compuestos cannabinoides activos, generalmente resultan en cannabiol (CBN) que es otro compuesto relevante por su alto contenido en la planta de cannabis (Grlic, 1976). A continuación, se muestran algunas propiedades químicas relevantes de los compuestos mencionados.

Tabla 1. Propiedades de los compuestos cannabinoides más relevantes

Compuesto	Tetrahidrocannabinol	Cannabidiol	Cannabiol
<i>Formula química</i>	$C_{21}H_{30}O_2$	$C_{21}H_{30}O_2$	$C_{21}H_{26}O_2$
<i>Estructura molecular</i>	 <p>Figura 1. Estructura del THC</p>	 <p>Figura 2. Estructura del CBD</p>	 <p>Figura 3. Estructura del CBN</p>
<i>Peso molecular</i>	314,46	314,46	310,43
<i>Log P</i>	6.387	6.506	6.613
<i>Polar surface</i>	29.46	40.46	29.46
<i>Referencia</i>	(Reaxys, 2018)	(Reaxys, 2018)	(Reaxys, 2018)

2.2.3 Validación de métodos analíticos

El proyecto pretende validar el método de identificación de las sustancias, el cual utiliza la cromatografía de gases (GS) como método de separación acoplado a un detector espectrómetro masas (MS) como método de identificación. La metodología general se denomina cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La validación de un método consiste en realizar sistemáticamente pruebas normalizadas y experimentales para documentar el cumplimiento de parámetros de especificidad, selectividad, repetitividad, entre otros, con el fin de demostrar que el método es adecuado para su propósito previsto (ICH, 2005).

En una validación de métodos analíticos, generalmente, se miden los parámetros de exactitud, precisión, especificidad, selectividad, límite de detección y cuantificación (ICH, 2005). Sin embargo, el análisis a validar es de carácter cualitativo y los resultados a presentar son la detección o no detección de los compuestos en la muestra por lo que no precisa de criterios de presión o exactitud, ya que hacen referencia a cercanía y asertividad de valores numéricos. En su lugar

se evaluará la efectividad, que se define como la capacidad de que el análisis sea positivo cuando el analito se encuentra en la muestra.

La selectividad del método es la capacidad de identificar un analito en una matriz que contenga otros componentes, sin riesgo de interferencia de señales; mientras que la especificidad es la capacidad del método de generar resultados negativos cuando no hay presencia del analito, es decir, que un compuesto diferente al analito no genere la su misma respuesta (ICH, 2005).

El límite de detección da cuenta de la cantidad mínima de analito que se puede identificar, lo que quiere decir que, a concentraciones menores, el análisis resulta negativo. Este parámetro se puede evaluar de diferentes formas entre ellas, por evaluación visual, desviación estándar de la respuesta y la pendiente, curva de calibración o la que será usada en esta validación, basándose en un enfoque señal a ruido, que consiste en el análisis de muestras con bajas concentraciones de analito hasta que la señal sea igual a una proporción del ruido del instrumento; una relación fiable señal-ruido es 10:1 (ICH, 2005).

La robustez mide la capacidad del método de mantener resultados constantes al ser sometido a leves variaciones, en el caso de este método se refiere a variación de condiciones cromatográficas como composición de la fase móvil, temperatura del medio y de la columna, valores de flujo, entre otros (ICH, 2005).

Para la verificación del método se seguirán los parámetros de la Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito (UNODC, 2018b), la cual sugiere que, para la verificación de métodos cualitativos de análisis de drogas, se requieren determinar los parámetros de selectividad, límite de detección y precisión (en condiciones de repetitividad o reproducibilidad).

El método evaluado ha sido previamente validado en el Laboratorio de Estupefacientes de la Regional Nororiental (Bucaramanga) del INMLCF (Castrillón & Días, 2015). Con la evidencia documentada obtenida en el presente trabajo, se pretende que el Laboratorio de Estupefacientes de la Regional Suroccidente (Cali) del INMLCF, cumpla con la verificación del método analítico en el marco de programas internos de garantía de calidad actuales.

2.2.4 Cromatografía de gases

La cromatografía es un conjunto metodologías de separación, identificación y determinación de los componentes de una mezclas complejas (Skoog, Holler, West, & Crouch, 2005). De manera general para todas sus variaciones, se fundamenta en el uso de una fase estacionaria y una fase móvil; los componentes de una fase móvil son transportados a través de la fase estacionaria por el flujo de la fase móvil,

y las separaciones se basan en la diferencia de la velocidad de la migración de los distintos componentes de la mezcla (Skoog et al., 2005).

En la cromatografía de gases (GC) la muestra se volatiliza y se separa como consecuencia de su reparto entre una fase móvil gaseosa y otra fase estacionaria líquida o sólida mantenida en una columna (Skoog et al., 2005). La elución se logra mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte, que a diferencia de otras técnicas cromatográficas, en la CG la fase móvil no interacciona con las moléculas de analito, en cambio, su única función es transportarlo a lo largo de la columna (Skoog et al., 2005).

La técnica de CG se acopla a un sistema de detección adecuado, según el tipo de analitos que se están separando, y las características del análisis. Si un detector responde a concentraciones de soluto, se generan cromatogramas, que es un diagrama útil para el análisis cualitativo y cuantitativo, ya que la posición de las señales en el eje de tiempo permite identificar los componentes de la muestra y las áreas bajo cada señal proporcionan una medición de la cantidad de cada especie (Skoog et al., 2005).

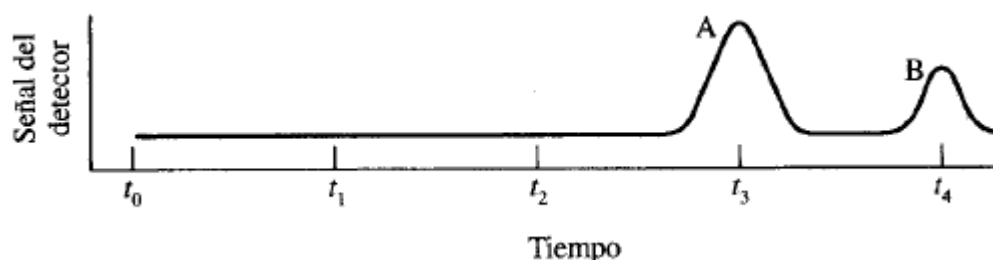


Figura 4. Estructura de un cromatograma. A y B son dos señales distintas que aparecen en los tiempos t_3 y t_4 respectivamente por lo que pertenecen a compuestos diferentes (Skoog et al., 2005).

2.2.5 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es una de las técnicas de detección más fuertes en cromatografía de gases. Un espectrómetro de masas mide la relación masa y la carga (m/z) de los iones que se producen a partir de la muestra, aunque generalmente se habla solamente en términos de masa de los iones porque la mayoría de ellos son monovalentes ($z = 1$) (Skoog et al., 2005). La técnica de MS combina especificidad y sensibilidad hasta ahora no alcanzadas por otras técnicas analíticas. En el método acoplado GC-MS, los componentes salen del flujo de la columna cromatográfica y entran en una fuente de iones, donde se ionizan y se fragmentan y la relación m/z se determina por las trayectorias seguidas por los iones en un recipiente sometido al vacío. Para un compuesto determinado, en

condiciones iguales, la fragmentación es característica y reproducible (Agilent, 2003)

2.2.6 Extracción en fase sólida

Debido a la naturaleza de las muestras, la extracción de los componentes se realiza por extracción en fase sólida, también conocida como extracción líquido-sólido, la cual se realiza utilizando membranas, pequeñas jeringas o cartuchos desechables. A grandes rasgos, los sistemas permiten el contacto de un solvente orgánico con la muestra sólida, lo que genera la disolución de los compuestos orgánicos de la fase sólida por afinidad entre ambos debido a interacciones moleculares, por lo que se debe elegir el solvente adecuado según las características de los analitos que se desean extraer (Skoog et al., 2005).

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Verificar el método de identificación de compuestos cannabinoides (Δ^9 THC, CBD y CBN) por medio de GC-MS en los laboratorios del INMLCF.

2.3.2 Objetivos específicos

- Plantear un esquema de verificación del método analítico para la identificación de compuestos cannabinoides con exigencias de efectividad, selectividad y especificidad.
- Evaluar la selectividad y límite de detección del método de identificación de compuestos cannabinoides con material de referencia de composición conocida.
- Evaluar la especificidad del método de identificación de compuestos cannabinoides con muestras de material incautado.

2.4 Metodología

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Estupefacientes del Instituto nacional de medicina legal y ciencias forenses (INMLCF) de la ciudad de Cali. El enfoque metodológico con el cual se realizará la verificación se basa en seguir las instrucciones del procedimiento estandarizado de trabajo (PET) brindado por el instituto junto con los criterios de validación aplicables propuestos por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) para validaciones de métodos analíticos y haciendo énfasis en los parámetros exigidos por Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito (selectividad, límite de detección y precisión).

2.4.1 Equipos, materiales y reactivos

De acuerdo con el PET se describen los equipos, materiales y reactivos que se necesitarán para llevar a cabo el análisis

Tabla 2. Equipos y requerimientos tecnológicos

Equipo	Especificación	Observacion
Sistema cromatográfico	Cromatógrafo	Agilent Technologies 6890N
	Detector selectivo de masas	Agilent Technologies 5973N
	Automuestreador	
	Columna capilar	HP-5MS 5% Fenil Dimetil Polisiloxano Longitud: 30 m Diámetro interno: 0,25 mm Tamaño de partícula: 0,25 µm
	Software	MSD ChemStation, Bases de datos: NIST, Wiley.
Equipos de computo	Sistema de manejo de información	
	Estación de datos cromatográficos	
	Impresora	
Sistema de suministro de gases	Suministro de helio	Calidad cromatográfica
Equipo de pesaje	Balanza analítica	Mettler AE200
Baño ultrasonido	Sonicador	ELMA E30H Elmasonic
Agitadores	Agitador	Vortex, Titer Plate Shaker

Tabla 3. Materiales y elementos

Material de laboratorio	Balones aforados 1 L, 100 mL, 10 mL y 5 mL
	Tubos de ensayo 10 mL
	Pipetas volumétricas
	Vasos de precipitados
	Puntas para micropipetas
	Insertos para viales
	Viales con septa y tapa para automuestreador del cromatógrafo
	Campana de extracción de solventes
	Micropipetas y puntas
Elementos de bioseguridad	Bata de laboratorio
	Gorro desechable para laboratorio
	Tapabocas respirador con filtro para solventes
	Guantes de nitrilo desechables

Tabla 4. Reactivos

Cromatográficos y de extracción	Etanol
	Metanol
	Hexano
	Otros solventes
Estándar interno	Tetracosano
Materiales de referencia	Delta 9 tetrahidrocannabinol (THC)
	Cannabidiol (CBD)
	Cannabinol (CBN)
Material de análisis	Muestras incautadas

2.4.2 Preparación de soluciones estándar.

Se preparó una solución de tetracosano 1 mg/mL adicionando 1,000 de tetracosano en un balón aforado de 1 L se completó a volumen con etanol. Se sonicó por 10 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. El reactivo tenía una pureza del 99 % por lo que se adicionó 1,010 g para compensar la disminución de concentración y así se obtuvo una solución de exactamente 1000 ppm

Las soluciones de materiales de referencia se prepararon adicionando 1 mL de cada material de referencia (Δ 9THC, CBD y CBN), que se encontraban en solución alcohólica a concentración de 1 mg/mL, y se adicionó 1 mL de la solución de tetracosano 1000 ppm. Posteriormente se aforó a 10 mL con etanol, obteniendo 3 soluciones, una para cada material de referencia, a 100 ppm.

A continuación, se presentan las características específicas de cada material de referencia utilizado para la preparación de las soluciones estándar.

Tabla 5. Características de los materiales de referencia utilizados

Nombre	Tetracosane	Δ9Tetrahydrocannabinol	Cannabinol	Cannabidiol
Concentración/ Potencia	99 %	1 mg / mL	1 mg / mL	1 mg / mL
Lote	MKBZ8846V	135.1B71.0L6	377.1B15.1	303.1B21.0
Fabricante	Aldrich Chemistry	Lipomed	Lipomed	Lipomed
Cantidad adicionada	1,010 g	1 mL	1 mL	1 mL
Volumen Final	1 L	10 mL	10 mL	10 mL
Concentración Final	1000 ppm	100 ppm	100 ppm	100 ppm

Posteriormente se adicionó 1.5 mL de cada solución en tres viales distintos destinados para la lectura en el equipo de cromatografía.

2.4.3 Preparación de muestras

Las muestras que se analizaron son material vegetal incautado que puede presentarse de diferentes formas. La preparación de las muestras varía según la naturaleza y estado del material. A continuación, se presenta una tabla con las formas de presentación y respectiva forma de preparación.

Tabla 6. Preparación de muestras de material vegetal según el PET

Tipo de muestra de material vegetal	Preparación
<i>Plantas de marihuana (hojas, tallos, semillas y flores secas y picadas)</i>	Se recomienda secar el material húmedo. Tomar 30 mg de material, cortarlo y macerarlo, adicionar 5 mL de la solución de 0,1 mg/mL de tetracosano en etanol, agitar, filtrar y decantar si es necesario y adicionar cerca de 1,5 mL en un vial.
<i>Muestras líquidas: Aceite de marihuana</i>	Homogenizar la muestra, tomando 0,2-0,5 g o 0,2-0,5 mL y adicionar 5 mL de tetracosano 0,1 mg/mL en etanol y agitar, filtrar o decantar si es necesario y adicionar cerca de 1,5 mL en un vial.
<i>Muestras líquidas: Hachís – resina</i>	Homogenizar la muestra, tomando 0,2-0,5 g o 0,2-0,5 mL y adicionar 5 mL de tetracosano 0,1 mg/mL en etanol y agitar, filtrar o decantar si es necesario y adicionar cerca de 1,5 mL en un vial.
<i>Material vegetal seco tipo hachís</i>	Tomar 1 g de material, cortarlo y macerarlo, adicionar 5 mL de la solución de 0,1 mg/mL de tetracosano en etanol, agitar, filtrar y decantar si es necesario y adicionar cerca de 1,5 mL en un vial.

Se prepararon 6 muestras de material incautado, las cuales eran de material vegetal por lo que la extracción para todas se realizó de la misma manera, “Plantas de marihuana (hojas, tallos, semillas y flores secas y picadas)” explicada en la Tabla 6. *Preparación de muestras de material vegetal.* Los códigos de identificación de las muestras preparadas fueron: LAES2018-201, LAES2018-209, LAES2018-210, LAES2018-229, LAES2018-230, LAES2018-236.

Finalmente, de cada extracto se agregó 1.5 mL en un vial de cromatografía diferente, obteniendo 6 viales destinados a corridas en equipo de cromatografía.

2.4.4 Preparación de soluciones para límite de detección

Se realizaron 5 diluciones consecutivas del 50 % de la solución patrón para que fueran analizadas para la determinación del límite de detección, completando volumen con etanol en balones de 5 mL. Obteniendo para cada material de referencia una solución a 50 ppm, 25 ppm, 12.5 ppm, 6.25 ppm y 3.125 ppm. Que posteriormente fueron analizadas en con el equipo de cromatografía.

2.4.5 Análisis cromatográfico por GC-MS

Para llevar a cabo el análisis cromatográfico, se utilizaron los parámetros de funcionamiento del equipo definidos por la documentación y se realizaron de la misma manera todas las corridas. Se hizo lectura de blanco negativo, el cual en todos los casos fue de etanol. Se inició la corrida antes y después de analizar cada muestra, ya que la lectura de solución blanco funciona como purga de la columna y previene que se almacenen residuos de analito y eluyente de la corrida anterior.

Tabla 7. Variables de la corrida cromatográfica

Parámetro	Valor		
<i>Temperatura (°C) del horno</i>	200	230	290
<i>Tiempo (min)</i>	1	1	5
<i>Rampa de trabajo (°C/min)</i>	20	25	-
<i>Post Run</i>	300 °C * 0.5 min		
<i>Temperatura del inyector</i>	250 ° C		
<i>Temperatura de la interface del detector</i>	290 ° C		
<i>Gas de arrastre</i>	Helio		
<i>Columna</i>	Columna capilar 5 % (Fenil)metilpolisiloxano de 30 m de longitud x 250 µm de diámetro interno x .025 µm de espesor de película.		
<i>Flujo por columna</i>	1.0 mL / min a flujo constante		
<i>Split</i>	25:1		
<i>Volumen de inyección</i>	1.0 µL		

Sintonización y evaluación
de la sintonización del
detector de masas

Autotune (Atune.u) Evaluation Tune

Condiciones del espectrómetro de masas

Solvent delay	3 min
Rango de masas (m/z)	50 – 450
Threshold	150
Temperatura de cámara de ionización	230 °C
Temperatura del analizador cuadrupolo	150 °C

En la Tabla se presentan las corridas realizadas con sus respectivas repeticiones.

Tabla 8. Corridas realizadas en el cromatógrafo

Solución	Concentración /ppm	Tipo	Repeticiones
<i>Δ9-THC</i>	100	Patrón	5
	50	Límite de detección	3
	25	Límite de detección	3
	12,5	Límite de detección	3
	6,25	Límite de detección	3
	3,125	Límite de detección	3
<i>CBD</i>	100	Patrón	5
	50	Límite de detección	3
	25	Límite de detección	3
	12,5	Límite de detección	3
	6,25	Límite de detección	3
	3,125	Límite de detección	3
<i>CBN</i>	100	Patrón	5
	50	Límite de detección	3
	25	Límite de detección	3
	12,5	Límite de detección	3
	6,25	Límite de detección	3
	3,125	Límite de detección	3
<i>LAES2018-201</i>	Por determinar	Muestra	3
<i>LAES2018-209</i>	Por determinar	Muestra	3
<i>LAES2018-210</i>	Por determinar	Muestra	3
<i>LAES2018-229</i>	Por determinar	Muestra	3
<i>LAES2018-230</i>	Por determinar	Muestra	3
<i>LAES2018-236</i>	Por determinar	Muestra	3
<i>Total de corridas</i>			78

2.4.6 Determinación de la resolución.

La resolución (R_s) de dos bandas adyacentes se define como la distancia entre dos bandas dividida entre el ancho promedio de las bandas. Si la retención y el ancho de la banda se mide en unidades de tiempo, la resolución está dada por la ecuación (1). Donde $t_{R,1}$ y $t_{R,2}$ son los tiempos de retención de las sustancias comparadas en los cromatogramas y W_1 y W_2 son los anchos promedio respectivos.

$$R_s = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{0,5 (W_2 + W_1)} \quad (1)$$

Valores de R_s inferiores a 1 indican que las bandas se encuentran superpuestas, por lo que un R_s aceptable debe ser superior a 1,5.

2.4.7 Evaluación de selectividad

Para evaluar la selectividad del método se realizó la corrida cromatográfica de los tres materiales de referencia definidos como “patrón 100 ppm” con cinco repeticiones por cada una como se explica en el punto 2.4.5 se obtiene el cromatograma (Anexo 1) con los respectivos tiempos de retención de cada material de referencia y su espectro de masas el cual es comparado con el espectro teórico.

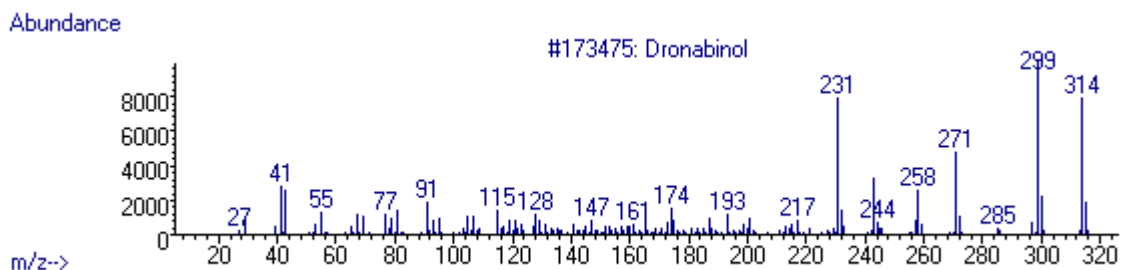


Figura 5. Espectro de masas del Δ^9 -THC (NIST,2011)

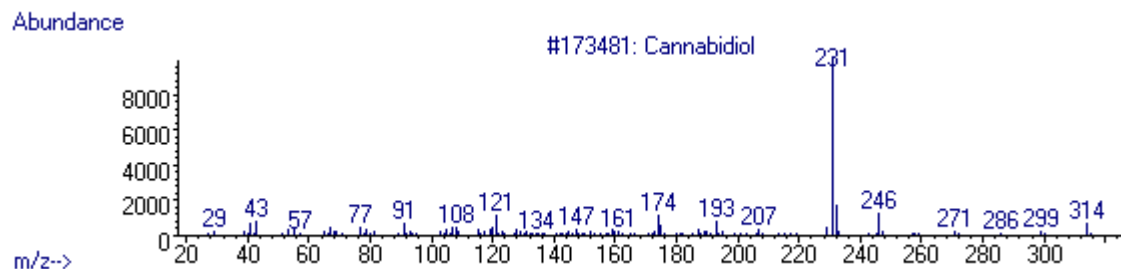


Figura 6. Espectro de masas del CBD (NIST,2011)

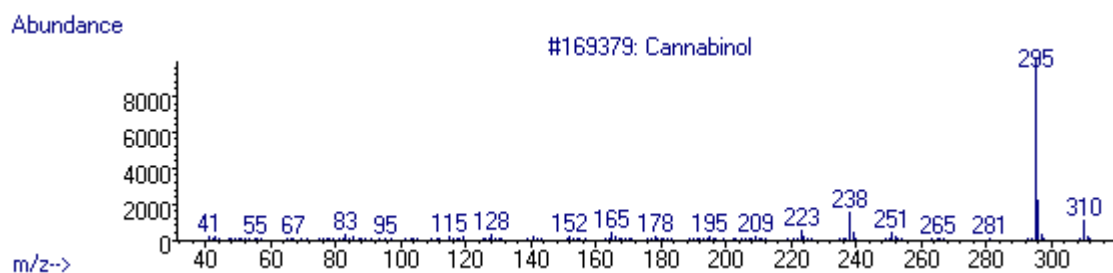


Figura 7. Espectro de masas del CBN (NIST,2011)

donde se comparan las señales de fragmentaciones más relevantes. Se evalúa en los cromatogramas la ausencia de interferencia significativa en los tiempos de retención y se debe verificar que no existan bandas solapadas.

Tabla 9. Iones característicos y abundancia relativa de los analitos de interés

Sustancia	(m/z)
<i>Δ9-Tetrahydrocannabinol</i>	299 ₁₀₀ , 314 ₈₀ , 231 ₇₁ , 271 ₄₉ , 243 ₃₀
<i>Cannabidiol</i>	231 ₁₀₀ , 314 ₁₆ , 174 ₉ , 232 ₁₆ , 246 ₁₁
<i>Cannabinol</i>	295 ₁₀₀ , 310 ₁₀ , 238 ₁₅ , 296 ₂₂ , 251 ₄

2.4.8 Evaluación del límite de detección

El límite de detección se evaluó por el método de enfoque señal-ruido, que consiste en analizar diluciones preparadas en el punto 2.4.4, hasta alcanzar una relación señal-ruido de 3:1, lo que quiere decir que la señal sea el tripe del valor del ruido del instrumento. Esto se evaluó automáticamente con el software del equipo arrojando un resultado numérico que indica el número de veces que la intensidad de la señal supera al ruido. Por lo que el límite de detección es el que obtenga un valor más cercano a 3.

2.4.9 Evaluación de especificidad

Para evaluar la especificidad del método se realizó la corrida 6 muestras diferentes de material vegetal incautado con tres repeticiones por cada una como se explica en el punto 2.4.5. Se obtuvo el cromatograma con los respectivos tiempos de retención de cada material de referencia y su espectro de masas, los cuales se compararon con los obtenidos de las muestras analizadas, y evaluaron las señales de fragmentaciones más relevantes indicadas en la Tabla . Se deben comparar los tiempos de retención de cada muestra con los de los materiales de referencia evaluando que sean iguales mediante una prueba t-student

2.4.10 Evaluación de la repetibilidad

Para estimar la repetibilidad, se realiza el cálculo del coeficiente de variación de los las áreas relativas de los estándares que se corrieron en el punto 2.4.5 utilizando la ecuación (2), donde s es la desviación estándar de los resultados y X es la media.

$$CV(\%) = \frac{s}{X} \times 100\% \quad (2)$$

2.4.11 Matriz de marco lógico

Tabla 10. Matriz de marco lógico

Objetivo General: Validar el método de identificación de compuestos cannabinoides (THC, CBN y CBD) por medio de GC-MS en los laboratorios del INMLCF.

Objetivos específicos	Actividades	Supuestos	Indicadores
1. Plantear un esquema de validación del método analítico para la identificación de compuestos cannabinoides con exigencias de efectividad, selectividad, especificidad y robustez.	Revisión bibliográfica Planteamiento de esquema de Validación más adecuado de acuerdo con la bibliografía y con los protocolos del INMLCF	Disponibilidad de material bibliográfico y acceso a bases de datos científicamente confiables.	Esquema de validación y análisis de datos del método de analítico de identificación.
2. Evaluar la selectividad y límite de detección del método de identificación de compuestos cannabinoides con material de referencia de composición conocida.	Analizar 5 repeticiones de cada material de referencia. Identificación única de la señal de cada analito Comparar espectro de masas de cada analito con los teóricos Analizar diluciones consecutivas hasta alcanzar la señal tres veces mayor a la señal del ruido del instrumento.	Cromatograma con buena resolución (bandas bien resueltas). %Inter < 20% y 5%, para las muestras y los estándares, respectivamente. Espectros de masas con los iones característicos de cada analito.	Cromatograma con bandas características de cada analito. % de interferencias en los tiempos de retención de cada analito. Espectro de masas de cada analito. Límite de detección (intensidad de la señal)
3. Evaluar la especificidad del método de identificación de compuestos cannabinoides con muestras de material incautado.	Analizar con tres repeticiones 6 muestras de material vegetal incautado. Comparar los tiempos de retención de los analitos de interés con los estándares.	Cromatograma con buena resolución (bandas bien resueltas). %Inter < 20% y 5%, para las muestras y los estándares, respectivamente. Superposición de señales menor a 1,5 % Espectros de masas con los iones característicos de cada analito.	Cromatograma con bandas de todos los compuestos presentes en la muestra. Espectro de masas de las moléculas de interés y posibles interferentes. Índice de retención de los compuestos comparados con los materiales de referencia.

2.5 Resultados

Se realizó el análisis de los patrones (100 ppm) de los tres analitos ($\Delta 9$ THC, CBD y CBN) Para ello se visualizaron los cromatogramas obtenidos haciendo énfasis en identificar dos señales y se extrajeron los datos de áreas y tiempos de retención.

Tabla 11. Resultados obtenidos de corridas cromatográfica de patrones 100 ppm

<i>Analito</i>		TR (min)	Área	TR Tetracosano (min)	Área Tetracosano	TR relativo	Área Relativa
<i>$\Delta 9$-THC</i>	R1	7,233	3734835	6,414	6047459	1,128	0,618
	R2	7,235	3538314	6,415	5991607	1,128	0,591
	R3	7,235	3443579	6,415	5992372	1,128	0,575
	R4	7,235	3318649	6,415	5949711	1,128	0,558
	R5	7,235	3246892	6,415	5929121	1,128	0,548
	X	7,235	3456454	6,415	5982054	1,128	0,578
	s	0,001	171621	4,000.E-04	40801	5,439.E-05	2,477.E-02
<i>CBD</i>	R1	6,716	2658157	6,429	5837885	1,045	0,455
	R2	6,698	2819653	6,412	5736570	1,045	0,492
	R3	6,697	2844633	6,410	5678592	1,045	0,501
	R4	6,694	2899984	6,408	5758346	1,045	0,504
	R5	6,697	2877072	6,411	5767073	1,045	0,499
	X	6,700	2819900	6,414	5755693	1,045	0,490
	s	0,008	85387	7,616.E-03	51385	6,224.E-05	1,782.E-02
<i>CBN</i>	R1	7,630	4008855	6,416	5516454	1,189	0,727
	R2	7,632	3919233	6,417	5400708	1,189	0,726
	R3	7,631	3851619	6,416	5414259	1,189	0,711
	R4	7,631	3842892	6,416	5396224	1,189	0,712
	R5	7,631	3808616	6,416	5316302	1,189	0,716
	X	7,631	3886243	6,416	5408789	1,189	0,718
	s	0,001	71030	4,000.E-04	63873	6,048.E-05	6,549.E-03

Los cromatogramas correspondientes a la información de la Tabla 11 se presentan en el Anexo 1 donde se aprecia que las bandas están bien definidas y solo se presenta la señal del analito y el estándar interno. Además, el ruido es poco apreciable.

Se evaluó también la resolución de los cromatogramas como se indica en la ecuación 1, obteniendo los valores para cada compuesto, los resultados correspondientes se presentan a continuación:

Tabla 12. Resolución de bandas en cromatogramas de patrones 100 ppm

<i>Sustancia</i>	TR 1 (min)	TR 2 (min)	W1 (min)	W2 (min)	Resolución
<i>Δ9-THC</i>	6,415	7,235	0,1	0,1	8,20
<i>CBD</i>	6,414	6,7	0,1	0,1	2,86
<i>CBN</i>	6,416	7,631	0,1	0,2	8,10

Se aprecia que todas las bandas presentan valores de resolución superiores a 1,5 por lo que se obtienen resultados satisfactorios.

En el Anexo 2 se presentan los espectros de masas obtenidos de las soluciones patrón de 100 ppm. Se comparan estos espectros con los de las Figuras 5, 6 y 7. Sin embargo, el equipo de cromatografía presenta un análisis de similaridad de los espectros de masas reportado "*Match Quality*" como porcentaje, un valor cercano a 100, quiere decir que el espectro obtenido es muy similar al espectro teórico, analizando la presencia de la señal de cada ion y su intensidad.

Tabla 13. Valores de "*Match Quality*" de espectros de masas de soluciones patrón

<i>Sustancia</i>	<i>Match Quality</i>				
	R1	R2	R3	R4	R5
<i>Δ9-THC</i>	99	99	99	99	99
<i>CBD</i>	99	99	99	99	99
<i>CBN</i>	99	99	99	99	99

En la Tabla 11 se pueden observar los tiempos de retención promedio y tiempos de retención relativos promedio de cada analito. Esta información se utiliza para evaluar la similaridad de señales de muestras reales.

Tabla 14. Tiempos de retención promedio de cada analito

<i>Sustancia</i>	Tiempo de retención Promedio (min)	Tiempo de retención Relativo Promedio
<i>Δ9-THC</i>	7,235	1,128
<i>CBD</i>	6,700	1,045
<i>CBN</i>	7,631	1,189

Con las áreas relativas obtenidas de las repeticiones se calcula los coeficientes de variación de estas, haciendo uso de la ecuación 2.

Tabla 15. Coeficiente de variación de cada analito

Sustancia	Área Relativa Promedio	Desviación estándar	CV
$\Delta 9$ -THC	0,578	0,025	4,29%
CBD	0,490	0,018	3,64%
CBN	0,718	0,007	0,91%

Posteriormente se obtuvo la información de las soluciones para límite de detección, la cual se analizó con la función señal-ruido del software. Para cada sustancia se seleccionó la banda presentada y se comparó con una porción del ruido.

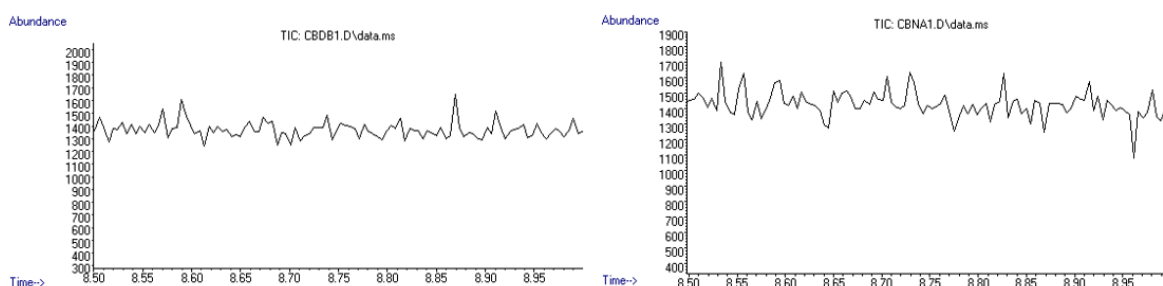


Figura 8. Ejemplo de ruido cromatográfico analizado

También se analizó el “Match Quality” de cada espectro generado y el análisis visual de las señales para determinar la capacidad de identificación de la sustancia en pequeñas concentraciones.

Tabla 16. Resultados de límite de detección de $\Delta 9$ -THC

Concentración	<i>$\Delta 9$-Tetrahidrocannabinol</i>		
	Señal/Ruido	Match Quality	Iones principales identificables
50 ppm	62,1	99	Si
	69,9	99	Si
	76	99	Si
25 ppm	11	96	Si
	8,9	93	Si
	9,9	93	Si
12,5 ppm	1,6	-	Si
	1,7	-	Si
	1,6	-	Si
6,25 ppm	-	-	No
	-	-	No
	-	-	No

Tabla 17. Resultados de límite de detección de CBD

<i>Cannabidiol</i>			
<i>Concentración</i>	Señal/Ruido	Match Quality	Iones principales identificables
50 ppm	101,1	99	Si
	72	99	Si
	72	99	Si
25 ppm	16,7	95	Si
	23,4	95	Si
	21,7	90	Si
12,5 ppm	4	-	Si
	4,1	-	Si
	3,5	-	Si
6,25 ppm	0,8	-	No
	1,2	-	No
	0,6	-	No

Tabla 18. Resultados de límite de detección de CBN

<i>Cannabinol</i>			
<i>Concentración</i>	Señal/Ruido	Match Quality	Iones principales identificables
50 ppm	31,4	95	Si
	32,8	94	Si
	29,5	95	Si
25 ppm	8,4	-	Si
	7,4	-	Si
	8,7	-	Si
12,5 ppm	2	-	No
	1,9	-	No
	1,9	-	No
6,25 ppm	1,2	-	No
	1,1	-	No
	1,1	-	No

A continuación, se analizan las muestras de material incautado. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 18.

Tabla 19. Resultados obtenidos de corridas cromatográfica de muestras

<i>Muestra</i>	TR	THC		CBD		CBN		
	Tetracosano (min)	TR (min)	TR R	TR (min)	TR R	TR (min)	TR R	
LAES2018-201	R1	6,408	7,235	1,129	No detectado	No detectado	7,655	1,195
	R2	6,408	7,235	1,129	No detectado	No detectado	7,654	1,194
	R3	6,407	7,234	1,129	No detectado	No detectado	7,654	1,195
	X	6,408	7,235	1,129	-	-	7,654	1,195
	S	0,001	0,001	0,000	-	-	0,001	0,000
LAES2018-209	R1	6,406	7,277	1,136	No detectado	No detectado	7,637	1,192
	R2	6,406	7,277	1,136	No detectado	No detectado	7,638	1,192
	R3	6,406	7,271	1,135	No detectado	No detectado	7,637	1,192
	X	6,406	7,275	1,136	-	-	7,637	1,192
	S	0,000	0,003	0,001	-	-	0,001	0,000
LAES2018-210	R1	6,407	7,275	1,135	No detectado	No detectado	7,636	1,192
	R2	6,406	7,276	1,136	No detectado	No detectado	7,635	1,192
	R3	6,407	7,275	1,135	No detectado	No detectado	7,637	1,192
	X	6,407	7,275	1,136	-	-	7,636	1,192
	S	0,001	0,001	0,000	-	-	0,001	0,000
LAES2018-229	R1	6,406	7,238	1,130	No detectado	No detectado	7,637	1,192
	R2	6,407	7,239	1,130	No detectado	No detectado	7,638	1,192
	R3	6,406	7,238	1,130	No detectado	No detectado	7,637	1,192
	X	6,406	7,238	1,130	-	-	7,637	1,192
	S	0,001	0,001	0,000	-	-	0,001	0,000
LAES2018-230	R1	6,407	7,231	1,129	No detectado	No detectado	7,647	1,194
	R2	6,406	7,230	1,129	No detectado	No detectado	7,646	1,194
	R3	6,407	7,232	1,129	No detectado	No detectado	7,648	1,194
	X	6,407	7,231	1,129	-	-	7,647	1,194
	S	0,001	0,001	0,000	-	-	0,001	0,000
LAES2018-236	R1	6,408	7,280	1,136	No detectado	No detectado	7,631	1,191
	R2	6,408	7,276	1,135	No detectado	No detectado	7,630	1,191
	R3	6,407	7,280	1,136	No detectado	No detectado	7,629	1,191
	X	6,408	7,279	1,136	-	-	7,630	1,191
	S	0,001	0,002	0,000	-	-	0,001	0,000

Los espectros de masas fueron utilizados para discernir en la elección de las bandas como. El Anexo 3 presenta un cromatograma por muestra y los espectros de masas de las bandas tentativas.

Los resultados de las muestras incautadas se comparan con los de las soluciones patrón mediante prueba t-student para corroborar que las medias del tiempo de retención relativo de ambas bandas son iguales.

Tabla 20. Prueba t de dos colas para análisis de medias

<i>Muestra</i>	THC		CBN	
	TR R promedio	Valor-P	TR R promedio	Valor-P
LAES2018-201	1,129	3,885E-08	1,195	1,306E-10
LAES2018-209	1,136	4,290E-08	1,192	3,386E-09
LAES2018-210	1,136	1,487E-10	1,192	5,616E-09
LAES2018-229	1,130	2,031E-09	1,192	6,329E-10
LAES2018-230	1,129	2,586E-06	1,194	2,566E-10
LAES2018-236	1,136	8,189E-09	1,191	1,797E-07

P crítico = 2,3646

También se realizó el cálculo de la resolución de las señales analizadas para las muestras.

Tabla 21. Resolución de bandas en cromatogramas de muestras incautadas

<i>Sustancia</i>	TR 1 (min)	TR 2 (min)	W1 (min)	W2 (min)	Resolución
LAES2018-201	7,235	7,654	0,08	0,16	3,49
LAES2018-209	7,275	7,637	0,12	0,10	3,29
LAES2018-210	7,275	7,636	0,12	0,10	3,28
LAES2018-229	7,238	7,637	0,08	0,12	3,99
LAES2018-230	7,231	7,647	0,08	0,12	4,16
LAES2018-236	7,279	7,630	0,12	0,10	3,19

Donde se aprecia que todos los valores para resolución son mayores a 1.5, lo que indica que es adecuada.

2.6 Análisis de resultados

Los resultados obtenidos en los ensayos para evaluar la selectividad muestran que el método es altamente eficiente en la identificación de compuestos cannabinoides (Δ^9 -THC, CBD y CBN). El Anexo 1 presenta los cromatogramas obtenidos de las soluciones patrón y en ellos se puede observar un alto grado de resolución en las señales para los tres compuestos con valores de para 8,20 Δ^9 -THC, 2,86 para CBD y 8,10 para CBN y presentan tiempos de retención suficientemente alejados para obtener un resultado claro y confiable. Además, se puede decir que la señal representa totalmente al analito puesto que los espectros de masas obtenidos poseen una muy alta similaridad de señales e intensidad, como se aprecia en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Donde se presentan los valores de “*Match Quality*” reportados por el software, y se basa en la comparación del espectro de masas obtenido con la base de datos espectrométrica, otorgando un valor porcentual que entre más cerca de 100% se encuentre, más similares son los espectros comparados. Para los tres componentes se obtuvo un valor de *Match Quality* de 99 en todas las repeticiones.

La buena definición de todas las bandas en los cromatogramas de muestras vegetales (Anexo 3) también es útil para demostrar la alta selectividad del método, incluso con la utilización de matrices con alto contenido de compuestos similares. Sin embargo, no hubo presencia detectable de Cannabinol en ninguna de las muestras principalmente debido a que su estructura con dos anillos aromáticos, lo que le confiere una alta estabilidad al momento adquirir una carga y dificulta la identificación del compuesto por detección de masas en mezclas complejas al sufrir muy escasas rupturas. La imposibilidad en la detección de cannabinol en las muestras también se puede deber a múltiples factores como lo son la especie de la planta, el tiempo de corte, las condiciones de almacenamiento del material vegetal, entre otras (Bataller & Balaguer, 2004).

También fue evaluada la repetitividad del método al analizar las áreas relativas de las diferentes señales obtenidas. En la

Tabla se presentan los datos de coeficientes de variación obtenidos en los análisis de cada compuesto, siendo altamente conforme, ya que la especificación dice que este valor debe ser menor a 20 % en métodos de análisis de estupefacientes (UNODC, 2018b). Con estos valores se puede demostrar que el método actualmente cumple con parámetros de precisión, medidos de esta forma.

El límite de detección fue estimado mediante el análisis de la relación señal-ruido. En las mediciones a baja concentración se dificulta la distinción de las señales características por lo que el valor de *match quality* decae en gran medida. Sin embargo, los iones principales siguen siendo identificables por lo que se tuvo en cuenta varios factores para definir el valor adecuado. El límite de detección para Δ^9 -

THC y CBD fue de 12,5 ppm y para el CBN de 25 ppm. Esto también se debe a la estructura de difícil ionización del compuesto. Sin embargo, estos valores son adecuados, puesto que las plantas y materiales analizados poseen una alta cantidad de estos compuestos.

La especificidad del método se evaluó llevando a cabo el análisis de muestras vegetales. Este punto fue satisfactorio en cuanto a la resolución de señales presentada en la Tabla 21. Resolución de bandas en cromatogramas de muestras incautadas y la identificación visual del espectro de masas. Sin embargo, se llevó a cabo el análisis de los tiempos de retención relativos de estos componentes comparándolos con los tiempos de retención obtenidos de los patrones preparados con material de referencia. La igualdad de las medias se demostró con una prueba t-student de dos colas con una significancia de 95 % y 6 grados de libertad, la cual presentaba un valor crítico de 2,3646, siendo mayor que todos los valores p obtenidos en la Tabla . Con esta evidencia, se es posible determinar que la verificación del método arrojó resultados conformes y confiables.

2.7 Conclusiones

Se verificó el método de análisis cualitativo de compuestos cannabinoides por medio de cromatografía de gases acoplada a masas. Logrando generar evidencia de que se cumple con parámetros de selectividad, precisión y especificidad, al seguir el protocolo interno del instituto y la metodología de verificación propuesta a partir del mismo.

Se determinaron los tiempos de retención de los compuestos cannabinoides analizados con la implementación disponible, obteniendo valores de 7.2 min, 6.7 min y 7,6 min para los compuestos Δ 9-THC, CBD y CBN respectivamente. Los cuales fueron utilizados junto con los espectros de masas para identificar la presencia de estos mismos compuestos en muestras problema de material vegetal.

Se obtuvieron los límites de detección que deberían tenerse en cuenta al realizar análisis de compuestos cannabinoides, siendo un valor de 12,5 ppm para Δ 9-THC y CBD y de 25 ppm para CBN.

Se evaluó la repetitividad del método, obteniendo valores de coeficiente de variación de 4,29 % para Δ 9-THC 3,64 % para CBD y de 0,91 % para CBN. Demostrando así que la metodología de análisis cualitativo de cannabinoides es repetible.

El método evaluado es apto para realizar el análisis cualitativo de compuestos cannabinoides bajo las condiciones descritas en el documento, en el laboratorio de estupefacientes del INMLCF

2.8 Recomendaciones

Al realizar una verificación es importante programar una nueva verificación para continuar garantizando altos niveles de calidad en los resultados obtenidos el laboratorio mediante el método.

Se puede manejar un intervalo más estrecho de concentraciones para determinar el límite de detección.

Al efectuar el método es indispensable cumplir a cabalidad con los detalles descritos para asegurar la validez de los resultados obtenidos.

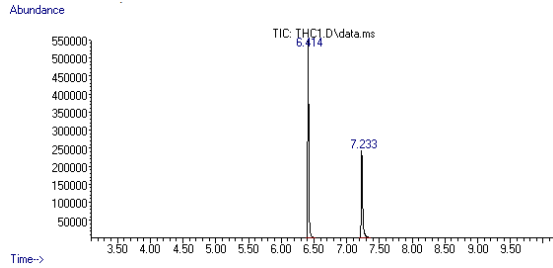
3 Referencias

- Agilent. (2003). *5973 inert Mass Selective Detector Hardware Manual*. Retrieved from <http://www.aimanalytical.com/Manuals/5973N Inert MSD.pdf>
- Barbieri, I., Trivelloni, M., Zani, B., & Palacios-Espinosa, X. (2012). Consumo de sustancias psicoactivas en los contextos recreativos entre estudiantes universitarios en Colombia. *Revista Ciencias de La Salud*, 10(1), 69–86. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1692-72732012000400007
- Bataller, R., & Balaguer, J. (2004). *Toxicología clínica*. Universitat de València.
- Bioquímica Y Farmacia, E. DE, Criminalística Chimborazo, D. DE, & Sánchez Ordoñez Gabriela Elizabeth, A. (2015). *ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS "VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ESPECTROSCOPIA Previo a la Obtención del Título BIOQUÍMICA FARMACEÚTICA*. Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4373/1/56T00547UDCTFC.pdf>
- Castrillón, J. A., & Días, G. (2015). *Validación de metodos de análisis cualitativo de delta 9-tetrahydrocannabinol (THC), cannabinol (CBN) y cannabidiol (CBD) por cromatografía de gases acopada a masas (CG/MS), regional norte*. Bucaramanga.
- Elphick, M. R., & Egertova, M. (2001). The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1407), 381–408. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0787>
- Grlic, L. (1976). A comparative study on some chemical and biological characteristics of various samples of cannabis resin. *Bulletin on Narcotics*, 14(3), 37–46. Retrieved from http://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/bulletin/bulletin_1962-01-01_3_page005.html
- ICH. (2005). ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1) Guideline on Validation of Analytical Procedures: Methodology developed to complement the Parent Guideline. Retrieved from https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/46584546/Q2_R1_Guideline.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1526497715&Signature=W3GZ8ihL%2B3RU0nRfl2iC0coclic%3D&response-content-disposition=inline%3B filename%3DICH_HARMONISED_TRIPARTITE_G

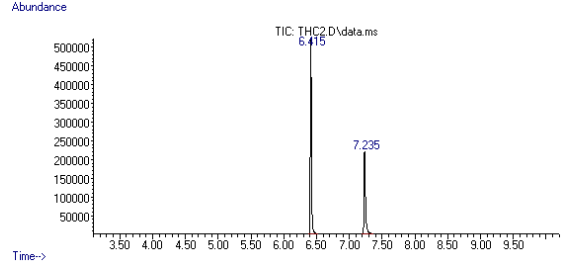
- INMLCF. (2018). ¿Quiénes Somos? - Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Retrieved April 25, 2018, from <http://www.medicinalegal.gov.co/quienes-somos>
- Ley 1787. Uso médico y científico del Cannabis (2016). Retrieved from [http://es.presidencia.gov.co/normativa/normativa/LEY 1787 DEL 6 DE JULIO DE 2016.pdf](http://es.presidencia.gov.co/normativa/normativa/LEY_1787_DEL_6_DE_JULIO_DE_2016.pdf)
- Ley 30. Estatuto Nacional de Estupefacientes (1986). Retrieved from https://www.mintic.gov.co/portal/604/articles-3670_documento.pdf
- Reaxys. (2018). Reaxys.com. Retrieved May 16, 2018, from <http://www.reaxis.com/>
- Skoog, D., Holler, J., West, D., & Crouch, S. (2005). *Fundamentos de Química Analítica* (CENGAGE Le). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- UNODC. (2018a). Cannabis - Campaña mundial contra la droga. Retrieved May 9, 2018, from <https://www.unodc.org/drugs/es/get-the-facts/cannabis.html>
- UNODC. (2018b). *United Nations Office on Drugs and Crime*. Retrieved from <https://www.unodc.org/>

Anexo 1. Cromatogramas de patrones 100 ppm

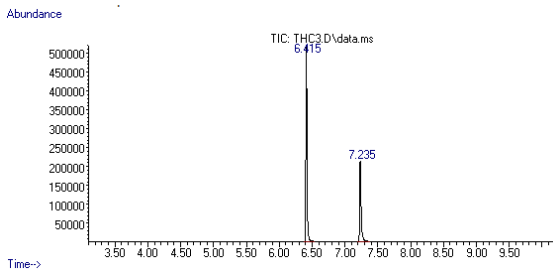
Δ9-Tetrahidrocannabinol patrón 100 ppm



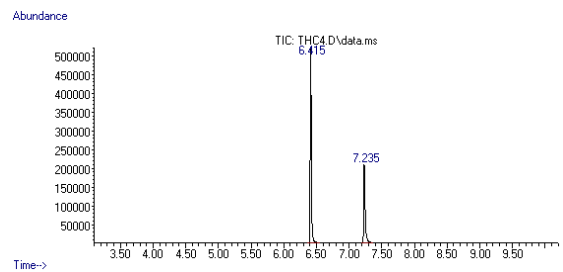
peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of max.	% of total
1	6.414	707	715	738	BB	520631	6047459	100.00%	61.820%	
2	7.233	882	891	919	BB	235416	3734835	61.76%	38.180%	



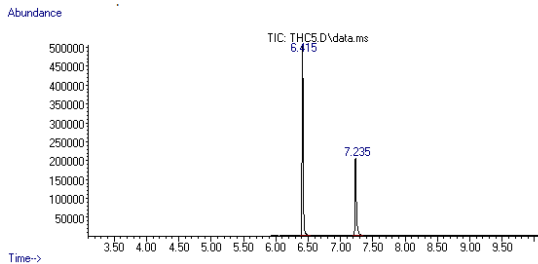
peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of max.	% of total
1	6.415	708	715	739	BB	522226	5991607	100.00%	62.872%	
2	7.235	884	891	921	BB	219381	3538314	59.05%	37.128%	



peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of max.	% of total
1	6.415	708	715	743	BB	513101	5992372	100.00%	63.506%	
2	7.235	882	891	924	BB	213504	3443579	57.47%	36.494%	



peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of max.	% of total
1	6.415	705	715	747	BB	508114	5949711	100.00%	64.194%	
2	7.235	882	891	921	BB	207091	3318649	55.78%	35.806%	

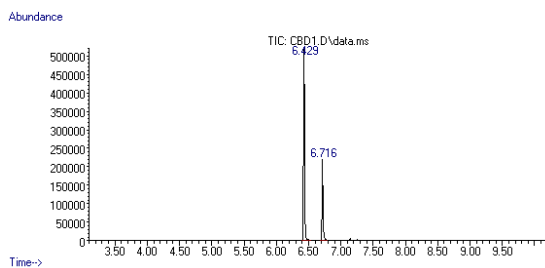


Signal : TIC: THC5.D\data.ms

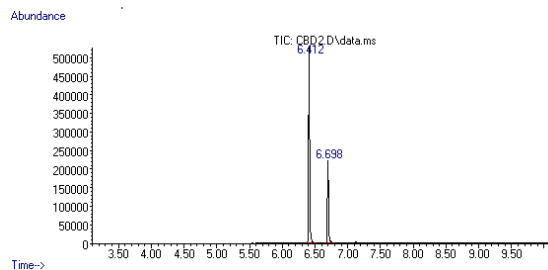
peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of max.	% of total
1	6.415	708	715	743	BB	510368	5929121	100.00%	64.615%	
2	7.235	884	891	918	BB	203920	3246892	54.76%	35.385%	

1 – 5 de izquierda a derecha y de arriba a abajo

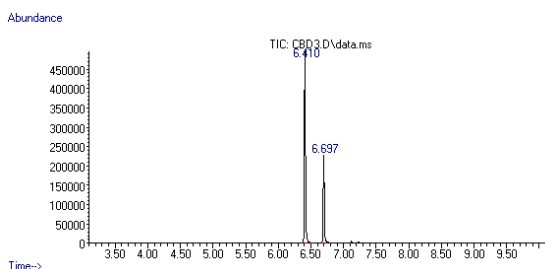
Cannabidiol patrón 100 ppm



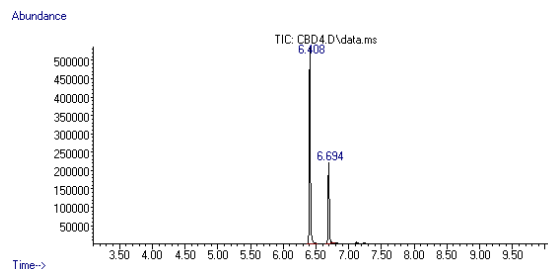
peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max	% of total
1	6.429	711	718	743	BB	530068	5837885	100.00%	68.713%
2	6.716	773	780	799	BB	211897	2658157	45.53%	31.287%



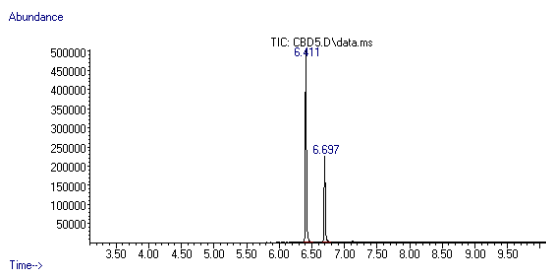
peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max	% of total
1	6.412	705	714	740	BB	513053	5736570	100.00%	67.046%
2	6.698	767	776	797	BB	214916	2819653	49.15%	32.954%



peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max	% of total
1	6.410	707	714	739	BB	498591	5678592	100.00%	66.625%
2	6.697	768	775	798	BB	219357	2844633	50.09%	33.375%



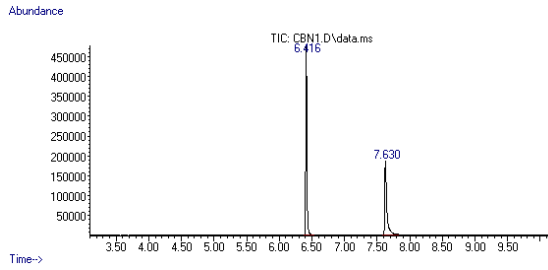
peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max	% of total
1	6.408	704	713	739	BB	518412	5758346	100.00%	66.506%
2	6.694	765	775	799	BB	218965	2899984	50.36%	33.494%



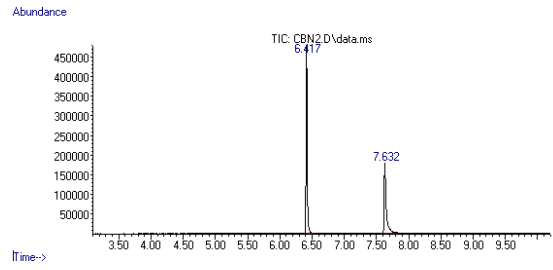
peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max	% of total
1	6.411	708	714	740	BB	507451	5767073	100.00%	66.717%
2	6.697	768	775	798	BB	216199	2877072	49.89%	33.283%

1 – 5 de izquierda a derecha y de arriba a abajo

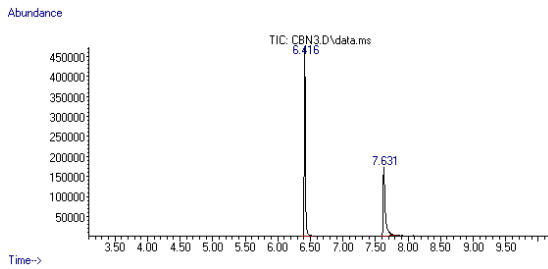
Cannabinol patrón 100 ppm



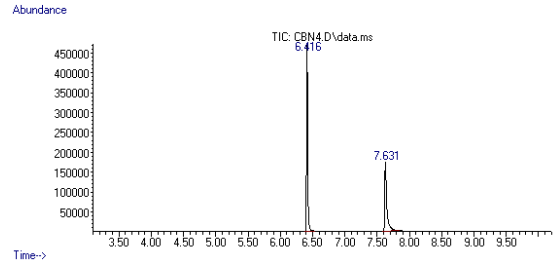
peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of max.	% of total
1	6.416	707	715	742	BB	470964	5516454	100.00%	57.914%	57.914%
2	7.630	966	976	1020	BB	180908	4008855	72.67%	42.086%	42.086%



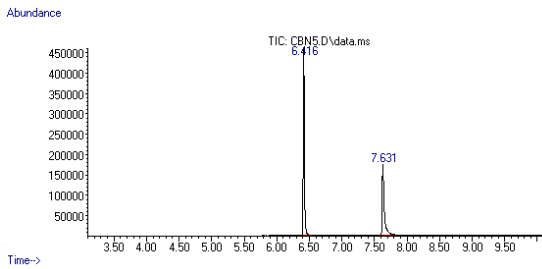
peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of max.	% of total
1	6.417	708	715	743	BB	459805	5400708	100.00%	57.948%	57.948%
2	7.632	964	976	1021	BB	175317	3919233	72.57%	42.052%	42.052%



peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of max.	% of total
1	6.416	705	715	744	BB	462868	5414259	100.00%	58.432%	58.432%
2	7.631	967	976	1024	BB	170077	3851619	71.14%	41.568%	41.568%



peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of max.	% of total
1	6.416	708	715	744	BB	460439	5396224	100.00%	58.406%	58.406%
2	7.631	965	976	1023	BB	172497	3842892	71.21%	41.594%	41.594%

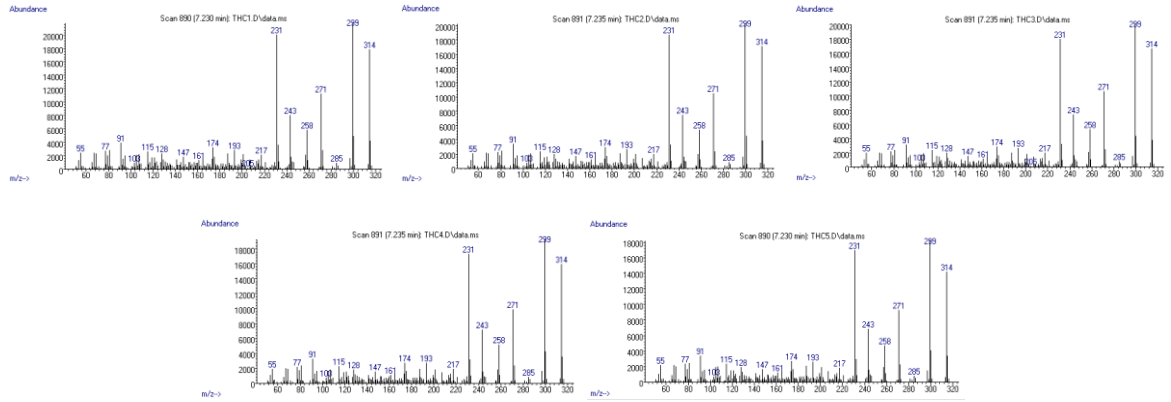


peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of max.	% of total
1	6.416	707	715	742	BB	451554	5316302	100.00%	58.261%	58.261%
2	7.631	966	976	1022	BB	172637	3808616	71.64%	41.739%	41.739%

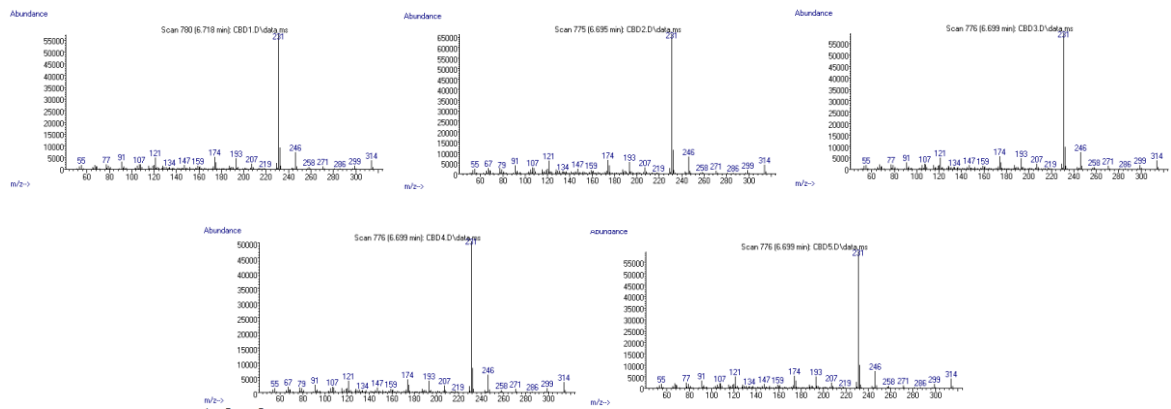
1 – 5 de izquierda a derecha y de arriba a abajo

Anexo 2. Espectros de masas de patrón 100 ppm

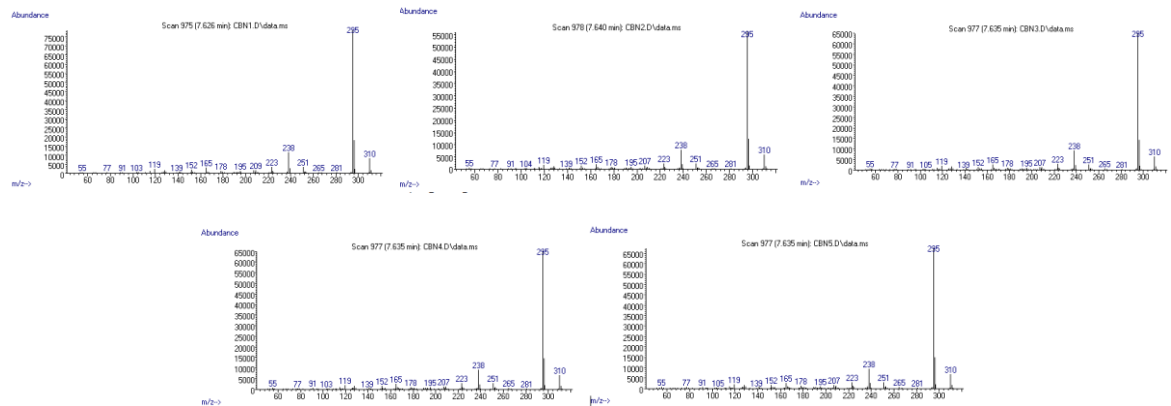
9-Tetrahidrocannabinol patrón 100 ppm



Cannabidiol patrón 100 ppm

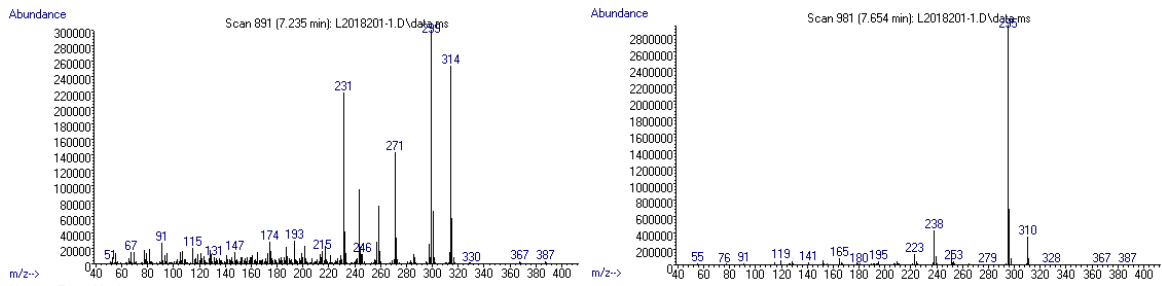
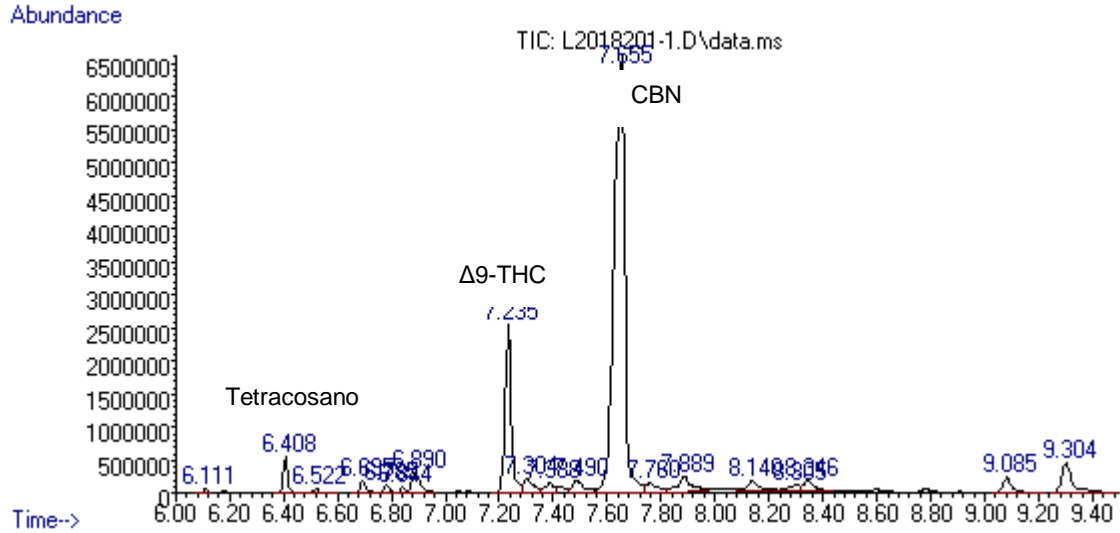


Cannabinol patrón 100 ppm

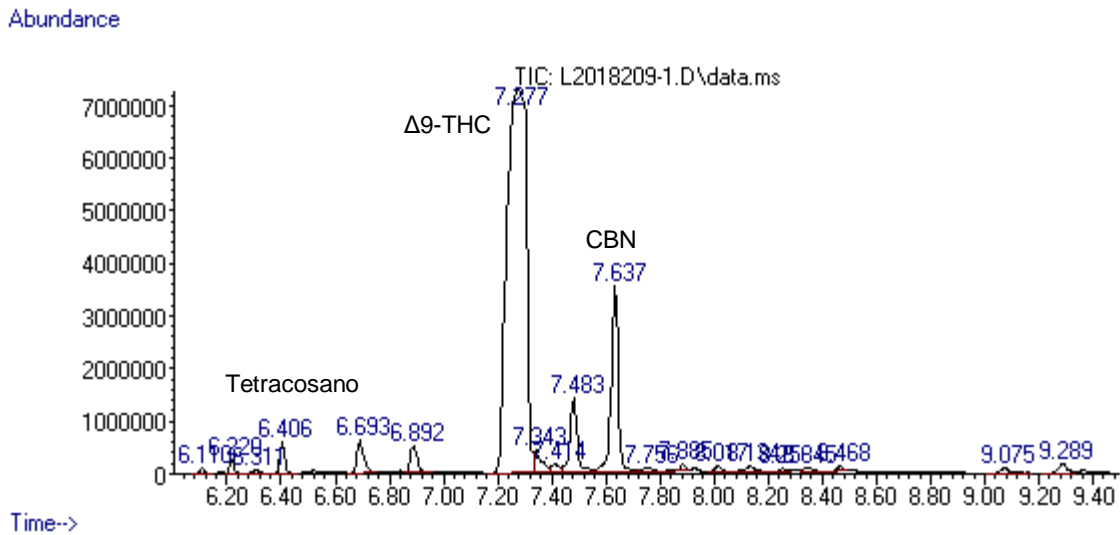


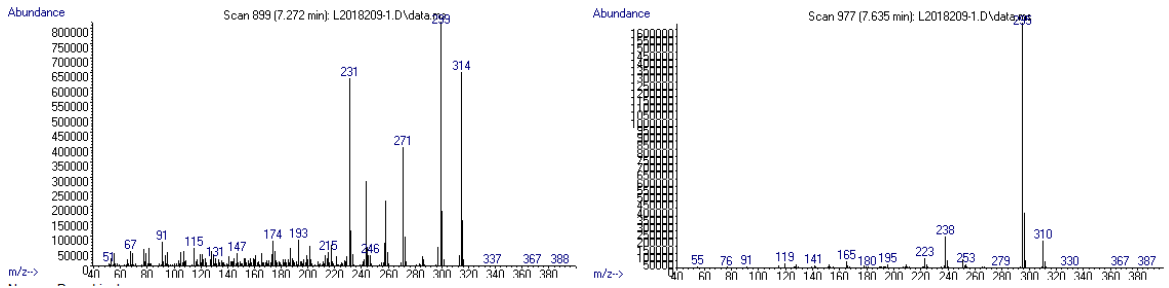
Anexo 3. Cromatogramas y Espectros de masas de muestras problema

LAES2018-201



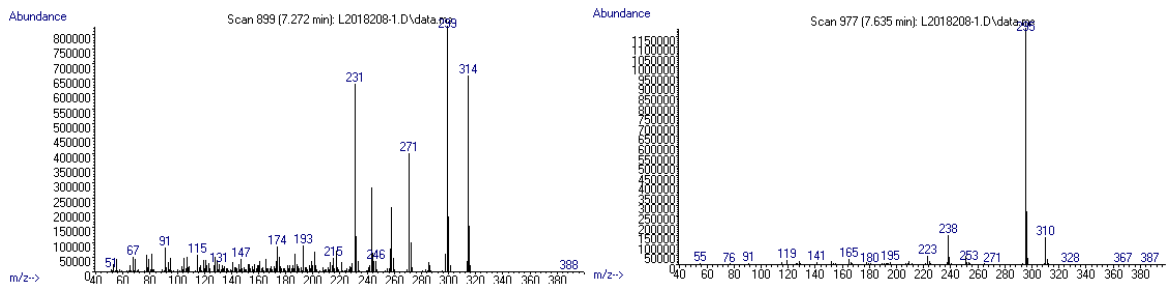
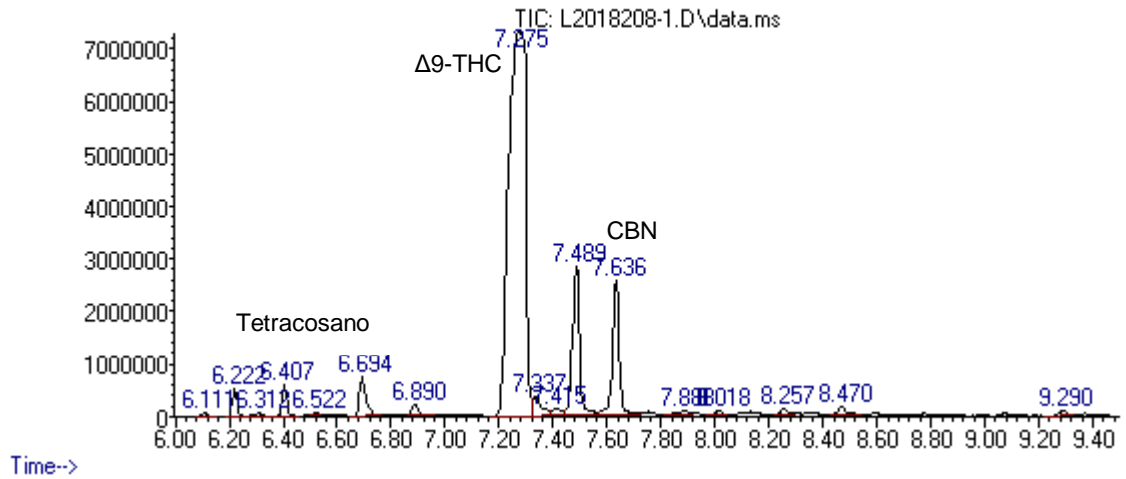
LAES2018-209





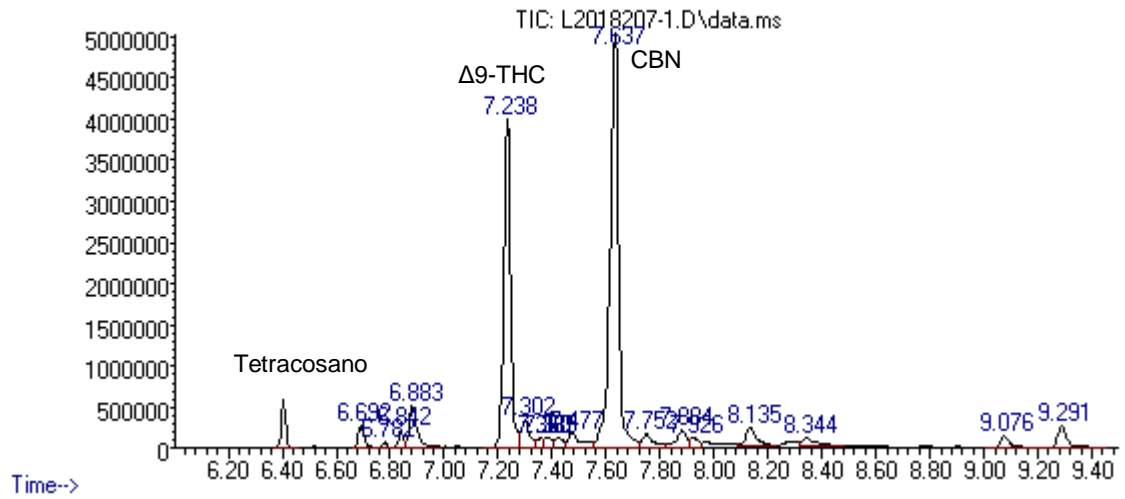
LAES2018-210

Abundance

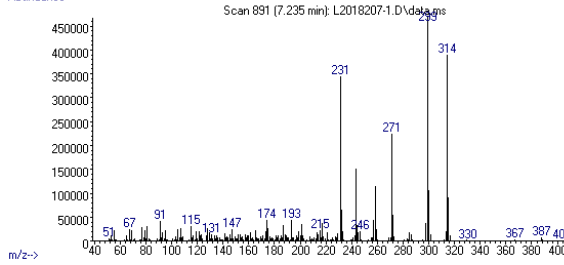


LAES2018-229

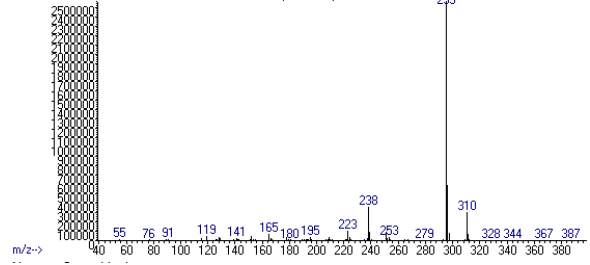
Abundance



Abundance

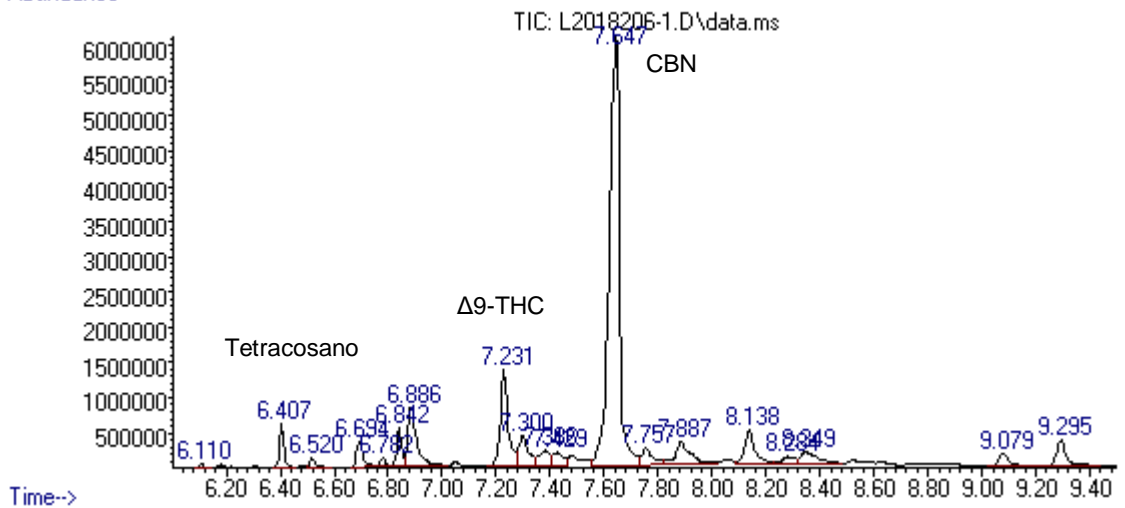


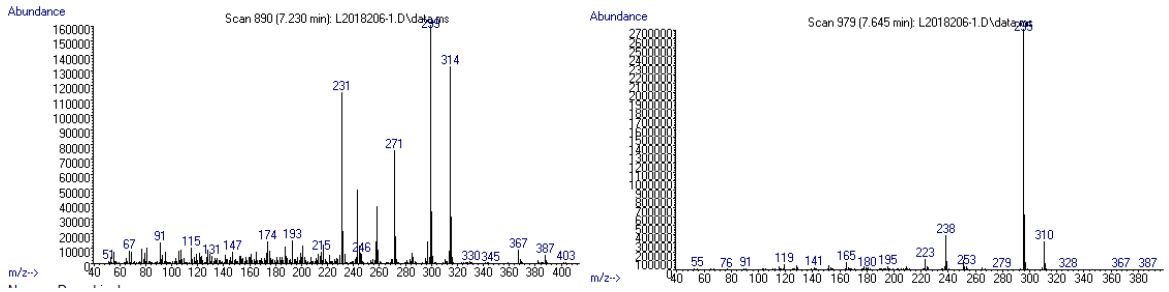
Abundance



LAES2018-230

Abundance





LAES2018-236

Abundance

