



Anales
de la Universidad
de Chile

Tabla de Contenidos

Número Actual

Números Anteriores

Presentación

Reseña Histórica

Numeración y Series

Comité Editorial

Normas Editoriales

— Toxicología

[Detección de cocaína y metabolitos en pelos de consumidores. Determinación de niveles de corte.]

Báez G., Hernán, Prof. *, Camargo, Cristián, Prof. * y Guerrero, Ethel **

Laboratorio Análisis Antidoping Universidad de Chile*
Instituto Medico Legal de Chile**

▣ Cita / Referencia

Báez G., Hernán, Prof., Camargo, Cristián, Prof. y Guerrero, Ethel. Detección de cocaína y metabolitos en pelos de consumidores. Determinación de niveles de corte.. Anales de la Universidad de Chile. VI serie: N°11, agosto 2000

▣ http://www2.anales.uchile.cl/CDA/an_completa/0,1281,SCID%253D3587%2526ISID%253D7%2526ACT%253D0%2526PRT%253D3524,00.html

▣ Introducción

Durante los últimos años el problema del consumo de drogas ha estado generando una gran preocupación en la sociedad chilena. Las estadísticas de 1996 informan que aproximadamente 350 mil chilenos de edades entre 12 y 64 han probado cocaína y más de 1 millón han experimentado con la marihuana a lo menos una vez en sus vidas. Alrededor de cien mil han usado marihuana y unos cincuenta mil cocaína durante el último año(1).

El examen usual para detectar el consumo reciente de drogas es el análisis de orina que se conoce como control de drogas. También se puede usar las matrices biológicas sangre o saliva para medirla cantidad real de drogas al momento de la toma de muestras. En estos momentos se describen en revistas especializadas innumerables trabajos sobre el análisis de pelo, pero todavía la comunidad científica no llega al consenso indispensable para determinar la exactitud, confiabilidad e interpretación de los resultados. Se requiere mayor investigación para llegar a establecer datos definitivos que permitan diferenciar claramente la incorporación interna de la contaminación externa, el efecto del tipo de pelo en la incorporación de la droga, tiempo de aparición de la droga, relación de la dosis versus concentración y los mecanismos de entrada de la droga en el pelo(2,3). Al presente el análisis de pelo es una herramienta analítica muy útil en la ciencia forense y en seguimiento de adicciones, porque permite obtener un registro histórico cuantitativo, desde meses hasta años, acerca de la severidad y modalidad de uso de una droga determinada(3).

En este trabajo hemos adaptado el método clásico de extracción, luego de hidrólisis ácida suave para el análisis de cocaína en pelo(2) incorporando algunas modificaciones que nos permitieron obtener un mayor grado de sensibilidad.

En los controles de drogas se practican normalmente dos ensayos, uno inicial o presuntivo, generalmente de carácter inmunológico y una prueba de confirmación para la identificación de una sustancia específica. En el caso presente la prueba inicial se hizo con Elisa Test Neogen metodología de bajo costo y alta sensibilidad y el procedimiento de confirmación de la cocaína y sus metabolitos con el sistema cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas(CG/EM). Con nuestra actual tecnología se ha logrado límites de cuantificación de 0.025 ng / mg pelo y de 0.020 ng / mg de pelo con una razón señal / ruido sobre 10, para la cocaína y benzoilecgonina, respectivamente.

El ordenamiento de los resultados permite hacer una primera aproximación para el cálculo científico de una concentración de corte usando un extracto equivalente a 50 mg de pelo. Se sugiere que para Chile sería realista aplicar una concentración de corte de 0.5 ng/mg de pelo cuando existan evidencias adicionales como análisis de orina y sangre, exámenes médicos y reconocimiento voluntario de consumo. Adicionalmente se puede usarla determinación de metabolitos, de manera especial el cocaetileno. En el caso de la presencia de cocaetileno en 25 muestras, esta sustancia estaba siempre asociada a un alto nivel de consumo de cocaína.

Si a nuestras cifras les aplicáramos las recomendaciones propuestas por Cone et al(4) y calculáramos el cociente benzoilecgonina / cocaína para distinguir la exposición pasiva del uso activo, en aquellas muestras en que se detectó benzoilecgonina, tendríamos un valor de 0.03, que sería consistente con el uso de cocaína.

▣ Materiales y métodos

Reactivos

Todos los reactivos y solventes utilizados fueron de grado cromatográfico proporcionados por Merck y Mallinkrodt, agua HPLC, metanol, acetona, diclorometano, hexano e isopropanol. Todos los otros reactivos fueron de grado analítico.

Agentes de derivatización: MSTFA (N-metil, N-trimetilsilil trifluoroacetamida) y TMSCl (trimetil cloro silano).

Columnas de separación en fase sólida: Baker Bond SPEtm Narc 2 (6mL, 250mg) de Mallinkrodt

Estándares de referencia: cocaína, metil ester, benzoilecgonina y cocaetileno fueron obtenidos de la firma Alltech Applied Science Laboratory.

Muestras de pelo

Las muestras corresponden a individuos de pelo negro con edades entre 24 y 48 años, algunos de los cuales han sido procesados por los Tribunales de justicia chilenos por uso y tráfico de cocaína. Las setenta muestras usadas en este estudio se obtuvieron de la manera usual, del vértice posterior, identificando cuidadosamente la raíz y se enviaron codificadas al laboratorio para su análisis.

Preparación de las muestras

En el análisis se utilizó el segmento de 4 cm, para obtener un calendario retrospectivo de uso de aproximadamente 3 meses.

100 mg de pelo se sometieron al proceso previo de lavado en la siguiente forma:

- a) 3 veces x 4ml de agua bidestilada tibia
- b) 3 veces x 4ml de acetona
- c) 3 veces x 4 ml de etanol absoluto
- d) 3 veces x 4 ml de diclorometano

Se juntan los lavados etanólicos y de diclorometano, se evaporan cuidadosamente a sequedad, menos de 40°C y en ambiente de N₂. El residuo seco se regenera con 100 µl de tampón fosfato pH7 y se práctica el análisis inmunológico de alta sensibilidad (0.4ng / ml) para controlar la posible presencia de cocaína en los lavados. Si esta prueba resulta positiva, los lavados deberían ser sometidos al mismo procedimiento que la muestra.

La muestra ya lavada se seca, se corta en pequeños segmentos de 1 mm y se pulveriza en mortero de porcelana. De este pulverizado se pese exactamente 50 mg aproximados, que se colocan en un tubo de 100 mm x 16mm, se adiciona 1ml de HCl 0.1N y se calienta toda la noche a 37°C. Se mide una pequeña alícuota de 50 µl se evapora a sequedad, se reconstituye con tampón fosfato pH6 100 µl, y se realiza el inmuno ensayo Elisa Neogen para determinar la presencia de cocaína siguiendo las intrucciones del fabricante, usando controles negativos y positivos(5).

A las muestras se adicionan 500 µl de tampón fosfato pH6, se homogeneiza en agitador vibrofix, alcanzando la solución un pH aproximado de 6 ± 0.5. En caso necesario se ajusta el pH con fosfato sódico monobásico o dibásico 100 mM. El siguiente paso es la extracción en columna NARC 2 en las condiciones señaladas por los fabricantes:

Extracción de las muestras en columnas NARC 2

Acondicionamiento

- 1 x 3 ml de metanol, aspirar
- 1 x 3 ml de agua, aspirar
- 1 x 1 ml fosfato pH6 100mM, aspirar

Carga de la muestra

La solución tamponada a pH 6 se carga en la columna, ajustando el Manifold a una velocidad de flujo de 1 - 2 ml / min.

Lavado de la columna

- 1 x 2 ml de agua, aspirar
- 1 x 2 ml de hexano* , aspirar
- 1 x 2 ml de metanol, aspirar Secar la columna durante 5 minutos a un vacío ≥ 10 mm de Hg.

Elución de la cocaína y sus metabolitos

- 1 x 3 ml de CH₂C₁₂ / IPA / NH 40H (7 8:20:2) , colectar el eluido a una velocidad de flujo de 1-2 ml / min.
- Evaporar a sequedad en ambiente de N₂ (temperatura no mayor de 40°C)

Derivatización

-Adicionar al residuo seco 100 ul de MSTFA / TMSCl 1% , calentar 30 min a 75°C en baño seco inyectar 2 ul de la mezcla en el equipo acoplado cromatografía de gases / espectrometría de masas.

*no indicado por el fabricante

Método instrumental

Después de enfriar se inyecta la mezcla en un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 A acoplado a un detector selectivo de masas 5972. La columna capilar utilizada fue una HP - Ultra 1 enlazada de metil silicona (25 m x 0.2 mm d.i. x 0.11 um de espesor de película). El portal de inyección en el modo sin división de flujo (0.8 min) a 250°C y la interfase a 280°C. El horno fue programado a 150°C con un incremento de 20°C min hasta alcanzar 300°C, temperatura que se mantiene por 10 min. El gas transportador, helio de alta pureza, se usó a una velocidad de flujo de 0.9 ml / min. El equipo fue utilizado con impacto electrónico a 70 eV y el electromultiplicador posicionado a + 400 mV sobre el voltaje de la autocalibración. El procedimiento de sintonía se realizaba diariamente con perfluorotributilamina.

Modalidad SIM

Se utilizó el modo SIM, con un ión para cuantificar y dos iones de confirmación para la cocaína y sus metabolitos. El ion de cuantificación y los de confirmación fueron monitoreados con un tiempo de residencia (dwell time) de 20 milisegundos, con el siguiente orden de elución incorporado a un Macro Deuser:

1. Ecgonina metil éster: (96), 82, 271
 2. Cocaína : (182), 82, 303
 3. Cocaetileno : (196), 82, 317
 4. Benzoilecgonina : (240), 82, 361
- Entre paréntesis se indican los iones usados en la cuantificación.

Preparación de la curva de calibración

Se preparó la curva con 9 niveles para la cocaína, 8 niveles para la benzoilecgonina y 6 niveles para la cocaetileno. En cada corrida se utilizó 2 controles para verificar la exactitud de la curva, uno de 10 ng / 10 mg y otro de 50 ng / 10mg de pelo. La matriz pelo negativa utilizada para la curva y los controles fue previamente sometida a controles por Elisa y espectrometría de masas. Los límites de detección se estimaron con una razón señal / ruido > de 5 y el límite de cuantificación con una razón > de 10 (Tabla 1. Figura 1 y 2).

Figura 1.

Curva de calibración sim para cocaína y benzoilecto en pelo (ng totales)

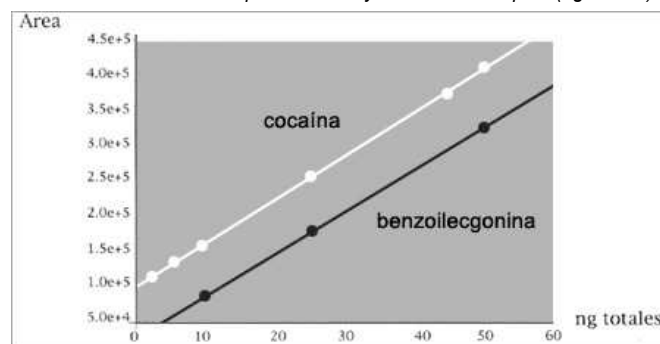
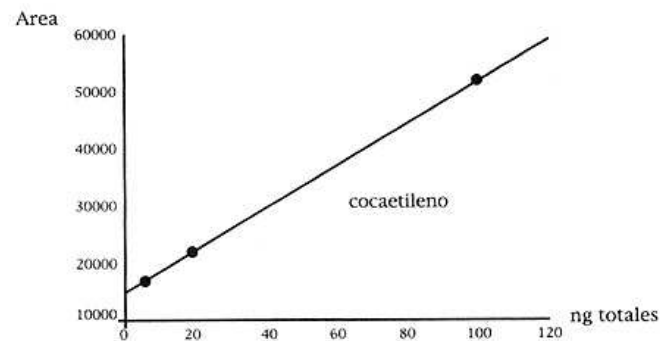


Figura 2.

Curva de calibración modo sim para cocaetileno en pelo (ng totales)



Identificación

La identificación se estableció de acuerdo a los siguientes parámetros universalmente aceptados:

- Tiempo de retención de la sustancia problema debe quedar dentro de $\pm 2\%$ del tiempo de retención de la sustancia de referencia.
- Todos los iones deben aparecer en el mismo tiempo de retención.
- Las intensidades relativas comparadas con auténticas sustancias de referencia certificadas, no deben tener diferencias superiores al 10% .
- En el modo Scan se debe obtener un espectro problema similar al de la sustancia de referencia.

Resultados y discusión

- Se desarrolló un método analítico de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, para la detección e identificación de cocaína y sus posibles metabolitos en pelo, el equipo se operó en la modalidad SIM, con un monitoreo de 3 iones; por droga. La cuantificación se basó en el método de curvas de calibración construidas con el sistema de niveles múltiples, cubriendo el rango esperado y también con niveles sobre y bajo este rango de concentración. Se obtuvo un excelente diseño de las curvas y en todos los casos con $R > 0.98$.
- El límite de detección se calculó con una razón señal /ruido: $S / R > 5$.
- El límite de cuantificación se estimó con un cociente : $S / R > 10$.

Tabla N° 1: Límites de detección y cuantificación (en 50 mg de pelo).

Droga	Límite de detección	Límite de cuantificación
Cocaína	0.63	1.25
Benzoilecgonina	0.50	1.00

Cocaetileno	0.63	1.2 5
-------------	------	-------

El sistema de análisis estudiado permite la fácil detección e identificación de la cocaína y sus metabolitos en una muestra de 50 mg de pelo.

En la tabla 2 se dan los resultados de concentraciones de cocaína que han publicado diferentes autores(6).

Tabla N° 2 : Concentraciones de cocaína (ng/mg) en pelo

Referencia	Rango	Media
Kintz	0.4 - 78,4(14)	8.3
Cone et al	6.4 - 19.2 (10)	10.05
Moeller et al	0.3 - 127(34)	20.06
Báez et al	0.5 - 137(66)	16.3

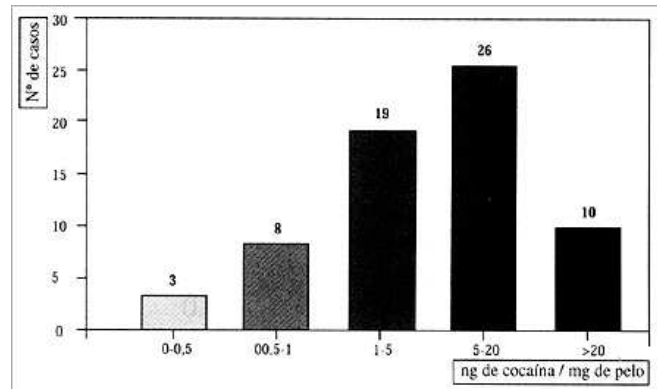
Los resultados de los casos positivos aparecen en la tabla N°3. Con estos resultados es posible hacer una primera aproximación para el cálculo de las concentraciones de corte (cut-off).

Tabla N° 3 : Concentraciones de cocaína en ng/mg, rangos estimados y número de casos

Concentración de cocaína(rangos)	Número de casos
0.00 - 0.50	3
0.50 - 1.00	8
1.00 - 5.00	19
5.00 - 20.00	26
>20.00	10
Totales	66

Figura 3

Distribución de las concentraciones de cocaína detectadas en pelo entre los meses de noviembre 97 hasta agosto 98.



Una de las pesquisas más impactantes es que aproximadamente en el 23% de las muestras positivas, se detecta la cocaína en ausencia de cualquiera de sus metabolitos.

- Pareciera que la detección de metabolitos de cocaína, se incrementa con las concentraciones altas de cocaína.
- Cuando se detecta únicamente cocaína, por lo general las concentraciones son bajas, fluctúan entre 0.3 y 5.4 ng /mg de pelo.

El cocaetileno se identificó en 2 5 muestras, en todos los casos la cantidad de cocaína superaba los 3 ng / mg. (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración de cocaína y cocaerileno en muestras de pelo

Muestra	(Cocaína)	(Cocaetileno)
1	3.1	0.46
2	2.5	0.51
3	8.5	0.60
4	8.2	0.72
5	3.5	0.78
6	8.9	0.81
7	10.3	1.1
8	3.5	1.2
9	4.3	1.2
10	4.5	1.3

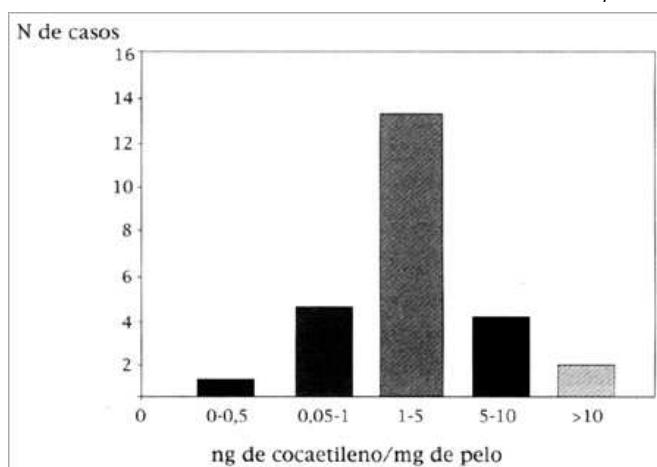
11	10.2	1.4
12	4.3	1.7
13	24.3	1.6
14	10.4	2.2
15	14.7	2.7
16	14.7	3.1
17	10.4	3.2
18	12.0	3.5
19	31.2	6.0
20	21.0	7.5
21	20.7	7.7
22	45.0	8.9
23	189.0	9.7
24	130.0	18.2
25	137.0	21.0

Tabla 5. Concentración de cocaetileno en ng / mg, en rangos estimados y número de casos.

Concentración de cocaetileno (rangos)	Número de casos
0.00 - 0.50	1
0.50 - 1.00	5
1.00 - 5.00	13
5.00 - 10.00	4
> 10.00	2
totales	25

Figura 4.

Distribución de las concentraciones de cocaetileno detectadas en pelo



-En general para prevenir los falsos positivos debido a la contaminación externa, se observa que es necesario detectar la cocaína en una concentración adecuada y en ausencia del metabolito benzoilecgonina.

-La distribución de las concentraciones de cocaína(Fig.3) sugiere que un corte de concentración (cut-off) de 1 ng/mg de pelo sería realista, pero este corte dejaría 11 de los 68 análisis como negativos.

-Se podría asumir una mejor aproximación disminuyendo el corte a 0.5 ng/mg de pelo, cuando el consumo de cocaína se sustenta en evidencias adicionales como análisis complementarios de orina, de sangre, exámenes médicos y reconocimiento voluntario de consumo. En este caso quedarían como negativas únicamente 3 muestras.

-Para tener una mayor conformidad con respecto al problema de la exposición pasiva, se podría asociar la determinación de cocaína a la cuantificación de sus metabolitos, de manera especial el cocaetileno. Para dar un ejemplo en el caso de la concentración de 137 ng / mg de cocaína, el alto consumo se prueba con una concentración de 21 ng / mg de cocaetileno.

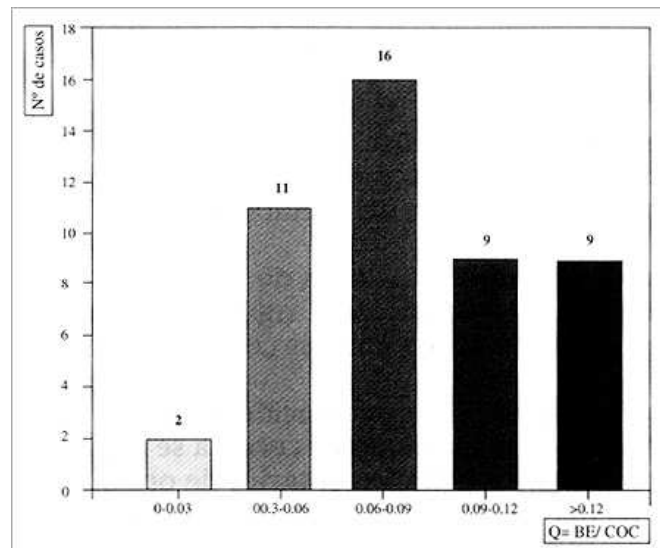
-También se puede usar como propone el Prof.Cone, el radio benzoilecgonina/cocaína (BE/COC) para diferenciar contaminación ambiental del consumo activo de la droga. Con nuestros resultados un cociente de mayor de 0.03 pareciera ser consistente con el uso de la droga; únicamente 2 muestras del total de 47 en que se detectó benzoilecgonina, serían consideradas como negativas (Tabla 6).

Tabla 6. Radio Benzoilecgonina/Cocaína

N° de muestras	(BE / COC
2	0.00 - 0.03
11	0.03 - 0.06

16	0.06 - 0.09
9	0.09 - 0.12
9	> 0.12

Figura 5.
Distribución de los radios BE/COC en las 47 muestras en que se detectó BE.



Es importante destacar que la incorporación de una fase de lavado con hexano permitió reclasificar muestras inicialmente negativas como positivas. Se elimina en gran parte la interferencia de los ácidos grasos: ácido hexadecanoico, ácido heptadecanoico, ácido oleico y ácido octadecanoico.

Bibliografía

1. CONACE. *Segundo Estudio Nacional de Consumo de Drogas, 1996. Santiago, Marzo 1997.*
[volver](#)
2. PASCAL KINTZ. *Drug Testing in Hair. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1996.*
[volver](#)
3. W. A. BAUMGARTNER ET AL. *Hair Analysis for Drugs of Abuse. J. of Forensic Science, vol 34, N° 6, Nov 1989.*
[volver](#)
4. E. J. CONE ET AL. *Differentiation of environmental drug exposure from active use in hair analysis for drugs of abuse. Second International Meeting on Clinical and Forensic Aspects of Hair Analysis, Genoa, Italy, 6 - 8 June, 1994.*
[volver](#)
5. NEOGEN CORPORATION. *Elisa Technologies Racing Manual, 1995.*
[volver](#)
6. P. KINTZ, P.MANGIN. *What constitutes a positive result in hair analysis: proposal for the establishment of cut-off values. Forensic Sci. Int. 70 3-11, 1995.*
[volver](#)

[Introducción](#) | [Materiales y métodos](#) | [Resultados y discusión](#) | [Bibliografía](#) | [Versión Completa \(Imprimir\)](#)

Sitio desarrollado por [SISIB - Universidad de Chile](#)