

Validación de un método rápido en orina por LC/MS/MS para la búsqueda de compuestos empleados en sumisión química y su aplicación a muestras reales
Validation of a fast screening method in urine by LC/MS/MS for compounds used in drug-facilitated crime (DFC) and its application to real samples

Rubio, Nélica Cristina^{1*}; Márquez, Cecilia²; Confalonieri, Adriana²

¹Laboratorio de Toxicología, San Martín 565, Cipolletti,-Río Negro, Argentina. ²Centro de Alta Tecnología Analítica (CATA), B.Mitre 3690, Munro, Bs.As. Te: 54-11-4509-9000

*cristinarubio2@gmail.com

Recibido: 1 de mayo de 2015

Aceptado: 22 de marzo de 2016

Resumen. La Oficina de Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC) en 2011 señala que “El delito facilitado por drogas (DFD) es una expresión general que abarca la violación y otras agresiones sexuales, el robo con violencia o intimidación, la extorsión de dinero y los malos tratos deliberados de ancianos o niños bajo la influencia de sustancias sicotrópicas”. En este trabajo se validó un método cualitativo y rápido a partir de muestras de orina por LC/MS/MS para 39 compuestos comprendidos en los listados de sumisión química. El objetivo fue alcanzar un límite de detección un 50 % por debajo de la concentración propuesta como “Límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL)” por la UNODC, para poder ser aplicado a muestras reales.

Palabras claves: Delitos facilitados por droga; Sumisión química; LC/MS/MS; Validación

Abstract. The United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) in 2011, states that "The Drug-facilitated crime (DFC) is a general term that includes rape or other sexual assault, robbery, money extortion, as well as the deliberate maltreatment of the elderly or children under the influence of psychotropic substances". In this work we validated a qualitative and fast method from urine samples by LC/MS/MS for 39 compounds included in the Drug-facilitated crime lists.

The aim was to reach a detection limit of 50% below the proposed concentration as "minimum required performance limits (MRPL)" by UNODC in order to be applied in real samples.

Keywords: Drug-facilitated crime; DFSA; LC/MS/MS; Validation

Introducción

En los últimos años los delitos facilitados por drogas (DFP) han tomado notoriedad en los medios y en el ámbito científico se ha incrementado el número de publicaciones científicas como así también las recomendaciones y procedimientos a seguir en la investigación y análisis toxicológico cuando se aborda este tema como consecuencia del aumento de las denuncias en prácticamente todo el mundo (LeBeau 1999; EMCDDA 2008; García-Repetto y col. 2011; UNODC 2011; García-Caballero y col. 2014; Xifró y col. 2014).

La UNODC (2011) establece que: “El delito facilitado por drogas (DFD) es una expresión general que abarca la violación y otras agresiones sexuales, el robo con violencia o intimidación, la extorsión de dinero y los malos tratos deliberados de ancianos o niños bajo la influencia de sustancias sicotrópicas”. Dentro de este grupo de delitos la víctima se encuen-

tra incapacitada de rechazar a su atacante y está presente la agresión sexual facilitada por drogas (ASFD) o DFSA (Drug-facilitated sexual assault) según sus siglas en inglés.

En este tipo de delitos el victimario le suministra a la víctima (voluntaria o involuntariamente) en el alimento o bebida alguna sustancia con el objeto de menoscabar su capacidad de decidir. La víctima podrá sentirse relajada, eufórica, desinhibida, con dificultades en el habla y el equilibrio, pudiendo estar somnolienta, inconsciente o incluso llegar a la muerte. A esto debemos sumar que la víctima recuperada tiene afectada en general su memoria. La razón de que muchas de las drogas que se emplean para cometer este tipo de ilícitos afectan la memoria hace que el hecho no se denuncie o se lo haga con retraso.

Las sustancias que mayoritariamente son encontradas en la comisión de estos delitos

(Djezzar 2009; LeBeau 2010; Jones y col. 2012), son el alcohol, otras como el hidrato de cloral, GHB o los z-hipnóticos, las benzodiazepinas, etc. y raramente son detectadas en medios biológicos, en parte debido a sus cortas vidas medias o porque al momento de la toma de la muestra están por debajo del límite de detección del método a ser empleado. El laboratorio de toxicología forense requiere para la resolución analítica de las muestras a analizar (sangre y orina o cabello en los casos que el incidente sea denunciado con retraso de varios días), de técnicas analíticas sensibles y específicas. Como aconseja la UNODC aquellas técnicas como los inmunoensayos y técnicas enzimáticas que tienen límites de detección muy altos deberían evitarse o bien interpretarse con cautela los resultados negativos. Son recomendados “encarecidamente” (UNODC 2011) los métodos de cromatografía líquida- espectrometría de masas (LC/MS), cromatografía líquida- tándem masas (LC/MS/MS) y cromatografía gaseosa- tándem masas (CG/MS/MS) por su sensibilidad y selectividad más elevada.

El objetivo de este trabajo fue validar una técnica cualitativa a partir de orina por LC/MS/MS que cumpla con los niveles de detección recomendados para las sustancias investigadas. Se empleó un método directo de inyección conocido como “diluir e inyectar” (“dilute and shoot”) para la mayoría de ellas y para aquellos compuestos que no cumplían con el requerimiento de detección se empleó una extracción líquido-líquido. Se aprovechó, en este caso, una de las ventajas del LC/MS/MS sobre el CG/MS que es su mayor sensibilidad, poder inyectar directamente o previa dilución una muestra de orina sin la necesidad de someterla a un tratamiento térmico que puede afectar a moléculas térmicamente lábiles y sin necesidad de extracciones y/o derivatizaciones previas. Esto hace que se disminuya el tiempo de análisis y según Fitzgerald y col. (2012) también el costo al no necesitarse el empleo de cartuchos de extracción.

Se monitorearon 39 sustancias de las reportadas comúnmente en la bibliografía internacional en casos de ASFD (Djezzar y col. 2009; García-Repetto y col. 2011; European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) 2008; García-Caballero y col. 2014) y se estableció como objetivo fijar el límite de detección del método en un 50 % de la concentración propuesta como “Límites

mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL)” por la UNODC (2011) (LeBeau 2010). En la *Tabla 1* se detalla el listado de sustancias buscadas, sus MRPL y la concentración objetivo a alcanzar.

Se empleó una técnica de cromatografía líquida acoplado a tándem espectrometría de masa (LC/MS/MS), utilizando un equipo Agilent Technologies UPLC 1290 Infinity, Triple Quad LC/MS 6460.

El método se validó siguiendo la guía de validación propuesta por el Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX, 2013) para métodos cualitativos de identificación/confirmación y los parámetros validados fueron: carryover, interferencias, efecto matriz (ionization suppression/enhancement), límite de detección, estabilidad y criterios de identificación según la Guía Alemana de la Sociedad de Toxicología y Química Forense - GTFCh (2009).

Los objetivos propuestos se cumplieron para toda la lista de sustancias ensayadas por dilución e inyección, con excepción de la morfina para lo cual se utilizó un método de extracción líquido-líquido empleado para screening en cromatografía líquida- arreglo de diodos (HPLC/DAD) según Pragst y col. (2004).

El método desarrollado se aplicó a cinco muestras provenientes de víctimas que denunciaron haber sido abusadas sexualmente, pero que no recordaban que había sucedido durante los momentos previos al despertar, en lugares y con personas del sexo opuesto, en general desconocidas. No se dispuso del tiempo exacto del momento de la toma de la muestra, pero se estimó mayor a 24 horas de ocurrido el hecho.

Materiales y métodos

Solventes y reactivos

Los solventes usados en la fase móvil y en la extracción fueron: acetonitrilo: Carlo Erba -HPLC-Gold-ultragrado; agua: ultrapura partiendo de agua grado HPLC ultra pura y obtenida en el purificador Barnstead Easy Pure II; ácido fórmico: Drowil grado HPLC; diclorometano: Panreac Química Sau-España, grado HPLC.

El Tris empleado fue de grado de pureza analítica de Merck Argentina.

Sustancias de referencia

Las sustancias de referencia fueron obtenidas del Programa Internacional de Aseguramiento

Tabla 1. Clasificación de los compuestos analizados, concentraciones MRPL, concentración objetivo a alcanzar y concentración a la cual son detectadas con el método empleado.

SUSTANCIA	MRPL ¹ (ng/mL)	Objetivo (50 % MRPL)	Concentración (ng/mL)					
			0,5	5,0	20	40	100	200
Alprazolam	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Bromazepan	10	5,0	ND	D	D	D	D	D
Clonazepan	5	2,5	D	D	D	D	D	D
Clordiazepóxido	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Diazepam	10	5,0	ND	D	D	D	D	D
Flunitrazepán	5	2,5	D	D	D	D	D	D
7-aminoflunitrazepán	5	2,5	D	D	D	D	D	D
Lorazepam	10	5,0	ND	D	D	D	D	D
Lormetazepam	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Midazolam	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Nordiazepán	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Oxazepán	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Prazepam	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Temazepam	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Clobazam	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Zolpidem y metabolitos	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Zopiclona y metabolitos	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Amitriptilina	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Nortriptilina	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Fluoxetina	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Haloperidol	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Codeína	10	5,0	ND	D	D	D	D	D
Metadona	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Dextropropoxifeno	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Tramadol	10	5,0	D	D	D	D	D	D
6-monoacetilmorina (MAM)	10	5,0	ND	D	D	D	D	D
Codeína	10	5,0	ND	D	D	D	D	D
Morfina (*)	10	5,0	ND	ND	ND	D	D	D
Benzoilecgonina	50	25,0	D	D	D	D	D	D
Cocaína	50	25,0	D	D	D	D	D	D
Metilecgonina	50	25,0	ND	D	D	D	D	D
Anfetamina	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Metanfetamina	10	5,0	D	D	D	D	D	D
MDA	10	5,0	D	D	D	D	D	D
MDEA	10	5,0	D	D	D	D	D	D
MDMA	10	5,0	D	D	D	D	D	D
Ketamina	1	0,5	D	D	D	D	D	D
Norketamina	1	0,5	D	D	D	D	D	D
Carbamacepina	No incluida	0,5	D	D	D	D	D	D
Mirtazapina	No incluida	0,5	D	D	D	D	D	D

¹MRPL: límites mínimos de funcionamiento exigidos por la UNODC en orina.

D= detectado

ND= no detectado

(*) Con la técnica de dilución-inyección. (Con la extracción Líq-Líqu se lograron detecciones de 5 ng/ml).

Tabla 2. Iones precursores y transiciones (MRM), energías de colisión, celda de aceleración, tiempo de retención, ventana de medición y polaridad de los compuestos analizados.

Compuesto	Ion Precursor	Ion Proucto	EC (V)	Celda Acel. (V)	Tpo.ret. (min)	Ventana de medición	Polaridad
1 7-Aminoflunitrazepam	284,1	135,1	26	7	4,1	1	Positiva
7-Aminoflunitrazepam	284,1	77,1	74	7	4,1	1	Positiva
2 Alprazolam	309,1	205,1	46	7	7,88	1	Positiva
Alprazolam	309,1	151,1	74	7	7,88	1	Positiva
3 Amitriptilina	278,2	105,1	22	7	7,83	1	Positiva
Amitriptilina	278,2	91	20	7	7,83	1	Positiva
4 Anfetamina	136,1	119,1	4	7	2,48	1	Positiva
Anfetamina	136,1	91,1	16	7	2,48	1	Positiva
5 Benzoylecgonine	290	168	17	7	4,05	1	Positiva
Benzoylecgonine	290	105	35	7	4,05	1	Positiva
6 Bromazepam	316	288	20	7	6,28	1	Positiva
Bromazepam	316	209	30	7	6,28	1	Positiva
7 Carbamazepina	237	194	15	7	7,7	1	Positiva
Carbamazepina	237	179	35	7	7,7	1	Positiva
8 Clordiazepóxido	300,1	227	22	7	5,54	1	Positiva
Clordiazepóxido	300,1	89,1	74	7	5,54	1	Positiva
9 Clobazam	301	259	29	7	8,1	1	Positiva
Clobazam	301	224	47	7	8,1	1	Positiva
10 Clonazepam	316,1	270	22	7	7,9	1	Positiva
Clonazepam	316,1	214	46	7	7,9	1	Positiva
11 Cocaína	304,3	182,3	20	7	5,2	1	Positiva
Cocaína	304,3	82,2	25	7	5,2	1	Positiva
12 Codeína	300,2	215	24	7	2,45	1	Positiva
Codeína	300,2	165	48	7	2,45	1	Positiva
13 Dextropropoxifeno	340,3	266,3	5	7	7,82	1	Positiva
Dextropropoxifeno	340,3	58	13	7	7,82	1	Positiva
14 Diazepam	285,1	193,1	32	7	8,08	1	Positiva
Diazepam	285,1	91,1	52	7	8,08	1	Positiva
15 EME	201	182,1	18	7	0,33	1	Positiva
EME	201	82,1	26	7	0,33	1	Positiva
EME	201	67,1	66	7	0,33	1	Positiva
16 Flunitrazepam	314,1	268,1	25	7	8	1	Positiva
Flunitrazepam	314,1	239,1	37	7	8	1	Positiva
17 Fluoxetina	310	43,7	10	7	7,9	1	Positiva
18 Haloperidol	376	165,1	15	7	7,6	1	Positiva
Haloperidol	376	123,1	20	7	7,6	1	Positiva
19 Ketamine	238,1	179	15	7	3,9	1	Positiva
Ketamine	238,1	125	20	7	3,9	1	Positiva
20 lorazepam	321	303	8	7	7,9	1	Positiva
lorazepam	321	229	28	7	7,9	1	Positiva
21 Lormetazepam	335	289	20	7	8,1	1	Positiva
Lormetazepam	335	177	40	7	8,1	1	Positiva





Tabla 2. Continuación

Compuesto	Ion Precursor	Ion Proucto	EC (V)	Celda Acel. (V)	Tpo.ret. (min)	Ventana de medición	Polaridad
22 6-MAM	328,2	211	15	7	3,23	1	Positiva
6-MAM	328,2	165	20	7	3,23	1	Positiva
23 MDA	180,1	163,1	4	7	2,9	1	Positiva
MDA	180,1	105,1	24	7	2,9	1	Positiva
24 MDEA	208,1	163,1	8	7	3,7	1	Positiva
MDEA	208,1	105,1	28	7	3,7	1	Positiva
25 MDMA	194,1	163,1	8	7	3,17	1	Positiva
MDMA	194,1	105,1	24	7	3,17	1	Positiva
26 Metanfetamina	150,1	119,1	8	7	2,86	1	Positiva
Metanfetamina	150,1	91,1	20	7	2,86	1	Positiva
27 Metadona	310,3	265	10	7	7,84	1	Positiva
Metadona	310,3	105	25	7	7,84	1	Positiva
28 Midazolam	326,1	291,1	29	7	6,7	1	Positiva
Midazolam	326,1	249,1	41	7	6,7	1	Positiva
29 Mirtazapina	266	195	25	7	3,87	1	Positiva
Mirtazapina	266	72	20	7	3,87	1	Positiva
30 Morfina	286,2	181	40	7	0,36	2	Positiva
Morfina	286,2	165	44	7	0,36	2	Positiva
31 Nordiazepam	271	165	27	7	7,8	1	Positiva
Nordiazepam	271	140	25	7	7,8	1	Positiva
32 Norketamina	224	207	10	7	3,7	1	Positiva
Norketamina	224	125	33	7	3,7	1	Positiva
33 Nortriptilina	264	233	10	7	7,8	1	Positiva
Nortriptilina	264	91	25	7	7,8	1	Positiva
34 Oxazepam	287,1	269	8	7	7,84	1	Positiva
Oxazepam	287,1	241	20	7	7,84	1	Positiva
35 Prazepam	325	271	31	7	8,4	1	Positiva
Prazepam	325	141	53	7	8,4	1	Positiva
36 Temazepam	301,1	283	10	7	8,02	1	Positiva
Temazepam	301,1	255,1	18	7	8,02	1	Positiva
37 Tramadol	264	246	5	7	4,6	1	Positiva
Tramadol	264	58	15	7	4,6	1	Positiva
38 Zolpidem	308,2	263,1	24	7	5,5	1	Positiva
Zolpidem	308,2	235,1	36	7	5,5	1	Positiva
39 Zopiclona	389,1	245	13	7	4,66	1	Positiva
Zopiclona	389,1	217	33	7	4,66	1	Positiva

EC (V)=Energía de Colisión (voltio)

Celda de Acel. (V): Celda de Aceleración (voltio)

Tpo. Ret. (min.): tiempo de retención (minutos)

de la Calidad (IQAP) organizado por UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime) y de Cerillant-US. Todas ellas fueron previamente monitoreadas por HPLC/DAD y CG/MS para constatar su identidad y pureza.

Instrumental y software

Equipo: Agilent Technologies UPLC 1290 Infinity, con bomba binaria, ALS con termostizador, compartimiento de columna y detector Triple Cuadrupolo Agilent LC/MS 6460, fuente de ionización ESI con tecnología Jet Steam, y software de adquisición y de análisis de datos Mass Hunter revisión B.06.00

- Compartimiento de columna:
 - ✓ Columna: Agilent Eclipse Plus C18 RRHD, 1,8 μ m 2,1 x 50 mm
 - ✓ Temperatura: 25 °C
 - ✓ Filtro pre-columna "1290 Infinity In-line Filter, Agilent"
- Bomba:
 - ✓ Fase móvil: A: agua 0,1 % ácido fórmico. B: acetonitrilo 0,1 % ácido fórmico.
 - ✓ Flujo: 0,4 mL/min
 - ✓ Gradiente:
 - T₀ = 95 % A
 - T₁ = 95 % A
 - T₇ = 70 % A
 - T₈ = 5 % A
 - T₁₀ = 5 % A
 - T_{10,50} = 95 % A
- Volumen de inyección: 10 μ L con lavado de aguja
- Temperatura del inyector automático: 5°C
- Detector Triple Cuadrupolo:
 - ✓ Modo de ionización: ESI (+) (-)
- Parámetros de la fuente:
 - ✓ Gas Temp: 350 °C
 - ✓ Gas flow: 10 L/min
 - ✓ Nebulizer: 40 psi
 - ✓ Sheath gas heater: 300 °C
 - ✓ Sheath gas flow: 11 L/min
 - ✓ V_{Cap}: 4000 V+ y 4000 V-

En la *Tabla 2* se muestran para cada compuesto el ión precursor y el o los iones productos, la energía de colisión (CE), Celda de aceleración (CELL ACC), los tiempos de retención, la ventana de medición y polaridad. La adquisición fue hecha en modo dMRM (dynamic multi reaction monitoring).

Parámetros de la validación

Se siguieron los lineamientos de GTFCh (2009) y SWGTOX (2013).

Interferencias

Se analizaron diez (10) muestras de orina provenientes del staff del laboratorio quienes declararon no haber tomado medicación o haber tomado fármacos que no estaban en el listado de los compuestos a investigar.

Límite de detección (LD): se determinó fortificando en tres días distintos, tres blancos de orina de diferente origen corridos por duplicado, con una mezcla de los compuestos a buscar en seis concentraciones distintas: 0,5 ng/mL, 5,0 ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL, 100 ng/mL y 200 ng/mL. Como criterio de LD se consideró aquella señal del analito que fuera igual o superior 3 veces al nivel de ruido de la línea de base cercana al pico, este criterio fue aplicado para todos los iones (transiciones) analizados. Como criterio de identificación (para todas las señales por encima del LD) se aplicaron:

1. El modo dinámico Multiple Reaction Monitoring (dMRM), con selección de un precursor con dos transiciones (*Tabla 2*) y se adoptaron las siguientes tolerancias expresadas como un porcentaje del ión o transición tomando la media de testigos puros corridos en idénticas condiciones (*Tabla 3*):

Tabla 3. Tolerancias aceptadas de las intensidades relativas de los iones de diagnóstico.

Intensidad relativa (% del pico base)	Tolerancia permitida
≤ 10 %	± 50 %
10-20 %	± 30 %
20-50 %	± 25 %
> 50 %	± 20 %

En el caso de la fluoxetina se empleó un ión precursor con una sola transición.

2. La variación del tiempo de retención comparado con el testigo puro ± 5 %

Efecto matriz

Se valoró el efecto matriz sobre diez muestras de orina inyectadas con el solo tratamiento de una dilución al medio en fase móvil a la concentración propuesta como objetivo a alcanzar de 5 ng/mL en la mayoría de los

compuestos a analizar. Se comparó si hubo efecto de disminución o incremento de la ionización (*ionization supresion or enhancement*) con una mezcla de testigos puros diluidos al medio con fase móvil a igual concentración. Se obtuvieron las medias de las diez áreas de las orinas fortificadas a 5 ng/mL (Área 2) y las áreas medias de los testigos puros inyectados por triplicados a 5 ng/mL (Área 1), se estimó el efecto matriz de supresión /aumento aplicando la fórmula:

$$(\%) \text{ EFECTO MATRIZ} = \left(\frac{\text{ÁREA}_{\text{media 2}}}{\text{ÁREA}_{\text{media 1}}} - 1 \right) \times 100$$

Estabilidad

Congelado/descongelado: tres muestras de orinas blancas fortificadas a una concentración de 10 ng/mL con los compuestos a investigar es analizada por triplicado inmediatamente (tiempo 0) y luego de dos secuencias de congelado y descongelado de la muestra de orina a 24 hs y 48 hs. Se compararon las áreas a las 24 hs y 48 hs con las áreas obtenidas a tiempo 0. El criterio seguido para la selección de la concentración a ensayar de 10 ng/mL fue por ser, en general el máximo límite de detección propuesto para la mayoría de las sustancias del listado y además puede ser detectado el analito hasta con una pérdida del 50 %.

Permanencia en el vial de inyección en la bandeja del inyector automático durante 24 horas de las primeras muestras analizadas en el punto anterior.

Carryover

Se analiza la existencia de carryover inyectando muestras de orina blanco inmediatamente luego de inyectar mezclas de testigos de las sustancias analizadas. Las concentraciones empleadas para determinar la existencia de carryover fueron 20 ng/mL, 100 ng/mL y 200 ng/mL.

Muestras de orina

Diez muestras de orina blanco obtenidas del staff del laboratorio.

Muestras de orina blanco fortificadas con la mezcla de testigos a seis diferentes concentraciones. 0,5 ng/mL, 5 ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL, 100 ng/mL y 200 ng/mL.

Cinco (5) muestras de orina de víctimas de agresión sexual.

Procedimiento

Se emplearon dos métodos de preparación de las muestras de orina:

- ✓ Dilución-inyección: un (1) mL de orina se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos. Se tomó 0,5 mL del sobrenadante y se le agregó 0,5 mL de fase móvil (0,1 % de ácido fórmico en agua), se pasó por filtros de celulosa 13/20 de 0,2 µm marca Agilent. El filtrado fue colocado en insertos marca Agilent para su inyección.
- ✓ Extracción líquido-líquido de orina con diclorometano (Pragst y col. 2004): 0,5 mL de orina se colocaron en un tubo Eppendorf, se le agregó 0,1 mL de solución Tris (24,3 g en 1 L de H₂O, pH 9,0) y 0,4 mL de diclorometano. Se agitó en vortex por 1 minuto y se centrifugó por 5 minutos a 10000 rpm. Se separó el diclorometano y se evaporó a sequedad en corriente de nitrógeno. El residuo se disolvió en 0,2 mL de fase móvil, se filtró y el filtrado se colocó en insertos marca Agilent para su inyección.

Resultados

Como se muestra en la *Tabla 1* la mayoría de los compuestos tienen un límite de detección entre 2 y 20 veces por debajo de 10 ng/mL, valor fijado por el MRPL. La excepción fue la morfina que no alcanzó el límite de detección deseado de 5 ng/mL. Su límite de detección diluyendo la muestra con fase móvil 1:1 se encontró a una concentración de 40 ng/mL. En estas condiciones se observó un efecto matriz de supresión de la señal de la morfina cercano al 100 %, habiendo sido este efecto ya reportado por otros autores (Fitzgerald y col. 2012). El empleo de la extracción líquido-líquido con diclorometano permitió llegar al límite de detección deseado de 5 ng/mL.

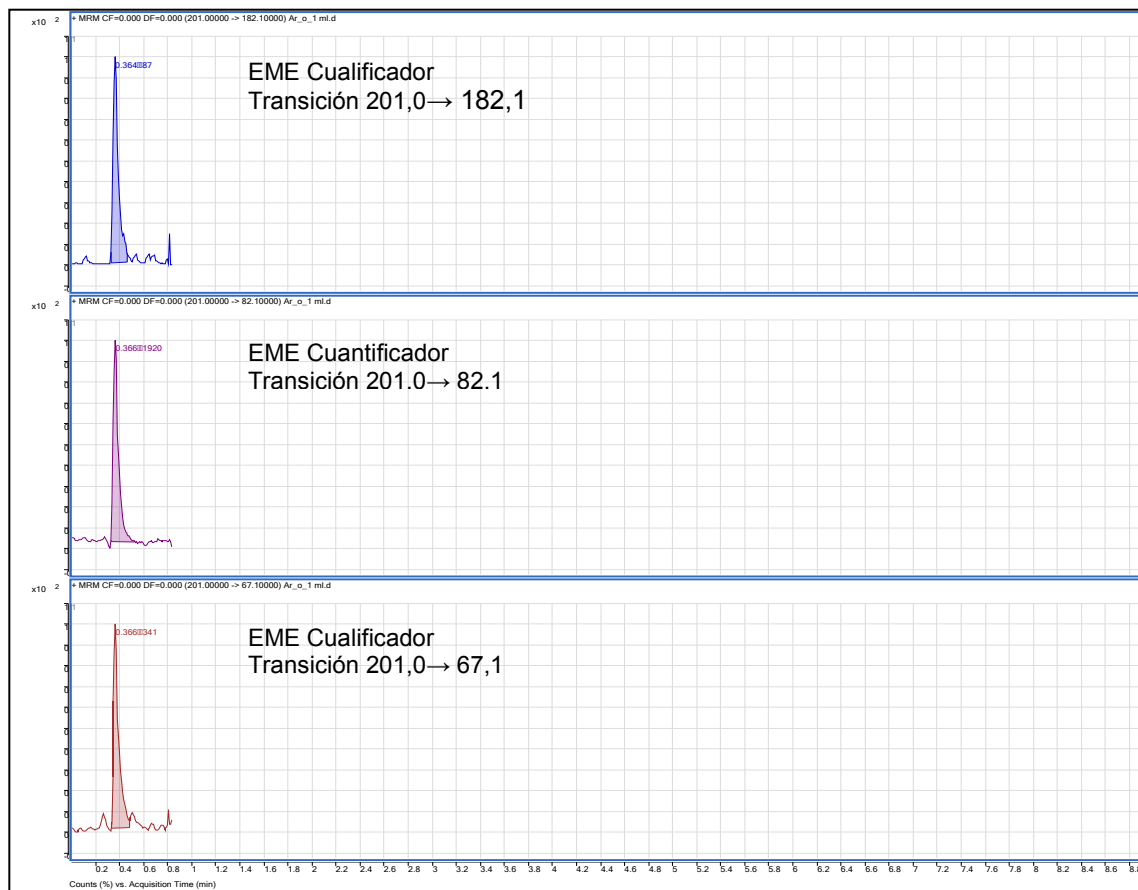
El método cumplió los criterios de identificación para todos los compuestos ensayados, con excepción de la fluoxetina en la que se investigó solo un ión precursor y una transición, no reuniendo los requisitos para su identificación por este método. Los hallazgos positivos deberán ser confirmados.

No se observó a la concentración de 0,5 ng/mL señales de interferencias con los compuestos analizados.

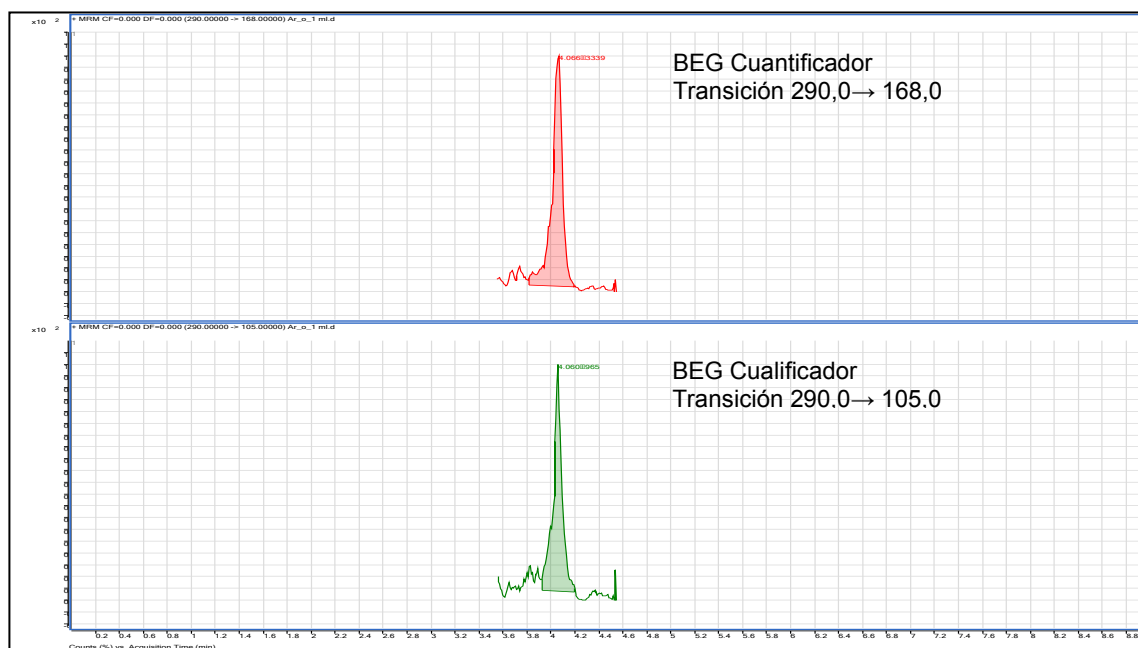
La metodología de dilución e inyección genera un importante efecto matriz, la cual se observó en la mayoría de las sustancias investigadas. La buena sensibilidad del instrumental permitió trabajar con este método. Los valores halla-

Figura 1. Cromatogramas de la orina de una víctima de sumisión química. A) EME: metilecgonina; B) BEG: benzoilecgonina; C) COC: cocaína; D) ALP: alprazolám.

A) EME: metilecgonina

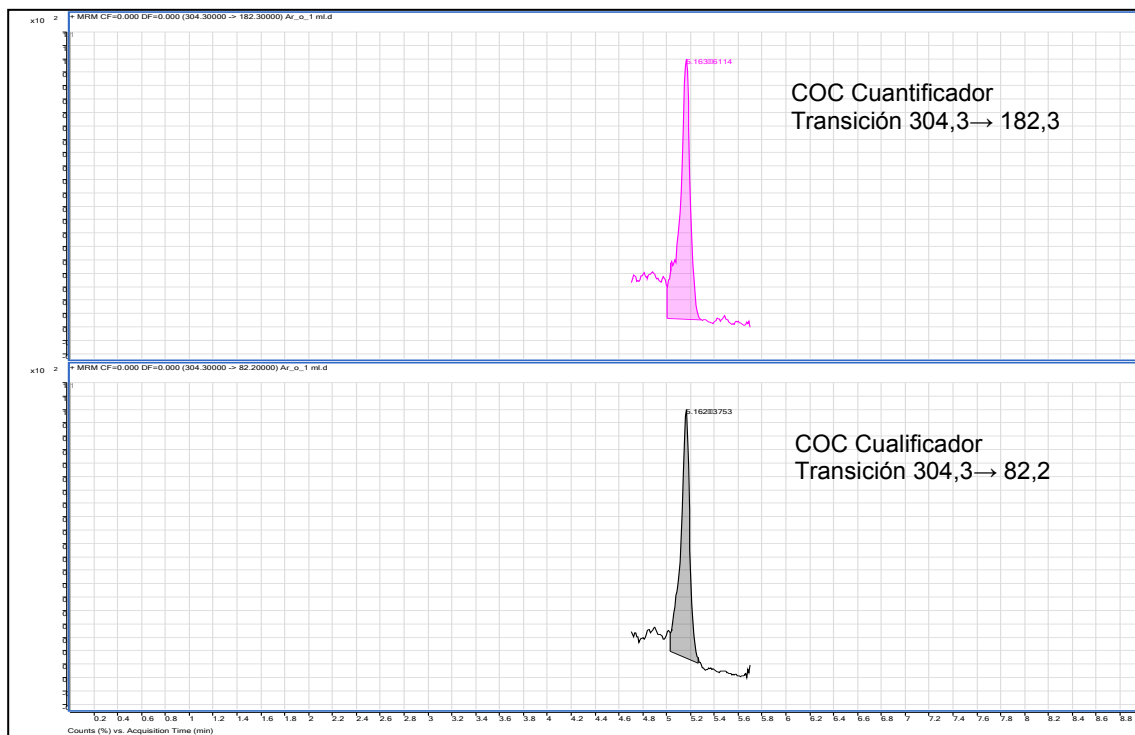


B) BEG: benzoilecgonina

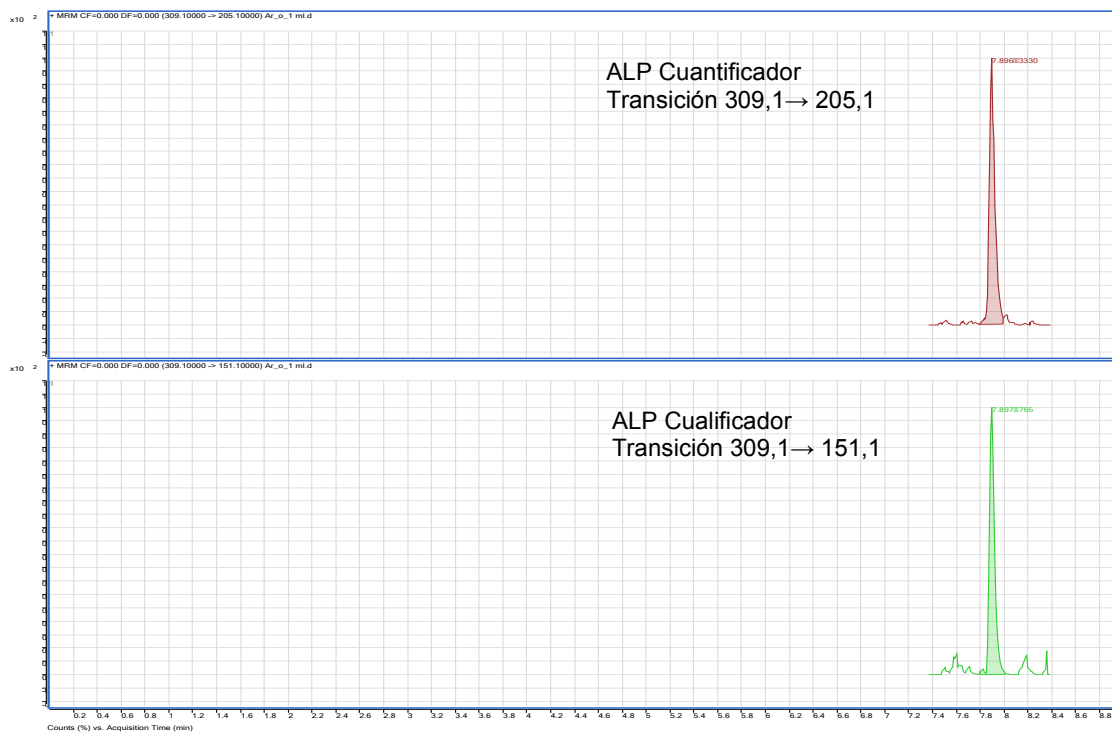




C) COC: cocaína



D) ALP: alprazolám



El método permite analizar 39 analitos en menos de 9 minutos. Es posible seguir agregando otros compuestos a esta lista y por sus exigencias en cuanto a bajos límites de detección, este método puede ser empleado en toxicología post-mortem y en toxicología clínica. En estos casos como es de esperar mayores concentraciones, puede iniciarse el análisis empleando diluciones mayores que disminuirían el efecto matriz y la acción del *carryover*.

El hallazgo de benzodiazepinas en muestras de orina de víctimas que habían denunciado abuso sexual, que previamente arrojaron resultados negativos por la técnica de CG/MS y HPLC/DAD corrobora la importancia de avalar la sugerencia dada en el manual de UNODC (2011) sobre la necesidad de emplear técnicas por tándem-masa como la acá empleada y trabajar en este tipo de muestras con los "Límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL)". Otros autores han reportado similares resultados cuando no se emplean técnicas de cromatografía tándem-masa (Tomina y col. 2015).

En las muestras de orina no es raro encontrar concentraciones superiores a 100 ng/mL por lo que sería de buena práctica inyectar un blanco luego de una muestra de orina para asegurar no arrastrar compuestos a la siguiente corrida.

Muchos de los compuestos analizados son eliminados como glucurónidos, el empleo de enzimas β -glucuronidasas previo a la dilución e inyección de la muestra puede favorecer la detección de los analitos a menores concentraciones.

En estudios preliminares se han obtenido buenos resultados en otras matrices biológicas como sangre, humor vítreo y bilis, de uso frecuente en toxicología forense post mortem.

Bibliografía citada

Djezzar S., Questel F., Burin E., Dally S. Chemical submission: results of 4-year French inquiry. *Int J Legal Med.* 2009;123:213-219.

European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) [en línea]. Sexual assaults facilitated by drugs or alcohol. 2008. [Consulta: 10 de enero de 2015]. Disponible en: http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/507/TDS_sexual_assault_94378.pdf

Fitzgerald R.L., Griffin T.L., Yu Y-M., Godfrey R.A., Robert W., Pesce A.J., Herold D.A. Analysis of Drugs of Abuse Using Selected Reaction Monitoring for Quantification and Full Scan Product Ion Spectra for Identification. *Journal of Analytical Toxicology.* 2012;36:106-111.

García-Caballero C., Cruz-Landeira A., Quintela O.J. Sumisión química en casos de presuntos delitos contra la libertad sexual analizados en el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (Departamento de Madrid) durante los años 2010, 2011 y 2012. *Rev Esp Med Legal.* 2014;40(1):11-18.

García-Repetto R., Soria M.L. Sumisión química: reto para el toxicólogo forense. *Rev Esp Med Legal.* 2011;37(3):105-112.

Munich L.D.P., Bonn F.M. Guideline for quality control in forensic-toxicological analyses [en línea]. Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh). 2009. [Consulta: 14 de octubre de 2014]. Disponible en: <https://www.gtfch.org/cms/index.php/en/guidelines>

Jones A.W., Holmgren A., Ahlner J. Toxicological analysis of blood and urine samples from female victims of alleged sexual assault. *Clinical Toxicology* 2012;50:555-561.

LeBeau M., Andolo W., Hearn W.L., Baselt R., Cone E., Finkle B., Fraser D., Jenkins A., Mayer J., Negrusz A., Poklis A., Walls H.C., Raymond I., Robertson M., Saadi J. Recommendations for toxicological investigations of drug-facilitated sexual assaults. *Special Communication. J Forensic Sci.* 1999;44:227-230.

LeBeau M.A., Montgomery Madeline A. Drug-facilitated sexual assault. *Forensic Science Review.* 2010;22(1):1-113.

Peters F.T., Remane D. Aspects of matrix effects in applications of liquid chromatography-mass spectrometry to forensic and clinical toxicology. *Anal Bioanal Chem.* 2012;403:2155-2172.

Pragst F., Herzler M., Erxleben B-T. Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). *Clin Chem Lab Med.* 2004;42:1325-1340.

Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *Journal of Analytical Toxicology* 2013;37:452-474.

Tominaga M., Michiue T., Inamori-Kawamoto O., Hishmat A.M., Oritani S., Takama M., Ishikawa T., Maeda H. Efficacy of drug screening in forensic autopsy: Retrospective investigation of routine toxicological findings. *Legal Medicine* 2015;17:172-176.

United Nations Office of Drugs and Crime (UNODC) [en línea]. Guidelines for the Forensic analysis of drugs facilitating sexual assault and other criminal acts. 2011. [Consulta: 15 de noviembre de 2014]. Disponible en: https://www.unodc.org/documents/scientific/forensic_analys_of_drugs_facilitating_sexual_assault_and_other_criminal_acts.pdf.

Xifró A., Barbería E., Pujol A. Sumisión química con finalidad sexual en el laboratorio forense: datos de España. *Rev Esp Med Legal*. 2014;40(1):1-3.