

Revisión bibliográfica

Determinación de Cocaína y sus principales metabolitos en muestras biológicas por Cromatografía Gas-Líquido

Juan Francisco Sánchez Bruzón

* Instituto de Medicina Legal, Departamento de Toxicología Forense, Avenida Independencia y Hernán Cortés, Ciudad de La Habana, CP 10 600, Cuba

Recibido: 15 de enero del 2000

Aceptado: 28 de febrero del 2000

Palabras clave: Cocaína y metabolitos, cromatografía gaseosa, extracción en fase sólida

Key words: Cocaine and metabolites, gas chromatography, solid phase extraction

RESUMEN. La determinación de cocaína y sus principales metabolitos en fluidos biológicos continúa siendo una tarea difícil, la cual se lleva a cabo en la mayoría de los laboratorios mediante la aplicación de un procedimiento de extracción líquido-líquido o de extracción en fase sólida, seguido de una técnica cromatográfica como por ejemplo la cromatografía en capa delgada, la cromatografía de gases o la cromatografía líquida de alta presión. La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas dada su elevada especificidad y sensibilidad es la técnica mediante la cual se obtiene la adecuada eficiencia para este tipo de estudio. En el presente trabajo se revisaron los métodos de determinación de cocaína y sus principales metabolitos en diferentes fluidos biológicos por cromatografía de gases, los cuales han sido reportados en los últimos 10 años fundamentalmente. Se resumen detalladamente los métodos de aislamiento de dichos analitos en sangre, orina, tejidos, uñas, pelos, meconio, saliva y sudor, haciendo énfasis en los procedimientos de preparación de las muestras antes de ser sometidas a las extracciones. Aunque se considera la orina como la muestra idónea para estas determinaciones, se hacen consideraciones generales respecto a la utilidad de las otras muestras para el diagnóstico del consumo de cocaína. Se tabulan las principales condiciones cromatográficas (columna, programa de temperatura, método de detección), métodos de extracción, agentes derivatizantes, modo espectrométrico de detección y la sensibilidad de dichos procedimientos. Esta revisión permite concluir que los métodos más usados para la determinación de cocaína y sus principales metabolitos en muestras biológicas involucran después de los respectivos pasos de preparación de las muestras, una extracción en fase sólida seguida de un método por cromatografía gas-líquido con columnas capilares de cuarzo (HP-1, HP-5). La detección se lleva a cabo generalmente por espectrometría de masas mediante un monitoreo selectivo de iones, con el uso del impacto electrónico como método de ionización.

ABSTRACT. Determination of cocaine and its main metabolites in biological samples continues being a difficult task, which is performed in the most specialized laboratories by means of liquid-liquid extraction or solid phase extraction procedures following a chromatographic technique, for example thin layer chromatography, gas chromatography or high performance liquid chromatography. The gas chromatography/mass spectrometry due to its high specificity and sensitivity seem to be the generally accepted as a rigorous technique for this kind of studies. This report deals about the review of the gas chromatography methods for determination of cocaine and its main metabolites in biological specimens that have been published in the last decade fundamentally. It is summarized in detail, blood, urine, tissues, nail, hair, meconium, saliva and sweat isolation methods for cocaine and its main metabolites, with special attention to the respective preparation samples procedures before the extraction. Although, urine is the sample of choice for drug analysis, general consideration regarding the utility of other samples in the diagnosis of cocaine consumption was made. The chromatography conditions (columns, temperature programme, detection methods), extraction procedures, derivatization techniques, mass spectrometric detection mode and sensitivity that were used in the development of assay for these analytes was tabulated. This review concludes that after the preparation samples techniques, the Solid Phase Extraction procedures following the fused-silica capillary column (HP-1, HP-5) gas chromatography procedures were the most often used methods for determination of cocaine and its main metabolites in biological specimens. Detection generally was performed by selected ion monitoring in the positive ion electron impact ionization mode.

INTRODUCCION

La cocaína (COC) es el principal alcaloide que se obtiene de la planta *Eritroxylum coca*, el cual tiene una larga historia de uso y de abuso. Aunque

generalizado el uso de las hojas de coca en algunos países de la región Andina, ya sea en infusiones o mascada, hoy día la COC está asociada casi exclusivamente con el abuso del alcaloide.¹ Los efectos estimulantes de la

COC así como sus propiedades anestésicas y vasoconstrictoras han sido objeto de numerosos estudios por parte de médicos y toxicólogos.^{2,3}

La COC es además la sustancia psicoactiva de más amplia gama de posi-

bilidades de consumo: puede ser inhalada, fumada, inyectada, bebida en infusiones, aplicada en las mucosas, y también puede mezclarse con otras drogas.⁴ La misma se metaboliza rápidamente y la benzoilecgonina (BE) que es su principal metabolito es considerado como marcador del consumo de COC, no obstante, se han reportado adicionalmente otros 18 metabolitos en orina, de los cuales los más importantes son la ecgonina metil éster (EME), ecgonina (EG), norcocaína (NORCOC) y el cocaetilo (COCET), que se forma en presencia de etanol.⁵⁻⁸

La elección por un laboratorio de una determinada metodología analítica va a depender de varios factores: volumen de trabajo, sensibilidad requerida, capacidad técnica e instrumental, tiempo disponible y costo. El diseño de un protocolo para la detección de una droga de abuso debe incluir dos pasos fundamentales: un procedimiento inicial de rastreo que sea capaz de diferenciar las muestras negativas de las presumiblemente positivas, seguido de otro procedimiento de confirmación, lo suficientemente sensible y específico para dar categóricamente positiva una muestra. En el primer caso se han aplicado técnicas de inmunoensayo y/o cromatográficas y en el segundo todas las técnicas suelen ser cromatográficas y espectrométricas.⁹⁻¹⁴

La determinación de COC y sus principales metabolitos en fluidos biológicos se lleva a cabo en la mayoría de los laboratorios mediante la aplicación de un procedimiento de extracción líquido-líquido (ELL) o de extracción en fase sólida (EFS), seguido de la ejecución de una técnica cromatográfica como por ejemplo la cromatografía en capa delgada, cromatografía líquida de alta presión (CLAP) y cromatografía de gases (CG). La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM) dada su elevada especificidad y sensibilidad es la técnica mediante la cual se obtiene la adecuada eficiencia para este tipo de estudio. Sin embargo, se han descrito varios métodos alternativos empleando cromatografía de gases con detector de nitrógeno-fósforo (CG/DNF), y por CLAP los cuales han permitido obtener resultados con la adecuada sensibilidad y selectividad para realizar un diagnóstico inequívoco.^{15, 16}

El propósito fundamental de esta revisión es brindar un resumen de algunos de los métodos que han sido publicados en los últimos 10 años utilizados para aislar y determinar COC y sus principales metabolitos en los diferentes fluidos biológicos.

Aislamiento de cocaína y sus metabolitos de fluidos biológicos

La Química Clínica y la Toxicología Analítica y Forense son algunas de las ramas de la investigación científica que han sido beneficiadas en las dos últimas décadas con los avances de la tecnología instrumental de los Laboratorios de Química. La identificación con exactitud de cualquier especie química en matrices relativamente complejas, como son los fluidos biológicos, es un problema casi solucionado en gran parte de los países, sin embargo los procedimientos cuantitativos de aislamiento de tales sustancias no ha tenido el mismo ritmo de desarrollo en este período.¹⁷ Las extracciones de drogas de fluidos biológicos han evolucionado desde las tradicionales ELL, pasando por los procesos de aislamiento con sales y solventes (salting-out), hasta las muy ventajosas EFS.¹⁸ En la literatura especializada se han descrito fundamentalmente tres variantes de la EFS: La EFS convencional, la EFS con discos (EFSD) y la micro EFS (MEFS). En la primera, una muestra acuosa conteniendo los analitos de interés a separar se hace pasar a través de un sorbente empacado en una pequeña columna plástica, y como resultado de la interacción entre los analitos y el sorbente (fuerzas de atracción no polares, polares, iónicas y apolares e iónicas en un mismo lecho), estos analitos son retenidos en el sorbente. Posteriormente dicho sorbente se lava con pequeñas cantidades de un solvente capaz de arrastrar las impurezas al mismo tiempo que debilita las fuerzas de atracción, (las de sílice normal generalmente no llevan este paso) favoreciendo de este modo el proceso de elución, que se realiza con pequeñas cantidades de un solvente que solubiliza los analitos, obteniéndose extractos muy limpios. La EFSD se basa en el mismo principio y lleva esencialmente los mismos pasos, pero se diferencia de la anterior en que el sorbente se encuentra empacado en un disco de teflón.^{19, 20}

Mediante estas dos modalidades de extracción, todas las drogas son rete-

tenidas en alguna medida en sorbentes no polares, de ahí la amplia aplicación que ha tenido en el rastreo de drogas en fluidos biológicos; sin embargo los sorbentes llamados "mixtos" que contienen elementos no polares y de intercambio iónico han sido los de mejores resultados para extraer cuantitativamente drogas de abuso y sus metabolitos.²¹⁻²⁴

Según Clauwaert y col.²⁵ las EFS de COC y sus metabolitos pueden ser divididas en tres grupos de acuerdo a la naturaleza del sorbente utilizado:

1. Se basa en la utilización de sorbentes no polares (C8, C18), en éstos después de un acondicionamiento de la columna con metanol y un buffer alcalino, se aplica la muestra, se realiza un lavado y la elución se lleva a cabo con una mezcla de cloroformo y metanol.

2. Se basa en la utilización de columnas de intercambio catiónico fuerte para extraer compuestos cargados positivamente, aquí el acondicionamiento se hace con metanol y un buffer ácido; la muestra se diluye en buffer ácido de manera que los grupos aminos se carguen positivamente. La elución se realiza con una mezcla de un buffer alcalino y metanol.

3. Utiliza sorbentes de tipo mixto, con propiedades hidrófobas y de intercambio catiónico y tiene la posibilidad de retener analitos con un rango muy amplio de polaridades. Aquí las muestras se diluyen en un buffer ácido y las columnas son acondicionadas con metanol, agua y buffer fosfato, y el lavado se suele realizar con agua, ácido clorhídrico y metanol. Las eluciones se realizan generalmente con diclorometano: isopropanol: amoníaco (78:20:2).

Realmente los métodos reportados en la literatura siguen el esquema expuesto anteriormente, empleando diferentes variantes en el lavado y la elución.

Extracciones a partir de muestras de orina

Una de las vías más importante de excreción de xenobióticos es la renal, fundamentalmente para compuestos polares, entre los que podemos encontrar los metabolitos de la mayoría de las drogas de abuso. Una de las funciones más importantes del metabolismo humano es hacer los compuestos extraños más polares para favorecer la eliminación por esta vía. La orina es la muestra que con mayor

frecuencia es enviada a los laboratorios clínicos y toxicológicos para realizar un rastreo de drogas de abuso, debido a que como regla general las concentraciones de las drogas y sus metabolitos suelen ser entre 100 a 1 000 veces mayores que en el suero.^{19, 26, 27}

Todos los aspectos relacionados con la detección de drogas de abuso en los EEUU, se encuentran en la actualidad muy bien regulados en la Guía final del programa para el monitoreo de drogas de abuso en los lugares de trabajo que aparece publicado en el registro federal.²⁸ En este documento, que pensamos que puede resultar válido para cualquier país, se estipula todo lo relacionado con la toma de muestras de orina, la cadena de custodio, la calificación del personal, los niveles aceptables a partir de los cuales se puede dar un resultado como positivo (cut-off), aspectos relacionados con la validación de las técnicas analíticas, los procedimientos para detectar y confirmar la presencia de dichas drogas y lo concerniente con el necesario control de la calidad interno y externo. En este documento se ratifica que la orina es la muestra que debe ser sometida a la investigación en dichas situaciones y que la cantidad mínima es de al menos 60 mL, de manera que si en la primera colección no se llegara a esta cantidad, se debe esperar a recoger una segunda para completar dicho volumen. Inmediatamente después (no debe exceder de los 4 min), se le debe medir la temperatura y la misma debe estar entre los 32,5 y 37 °C (90,5 a 99,8 °F), además se debe observar el color y reflejar cualquier anomalía presente. El Grupo Europeo de rastreo de drogas en los lugares de trabajo, y el grupo de expertos de Bruselas han adoptado medidas similares y son del criterio de que la orina es la muestra idónea para el análisis de drogas de abuso.²⁸⁻³¹ En la literatura de primer impacto de la especialidad se han publicado muchos trabajos relacionados con el diagnóstico del consumo de cocaína, y uno de los aspectos cruciales es la metodología de aislamiento de la cocaína y sus metabolitos en muestras de orina.

Sweeney y col.³² confirmaron la presencia de BE en muestras de orina mediante una extracción aplicando un método de "salting-out". Para esto prepararon una mezcla de 5 g de bi-

carbonato de sodio (NaHCO_3) y carbonato de potasio (K_2CO_3) (2:1), adicionándose a 10 mL de orina, para luego realizar la extracción con una mezcla de cloroformo:isopropanol (1:0,05). La capa orgánica fue re-extraída con 4 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,1N y después de un paso de purificación, se registró el espectro UV (235 nm). De esta forma estos autores pudieron detectar concentraciones de BE del orden de 1,25 µg/mL.

Por su parte Soriano y col.³³ automatizaron el procesamiento de análisis de muestras de orina para la detección de más de 30 drogas de abuso, entre ellas la COC. Adicionaron 250 µL de orina en un vial que contenía 100 mg de cloruro de sodio (NaCl), colocándose dicho vial en un sistema robotizado, realizándose una ELL con t-butiléter en medio alcalino con difenilamina como estándar interno. Se aspiró automáticamente la capa orgánica y se inyectó en el cromatógrafo. Fue reportado un recobrado de 83,1 % para la COC con un límite de detección de 0,3 µg/mL. En otro estudio utilizando ELL, Kints y col.³⁴ aislaron COC y sus metabolitos de orina humana (1 mL + 2 mL de buffer pH 8,4) con cloroformo: isopropanol: n-heptano (50:17:33). Después de realizar un paso de purificación con ácido clorhídrico (HCl) 0,2 M (5 mL), re-extrajeron con cloroformo en medio alcalino. Además de la COC y sus metabolitos, estos autores pudieron aislar con éxito la anhidroecgonina metil éster (AEME) que es un producto de la pirólisis de la COC y su presencia siempre está relacionada con el consumo de COC fumada. Por su parte, Levine y col.³⁵ estudiaron la estabilidad de la EME en muestras de orina procedentes de cadáveres, utilizando un protocolo de ELL con mepivacaina como estándar interno. Así, la orina (5 mL) fue alcalinizada y se extrajo con cloruro de n-butilo (21 mL), realizándose un paso de purificación con ácido diluido, reextrayéndose finalmente con diclorometano (5 mL). En el Instituto de Medicina Legal de Ciudad de La Habana para realizar el rastreo de cocaína y BE en muestras de orina por CCD se sigue un protocolo de ELL recomendado por el grupo de expertos de las Naciones Unidas para el Control de las Drogas.³¹ Esta técnica, que parte de 20 mL de orina alcalinizada a pH 8,6 hace dos extracciones sucesivas con

cloroformo:isopropanol (1:1), sin pasos posteriores de purificación y con muy buena recuperación para la BE.³¹

Ramcharitar y col.¹⁰ extrajeron BE y EME con BE trideuterada y mepivacaina como estándar internos respectivamente, en procedimientos separados de ELL mediante los cuales se aisló la BE de la orina (5 mL) con cloroformo con 20 % de etanol a pH 9,3 y la EME 21 mL de cloruro de n-butilo a pH alcalino, obteniéndose en ambos casos recobrados superiores al 90 %.

Sukbuntherng y col.³⁶ combinaron una ELL con una EFS para extraer COC y sus metabolitos y en especial al COCET. Primeramente estos autores realizaron una extracción con acetato de etilo en medio alcalino con tropocaina como estándar interno y posteriormente la capa acuosa resultante se aplicó en columnas ODS C-18, las cuales fueron previamente acondicionadas (3 mL de metanol, 3 mL de buffer carbonato pH 9,1), realizándose un lavado con una mezcla de 3 mL agua:metanol (80:20). La elución se realizó con 3 mL de metanol, de esta forma se reportó una recuperación superior al 91 % para la COC, COCET y la BE.

Utilizando un procedimiento atípico de aislamiento para la EG con columnas de intercambio aniónico AXS, Hombeck y col.³⁷ después de aplicar la orina en las columnas (1 mL) centrifugaron las mismas a 2 000 r/min, realizando una elución por centrifugación y al eluato resultante se le añadió 0,5 mL de metanol y se concentró a sequedad, llevándose a cabo en los extractos los análisis correspondientes.

Matssubara y col.³⁸ trabajando con columnas Extrelut (fase normal) y partiendo de 10 mL de orina ajustada a pH entre 7 y 9, con zeta (2H5) cocaína, (2H5)benzoilecgonina y lignocaina como estándar internos, lograron aislar con más del 80 % de eficiencia a la COC, BE y EME, después de una elución con una mezcla de cloroformo: isopropanol (9:1).

Con columnas similares Chem-Elut, Isenschmid y col.³⁹ partiendo de 2 mL de orina a pH 7 y con análogos deuterados como estándar internos, extrajeron simultáneamente COC, BE y EME realizando dos eluciones consecutivas con 8 mL cada una de cloroformo: isopropanol (9:1) con 5 min de intervalo entre cada elución. La EME

fue derivatizada con 4-fluorobenzoilo en piridina y la BE con dimetilformamida (DMF) y N,N-Dimetilformamida dihidropropilacetal-(DMF-DPA). Los derivados se analizaron por CG/EM mediante un monitoreo selectivo de iones (MSI).

Con estas mismas columnas Chem-Elut, Lillsunde y Korte⁹ eluyeron la COC y la BE con más del 70 % de recobrado, utilizando diclorometano: isopropanol como solvente de elución (9:1), pero con la diferencia de que la BE presente en las muestras de orina la hicieron reaccionar antes de las extracciones con sulfato de dimetilo a pH 5,0 a 70 °C por 2 min, con el objetivo de llevar a cabo la reacción de metilación.

En otro estudio Ferrara y su equipo de trabajo⁴⁰ extrajeron BE de orina humana con una combinación de columnas Adsorbex-Diol (100 mg). Primeramente 3 mL de orina ajustada a pH 9 con una mezcla de NaHCO₃ y K₂CO₃ (2:1), fueron aplicadas a la columna extrelut y después de 10 min se realizó una elución con cloroformo con un 10 % de isopropanol, concentrando el eluato resultante hasta 100 µL, aplicándose a las columnas Adsorbex-Diol después de dilución con diclorometano (5 mL). Estas columnas se activaron previamente con 2 mL de diclorometano y después de aplicar la muestra se lavó con 1 mL de este solvente y 4 mL de éter etílico. La elución se realizó con dos porciones de metanol de 500 µL cada una.

Con columnas de tipo mixto Bond Elut Certify (BEC), las cuales en un mismo lecho presentan propiedades apolares y de intercambio catiónico fuerte, Logan y col.²³ extrajeron 100 drogas básicas de orina humana, entre las que se encuentran la COC y su principal metabolito. Así, a estas columnas previamente acondicionadas se les aplicó las muestras de orina, y con un paso previo de lavado (con ácido fosfórico 0,01 M, ácido acético 0,1 M y metanol), se eluyó con metanol conteniendo un 3 % de amoníaco. Mediante este procedimiento se reporta un recobrado absoluto para la COC y la BE del 98 y 94,2 %, respectivamente.

Con este mismo tipo de columnas BEC De la Torre y col.⁴¹ aislaron simultáneamente COC, BE, EME, COCET y NORCOC con recobrados del 87, 83, 41, 93 y 98 %, respectiva-

mente. Para esto, partieron de 2,5 mL de orina ajustada a pH 7 con buffer fosfato y la aplicaron a las columnas previamente acondicionadas y posteriormente a un paso de lavado, se eluyó con una mezcla de cloroformo: isopropanol (4:1) conteniendo un 2 % de amoníaco. La determinación se realizó por CG/EM. Un procedimiento idéntico a éste lo realizaron Fernández y col.,⁴² con la diferencia de que el amoníaco se adicionó al final de los pasos de lavado (3 mL), realizándose la elución inmediatamente después con el mismo sistema de solvente y la determinación por CLAP. Ortuño y col.⁴³ extrajeron COC y BE con columnas similares y llevando a cabo un procedimiento análogo al ejecutado por De la Torre con la diferencia de que este último utilizó los estándar internos deuterados y el primero, levallorfan. Los análisis se realizaron por CG/DNF y los recobrados fueron superiores al 90 %.

Otra variante utilizada con estas mismas columnas BEC fue puesta en práctica por Chen y col.,²² en este caso realizando dos eluciones sucesivas con diferentes sistemas de solventes. Estos autores tomaron 1 mL de orina diluida con 4 mL de buffer de pH 6 aplicándolas a dichas columnas previamente acondicionadas y luego de alternativos pasos de lavado y secado se efectuó la primera elución con 4 mL de acetona:cloroformo (1:1), la segunda se realizó con acetato de etilo con un 2 % de amoníaco. Los resultados reportados también fueron similares a los de autores anteriores.

Con iguales columnas Clauwaert y col.⁴⁴ recientemente extrajeron COC, BE y COCET de muestras de orina utilizando dos estándar internos (2'-metilbenzoilecgonina y 2'-metilcocaina). Estos autores diluyeron la orina (2 mL) con 2 mL de buffer fosfato (pH 6) y 100 µL de los estándar internos. Las muestras se aplicaron a las columnas previamente activadas con metanol y buffer fosfato y el lavado se realizó con agua, ácido clorhídrico 0,1 M, metanol y acetonitrilo (siempre con 3 mL, excepto los dos últimos lavados que fueron con 3 x 3 mL). La elución se efectuó con 2 mL de una mezcla de cloruro de metileno: isopropanol:amoníaco 25 % (80:20:2). Los extractos fueron analizados por un método de CLAP y los recobrados reportados fueron del 95 %, 89 % y 88 % para la BE, COC y COCET, respectivamente.

Nishikawa y col.⁴⁵ extrajeron simultáneamente COC, BE, EME, EG y NORCOC de muestras de orina con una combinación de dos columnas de EFS (BEC y Bond SCX). Primeramente aplicaron 1 mL de orina diluida con 1 mL de buffer fosfato en columnas BEC previamente activadas y después de los respectivos pasos de lavado y elución, el eluato resultante se diluyó con sendos mL de buffer fosfato y etilendiaminotetraacetato de sodio (Na₂EDTA) 0,1 %, aplicándose esta mezcla en la columna Bond SCX. La elución se efectuó en ambas columnas con metanol en amoníaco al 3 %, reportándose recobrados entre 40 y 95 %. Las determinaciones se realizaron por CLAP/EM.

Recientemente Jenkins y col.⁴⁶ cuantificaron simultáneamente COC y nueve metabolitos en sangre y orina, procedentes de 13 fallecidos sospechosos de sobredosis. Para esto utilizaron columnas Clean Screen (que activaron primero con el solvente de elución, seguido de metanol y agua desionizada. Después de aplicadas las muestras (mezcladas con acetato de sodio y los estándar internos deuterados), se efectuó un lavado con agua desionizada, HCl 0,1M y metanol. Los analitos se eluyeron con cloruro de metileno:isopropanol: amoníaco (80:20:2). De esta forma cuantificaron a la COC, BE, EME, COCET, NORCOC, norbenzoilecgonina (NORBE), norcocaetilo (NORCOCET), ecgonina etil éster (EEE) y AEME, pero no reportaron el porcentaje de recuperación para ningún analito. Este es el primer reporte de determinación de los últimos 5 metabolitos en fluidos biológicos, y se efectuó con un límite de detección entre 3 y 6 ng/mL por GC/EM.

Dubey y Caplan⁴⁷ estudiaron el recobrado y la estabilidad de la BE en muestras de orina conservadas como manchas secas en papeles de filtro Whatman número 3 a -20 °C, 4 °C y a temperatura ambiente durante 12 semanas. Después de un procedimiento de elución se utilizaron columnas BEC para realizar las extracciones finales, con metodologías muy similares a las descritas anteriormente. De esta manera estos autores demostraron la efectividad de la conservación como manchas secas en papeles de filtro, independientemente de la temperatura.

Dugan y col.⁴⁸ extrajeron COC y BE de 236 muestras de orina después de 1

año de conservadas a una temperatura de -20°C , con el objetivo de estudiar la estabilidad de dichos analitos. El protocolo de extracción realizado involucró dos tipos diferentes de columnas de EFS: las Clean Screen DAU y las de tipo W Prep. Con las primeras una vez acondicionadas con metanol, agua desionizada y buffer fosfato de pH 5,5, se aplicaron 2 mL de orina tamponada a pH 5,5 y después de lavar con agua, ácido clorhídrico 0,1 N y metanol, se eluyó con 3 mL de cloruro de metileno: isopropanol (80:20) conteniendo un 2 % de amoníaco. Con las "W Prep" (fase normal), estos autores aplicaron las muestras de orina (2 mL), tamponada a pH 9,5, eluyéndose posteriormente con agua desionizada y una mezcla de cloruro de metileno: isopropanol (9:1). Las extracciones fueron cuantitativas, demostrándose la estabilidad de los analitos en esas condiciones de conservación. A esta misma conclusión llegaron Hippens-tiel y Gerson⁴⁹ después de realizar una revisión del tema reportaron que las mejores condiciones de conservación de la COC y sus metabolitos en orina son a -15°C y ajustada a pH 5 preferiblemente con ácido ascórbico y en frascos no silanizados.

Kumazawa y col.¹⁶ fueron los primeros en reportar el uso de la MEFS para aislar COC de orina humana. Para lograrlo utilizaron 0,5 mL de orina con cocapropileno como estándar interno permitiendo el contacto con la fibra de polidimetilsiloxano (100 μm) durante 30 min, realizando la desorción térmica a 240°C durante 3 min. La determinación en los extractos finales se realizó por CG/DNF. El recobrado fue superior al 20 % y el límite de detección de 3 ng/mL de orina. Casi al mismo tiempo Singer y col.⁵⁰ utilizando las mismas fibras pero de dos medidas diferentes (100 y 85 μm) estudiaron la extracción de algunas drogas de abuso, realizando el proceso de absorción a 40°C , pero no encontraron buenos resultados para la COC y opiáceos. Parece que este tipo de extracción en fase sólida no ha tenido mucho éxito, sobre todo para la extracción simultánea de la COC y sus metabolitos a partir de orina.

Extracciones en sangre

Como ha sido abordado anteriormente, el rastreo de drogas de abuso es preferible realizarlo en muestras de orina, sin embargo en muchos laboratorios clínicos y forenses se reciben a

diario cada vez más muestras de sangre con el objetivo de investigar los niveles de determinadas drogas, además en ocasiones la orina no está disponible en casos de fallecidos, por lo tanto se hace necesario realizar la investigación en sangre u otro fluido, de manera que se hace imprescindible contar con los protocolos de extracción y análisis de dichas drogas.

Generalmente estos protocolos constan de tres pasos fundamentales: preparación de las muestras, aislamiento de los analitos y determinación. El proceso de preparación de las muestras de sangre total es muy importante debido a que entre otras cosas los eritrocitos y otras células tienden a bloquear las columnas de EFS, lo cual repercute en la reproducibilidad de los recobrados. En la literatura se han descrito diferentes métodos para el tratamiento de muestras de sangres antes de las extracciones, entre los cuales podemos citar: tratamiento con metanol, acetona, N-N-dimetilformamida, ácido sulfosalicílico, ácido tricloroacético, sulfato de zinc, entre otros.⁵¹

Estos métodos de preparación tienen una importancia crucial en el análisis de drogas de abuso, debido también a que generalmente se encuentran en concentraciones muy bajas, y se hace necesario garantizar una recuperación lo más alta posible, aunque dichas concentraciones no sólo dependen de las dosis, sino también de la vía de administración, la farmacocinética, el peso, la edad, el sexo, factores genéticos, enfermedades, inducción e inhibición enzimática y el primer paso en el metabolismo.⁵²

En la literatura especializada aparecen varias investigaciones realizadas relacionadas con la preparación de las muestras de sangre total y un trabajo representativo fue el publicado por Chen y col.,²⁴ quienes compararon 4 métodos de pretratamiento de muestras de sangre para posteriores extracciones. El primero utilizó 1 mL de sangre la cual fue sonicada en baño ultrasónico a temperatura ambiente, seguidamente agitaron la muestra durante 30 s en un vortex con adición de buffer fosfato 0,1 M de pH 6. Posteriormente se centrifugó y se trabajó con el sobrenadante. Aquí el objetivo del tratamiento con ultrasonido fue el de romper la unión de las drogas con las proteínas plasmáticas. En el segundo método, a la muestra de

sangre (1 mL) se le añadieron 2 mL de una solución de sulfato de zinc en metanol, la cual fue añadida gota a gota con agitación en un vortex. El sobrenadante se mezcló con 6 mL de una solución de buffer acetato de pH 6. El tercer procedimiento utilizó 2 mL de acetonitrilo, procediendo de igual forma al método anterior, pero una vez centrifugada, se evaporó a sequedad a 40°C en corriente de N_2 , se disolvió el residuo en 6 mL de igual buffer. La última metodología involucró solamente metanol, siguiendo exactamente los pasos anteriores y disolviendo el residuo en igual solución buffer. Todos los extractos derivados de las preparaciones anteriores se sometieron a una extracción con columnas BEC (de 10 mL de capacidad) y Clean Screen DAU (de 12 mL de capacidad). Estas columnas se acondicionaron con metanol (2 mL) y solución buffer de pH 6 (2 mL) y se aplicaron las muestras, realizándose seguidamente un lavado con agua desionizada (1 mL) y ácido acético 0,01 M de pH 3,3 (0,5 mL). Estos autores llevaron a cabo dos esquemas de elución con el objetivo de aislar drogas ácidas y básicas separadamente. Aunque en este trabajo no se informan datos relacionados con la extracción de cocaína y sus metabolitos, si cabe decir que el primer método de preparación de muestras de sangre fue el de mejores resultados para el aislamiento posterior de drogas básicas, las cuales se eluyeron con acetato de etilo con un 2 % de amoníaco, demostrándose así la efectividad del primer procedimiento comparado con las restantes metodologías de precipitación. Estos mismos autores en otro trabajo utilizaron el mismo primer tratamiento descrito en el trabajo anterior para extraer COC en sangre total, con un 92,3 % de recuperación, llevándose a cabo la determinación en el extracto obtenido por un método de CG/DNF, en lugar de ionización de llama que fue utilizada en el primer reporte.²²

Zweipfenning y col.⁵³ emplearon columnas BEC (3 mL, 130 mg), para extraer 13 drogas de sangre total. Para esto realizaron un pretratamiento similar al descrito anteriormente, consistente en mezclar 1 mL de sangre total con 6 mL de buffer fosfato 0,1 M de pH 6 sonicando la mezcla durante 15 min. Posteriormente se centrifugó a 3 000 r/min. y el sobrenadante se aplicó a la columna previamente acondicionada con metanol (2 mL) y buffer

fosfato de pH 6 (2 mL). Inmediatamente la columna se lavó con agua (1 mL) y ácido acético 0,01 M de pH 3,3. Se aplicó vacío y 50 μ L de metanol para el secado final, realizando la elución dos veces con 2 mL de acetona: cloroformo (1:1) para las drogas ácidas y 3 mL de acetato de etilo: amoníaco 25 % (40:1). Los extractos fueron analizados por CG/DNF. En este trabajo no se reportaron buenos recobrados para la BE.

Tebbett y McCartney⁵⁴ utilizando también el tratamiento con ultrasonido como pretratamiento, extrajeron COC y BE de muestras de sangre con columnas Bond Elut C8 previamente activadas con metanol y buffer de pH 9,5. Después de sucesivos pasos de lavados y secado, se realizó la elución con cloroformo:isopropanol (4:1). El eluato se analizó por CLAP.

Soriano y col.⁵⁵ reportaron recobrados superiores al 71 % para 40 drogas ensayadas con columnas BEC. Estos autores emplearon 15 min de tratamiento con ultrasonido en las muestras de sangre antes de aplicarlas las columnas; además demostraron la efectividad del acetonitrilo en el paso de lavado para obtener buenos recobrados para los metabolitos de la COC y extractos lo suficientemente limpios para su posterior análisis cromatográfico.

Abusada y col.⁵⁶ trataron con metanol muestras de sangre total y de plasma, conteniendo los análogos deuterados como estándar internos y el sobrenadante resultante de este proceso se concentró en corriente de N₂ diluyéndose posteriormente con K₃PO₄ 0,1M y se ajustó a pH entre 5,8 y 6 con H₃PO₄. La solución resultante se aplicó en columnas BEC previamente acondicionadas y después de un lavado con agua, ácido clorhídrico y metanol, se realizó una elución con diclorometano:isopropanol:amoníaco (196:49:5). El eluato se evaporó a sequedad y posteriormente se derivatizó con pentafluoropropanol (PFP) y anhídrido pentafluoropropiónico (AHPFP) y se analizó por CG/EM.

Realizando una dilución 2:1 de la sangre con una solución buffer de pH 9,0, con posterior centrifugación, Aderjan y col.⁵⁷ aplicaron el sobrenadante a columnas Bond Elut C18 previamente activadas. La elución se realizó con diclorometano:isopropanol (4:1) conteniendo un 2 % de amoníaco. El eluato se evaporó a sequedad

y se derivatizó con iodometano D3 (10 μ L) a 100 °C por 5 min, con una determinación final por CG/EM.

Usando columnas de fase normal (Chem Elut), Isenschmid y col.³⁸ utilizaron el mismo procedimiento descrito para la orina, pero con la utilización de 2 mL de sangre para extraer COC. Igualmente Matsubara y col.³⁷ llevaron a cabo el mismo procedimiento descrito para la orina pero con mucha menor cantidad de muestra de plasma (1,5 mL), diluyendo la misma hasta 10 mL antes de aplicarla a las columnas Extrelut.

Con la misma técnica que llevó a cabo el grupo de Abusada,⁵⁶ descrito anteriormente, Miller y col.⁵⁸ analizaron los extractos procedentes de una ELL con pentano:isopropanol (97:3), de 50 μ L de sangre alcalinizada con solución de amoníaco. Los recobrados reportados para la COC y el COCET fueron casi del 100 %.

Cox y col.⁵⁹ informaron los resultados de una investigación donde aislaron 119 drogas de sangre total utilizando un método de ELL con acetato de n-butilo (300 μ L) en medio alcalino, realizando las determinaciones por CG/DNF. Estos autores no utilizaron ningún pretratamiento antes de las extracciones, obteniendo un 74 % de recobrado para la COC en sangre total y no se reportan resultados para los metabolitos.

Con el mismo método cromatográfico y empleando una ELL Sims y col.⁶⁰ extrajeron drogas básicas de sangre total. Para esto utilizaron 200 μ L de sangre diluyendo con 700 μ L de agua y basificaron con 100 μ L de amoníaco, después de homogeneización añadieron 5 mL de éter etílico. Una vez separadas las fases se evaporó a sequedad la capa orgánica y se reconstituyó en 50 μ L de metanol. De esta forma extrajeron cuantitativamente la COC.

En un estudio que evaluó la estabilidad de la COC, BE y el COCET en fluidos post-mortem, en casos relacionados con la ingestión de COC, Logan y col.⁶¹ realizaron una ELL con 10 mL de cloroformo:etanol (4:1), partiendo de 1 mL de sangre total alcalinizada con buffer borato de pH 9. La capa orgánica se evaporó a sequedad y se reconstituyó inmediatamente en la fase móvil para su estudio por CLAP.

En otro estudio relacionado con la estabilidad de la COC y el COCET en

sangre, Moriya y Hashimoto⁶² efectuaron una ELL en sangre (2 mL) con n-clorobutano:alcohol isoamílico (98:2) a pH alcalino con carbinoxamina como estándar interno. La capa orgánica resultante se reextrajo con HCl 0,1 N, se separaron las capas, realizando un lavado de la capa acuosa con 4 mL de 2-metilbutano: tolueno:alcohol isoamílico (94:5:1). La capa orgánica se evaporó a sequedad y se reconstituyó en 50 μ L de metanol. El extracto se analizó por CG/EM. Utilizando este mismo esquema de extracción y análisis estos autores publicaron otro trabajo⁶³ relacionado con el efecto del intervalo post-mortem en las concentraciones de COC en sangre, demostrando que se puede formar COCET a partir de la COC y el etanol aproximadamente 1 hora después de la muerte y que la magnitud de su formación depende no sólo de las concentraciones de COC y etanol, sino también de la temperatura corporal.

Sukbuntherng y col.³⁵ cuantificaron simultáneamente COC, NORCOC, COCET, NORCOCET, BE, y NORBE en plasma por una técnica de CLAP. Las muestras de plasma (0,1 μ L) fueron alcalinizadas y extraídas con 2 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se reextrajo con 150 μ L de HCl 0,05 M; se rotoevaporó la fase acuosa y el residuo lo disolvieron en 100 μ L de fase móvil. Seguidamente la fase acuosa remanente del procedimiento inicial fue extraída con 2 mL de cloroformo:isopropanol (2:1). Esta fase orgánica se reextrajo con HCl 0,05 M (1 mL) y se rotoevaporó la fase acuosa, disolviendo el residuo en 150 μ L de fase móvil. De esta forma estos autores lograron aislar todos los metabolitos con porcentajes de recuperación casi del 100 %. En un estudio realizado en ratas (Sprague-Dawley) sobre el aclaramiento de la COC en sangre, este mismo autor con otros col.⁶⁴ aplicaron el procedimiento de extracción descrito anteriormente, pudiendo calcular varios parámetros farmacocinéticos.

Ma y col.⁶⁵ realizaron una microextracción en suero de rata (50 μ L) conteniendo COC, NORCOC, BE, NORBE con 3-isobutil-1-metilxatina como estándar interno. El suero fue alcalinado con 100 μ L de buffer borato 1 M de pH 9. La extracción se realizó con 1 mL de cloroformo:etanol 7:1. Después de evaporar a sequedad

en corriente de N_2 se reconstituyó en 50 μ L de fase móvil para posterior CLAP. Los recuperados fueron de 79,1; 71,8; 77,7; y 38,2 %, respectivamente para la COC, NORCOC, BE y NORBE.

Por otra parte, Coburn y Koves⁶⁶ analizaron COC y BE en muestras de sangre procedentes de cadáveres por CG/EM. Estos autores mezclaron la sangre con COC y BE deuterados como estándar internos, dejando en reposo la mezcla por 30 min, adicionando la mezcla a una columna de Amberlite XAD-2 que fue preparada con buffer fosfato de pH 8,4. Posteriormente la resina se trató con una mezcla de cloroformo:isopropanol (3:1), se centrifugó para separar el solvente, el cual se evaporó a sequedad para posterior derivatización con diazopropano.

Smirnow y Logan⁶⁷ reportaron un método de análisis de COC y sus metabolitos en muestras de sangre total procedentes de cadáveres, utilizando un método de precipitación para la preparación de las muestras, seguido de dos procedimientos de derivatización *in situ* antes de realizar las extracciones. El primero consistió en incorporar un grupo propilo en la EG, BE y NORCOC (la EME no reacciona) y el segundo tuvo como objetivo formar el p-nitrobenzoiléster de los compuestos formados anteriormente, exactamente la formación del p-nitrococapropileno y p-nitrococaína, porque el cocapropileno y la N-propilcocaína no forman los nitroderivados correspondientes. Estos procedimientos de derivatización se realizaron para lograr extraer cuantitativamente los metabolitos más polares como la EG, que es difícil de extraer de fluidos biológicos con solventes orgánicos. El proceso de precipitación se llevó a cabo mediante la estratificación con agitación constante de metanol primero y acetónitrilo después, realizándose el proceso de derivatización descrito anteriormente en el sobrenadante resultante de la centrifugación. La extracción en sí se ejecutó en el residuo obtenido después de la derivatización con eluente de n-butilo a pH 9,0. Previo un paso de purificación se analizaron los extractos por CG/EM y por CLAP.

Tejidos

La determinación de drogas en diferentes tejidos procedentes de cadáveres ha tenido siempre un interés especial en Toxicología Forense. En

muchos casos de muerte, no es posible obtener muestras de orina o de sangre y se hace imprescindible llevar a cabo las determinaciones de drogas en otros especímenes.

Los métodos que generalmente se han utilizado para aislar drogas de vísceras involucran un pretratamiento de los tejidos mediante un procedimiento de precipitación de proteínas y/o hidrólisis química o enzimática, siendo el tratamiento con proteasas el que ha dado mejores resultados en el aislamiento de drogas.⁶⁸ Posteriormente, a estos pretratamientos se pueden aplicar los mismos protocolos de ELL y de EFS que se realizan en muestras de orina y de sangre, tal y como se ha descrito anteriormente para la COC y sus metabolitos.

Estas determinaciones en tejidos son muy importantes, porque para muchas drogas las concentraciones en sangre son dramáticamente sitio-dependientes y aunque la causa de este fenómeno es multifactorial uno de los factores que se ha demostrado que más influye, es la difusión de estas drogas desde los órganos sólidos hacia la sangre cercana a los mismos, lo que ha venido a llamarse: La redistribución *post-mortem* de las drogas, que dicho sea de paso, ha creado muchas dificultades a la hora de la interpretación de los resultados analíticos.⁶⁹

Spiehler y Reed⁷⁰ fueron los primeros en demostrar que el cerebro es la mejor muestra para determinar COC y BE en un cadáver, debido a que dichos analitos son más estables en tejido encefálico que en la sangre o en el hígado. Así mismo estos autores afirman que las concentraciones de COC en el cerebro suelen ser 4 veces mayor que las del plasma, en el momento de máximo pico plasmático. Estos autores llevaron a cabo ELL partiendo de 1g de tejido y analizaron los extractos por CG/EM. De esta manera determinaron los niveles de COC y BE en 47 casos de fallecidos en muestras de sangre, hígado y cerebro.

Por su parte, Browne y col.⁷¹ propusieron un método de determinación de COC en cerebro empleando una EFS con columnas Bond Elut C2, inmediatamente después de una digestión enzimática. El análisis de los extractos se llevó a cabo por CLAP. Con este trabajo los autores demostraron que existen diferencias en las concentraciones de COC en las diferentes zonas del encéfalo, planteando que la mejor zona para realizar el

muestreo es la parte media y central del encéfalo que es donde mayores niveles podrían encontrarse.

Otro ejemplo de extracción de COC en cerebro es el trabajo realizado por Moore y col.⁷² que utilizaron columnas de tipo mixto (no polar e intercambio catiónico) X-TrackTTM. Estos autores analizaron también los extractos por CLAP, demostrando que las concentraciones de COC en cerebro son de 4 a 8 veces mayores que las de la sangre y que las de BE fueron sustancialmente más bajas que las de COC. A esta misma conclusión llegaron recientemente Karch y col.,⁷³ de manera que es evidente la importancia que tienen las determinaciones en cerebro para el diagnóstico de muerte por COC.

Sin lugar a dudas, el futuro de las extracciones de drogas en tejidos en toxicología forense estará ligado cada vez más a las EFS eficientes y rápidas, partiendo de la menor cantidad de muestra posible, con la previa licuefacción de los tejidos mediante digestiones enzimáticas.¹⁷ Un ejemplo de esta afirmación lo constituye el trabajo reportado por Huang y col.⁷⁴ que utilizaron un método cromatográfico para analizar los extractos procedentes de una digestión con subtilicina seguida de una EFS con columnas BEC de 10 mL de capacidad. Aunque estos autores no reportaron ningún resultado relacionado con la COC y sus metabolitos, sí plantea una metodología que pudiera ser utilizada para tales fines.

Saliva

El flujo de saliva en el humano depende de factores internos y externos como son: la edad, el sexo, naturaleza de los alimentos que se ingieran, factores de tipo emocional, estado del tiempo, estado de salud y además por algunas drogas (por ejemplo preparaciones de cannabis, antidepresivos tricíclicos, etc.). La saliva ha sido propuesta como una muestra muy útil para el monitoreo de drogas que pudieran estar en el plasma en estado no ionizado. Las drogas pasan desde el plasma a los diferentes compartimentos, incluyendo las glándulas parótida, submaxilar y sublingual, por difusión pasiva, proceso que está limitado por la disponibilidad de la droga en forma libre, no ionizada y no enlazada a las proteínas y por las propiedades físico-químicas que determinan en última instancia el ritmo y la extensión en que una droga pasa a este

fluido. Existen procedimientos recomendados de muestreo para la saliva que de manera general permiten la colección de este fluido en un tubo especialmente diseñado para este fin, el cual se conserva en congelación hasta el momento de los análisis.^{75, 76}

Las concentraciones de COC en la saliva generalmente son mayores que las del plasma, aunque esto dependerá del pH de la saliva (a bajos pH será mayor la concentración de COC y a altos pH serán menores estos niveles). Ahora, debemos tener en cuenta que la BE es un zwitterion, que contiene ambos grupos funcionales (ácido y básico, con $pK_a = 2.25$ y 11.2), por lo tanto las concentraciones de la misma no se afectarán considerablemente con las variaciones de pH. Las desventajas que pudiera tener la toma de muestras de saliva, a la hora de querer correlacionar las concentraciones encontradas en la saliva con las del plasma, radican en el pH de la misma como ya se dijo, y en los posibles restos de drogas en la cavidad bucal o nasal, que elevan las concentraciones en la misma. Así lo demostraron Sharamm y col.⁷⁷ quienes detectaron COC y BE en saliva 16 horas después de fumada e inhalada dicha droga, encontrando que los niveles de estos analitos en saliva fueron mayores que los del plasma y la orina y concluyendo por lo tanto que esta muestra es muy útil para estas determinaciones.

La determinación de COC y sus metabolitos en saliva generalmente se llevan a cabo por los mismos procedimientos disponibles para la orina o el plasma, sin realizar ningún paso previo de tratamiento, salvo los correspondientes ajustes de pH y generalmente se han usado técnicas de inmunoensayo con posterior confirmación por CG/EM previa ejecución de un procedimiento de EFS,^{78, 79} aunque también se han reportado técnicas de confirmación para drogas de carácter básico, entre ellas la COC, en muestras de saliva realizando una ELL con cloruro de n-butilo en medio alcalino (1 mL de saliva y 3 mL de cloruro de n-butilo) utilizando para las determinaciones un método de CG/DNF.⁸⁰

Así, por ejemplo, en este sentido Cone y col.⁸¹ analizaron COC y BE por radioinmunoensayo con posterior confirmación por CG/EM, después de un procedimiento de EFS. Estos autores detectaron COC en usuarios cró-

nicos de 5 a 10 días después del último consumo, sugiriendo que podría existir una acumulación de esta sustancia en los tejidos. En otro trabajo Cone y col.⁸² determinaron las concentraciones de COC, BE, EME y AEME en saliva en 6 sujetos después de la administración intravenosa, intranasal y fumada, utilizando para ello un procedimiento similar al anterior, demostrando que existe una buena correlación entre las concentraciones de COC en plasma y los efectos fisiológicos observados, cuando la administración es por vía intravenosa.

Kato y col.⁸³ determinaron COC, BE y EME en muestras de saliva obtenidas bajo condiciones controladas de estimulación. Para las extracciones de la saliva previo ajuste a pH 4 se utilizaron columnas de EFS Clean Screen DAU, y después de los respectivos procedimientos de activación y lavado realizaron una elución con diclorometano:propanol:amoníaco (40:10:1) y determinación final por CG/EM.

Pelos

El mecanismo mediante el cual una droga se incorpora al cabello no está completamente esclarecido, sin embargo se han propuesto diferentes modelos para explicar este fenómeno, uno de los cuales plantea que una droga puede incorporarse por diferentes vías, tales como la difusión desde el torrente sanguíneo a la base del folículo piloso durante la formación del cabello, difusión a través de diferentes secreciones y por contaminación externa. Existen tres factores que influyen en la incorporación de una droga al cabello: afinidad por la melamina, lipofilia y basicidad. Drogas liposolubles y de carácter básico tendrán mayor probabilidad de incorporarse al pelo, así como en cabellos pigmentados se favorecerá este proceso.^{75, 84-86} La determinación de drogas en pelo nos puede brindar información acerca de la historia de consumo anterior en un período de semanas, meses o años dependiendo lógicamente de la longitud del cabello. Teniendo en cuenta que el cabello crece como promedio a razón de 1-1.5 cm por mes, es posible hacer un cálculo aproximado del período que lleva expuesto un individuo a determinada droga.

Existen métodos recomendados para el muestreo, preparación y análisis de muestras de pelos relacionados con el análisis de drogas de abuso. De manera general se recomienda

tomar las muestras de pelo de la región occipital, lo más rente posible al cuero cabelludo y en una cantidad aproximada de 200 mg. Estas muestras deben ser guardadas en papel de aluminio y pueden conservarse a temperatura ambiente en un lugar seco. Todas las muestras de pelos deben ser sometidas a un procedimiento de descontaminación antes de proceder a los análisis, con el objetivo de remover la contaminación externa. Después de este proceso de lavado, se debe secar y cortar en pequeños pedacitos para finalmente someterlos a un procedimiento de hidrólisis con el objetivo de romper los enlaces de la sustancia de interés con las proteínas y finalmente el sobrenadante se somete a un procedimiento de extracción.⁷⁵

Los primeros métodos de investigación de COC en muestras de pelo utilizaron técnicas de radioinmunoensayo para las determinaciones, con la desventaja de que la mayoría de estos inmunoensayos presentan reactividad cruzada para los metabolitos y no es posible por lo tanto distinguir entre la COC y los mismos.⁸⁷ Por ejemplo, Smith and Liu⁸⁸ partieron de 58 mg de cabello que sometieron a un procedimiento de lavado con solución acuosa al 0.05 % de dodecil sulfato de sodio (DSS), (6 veces con 100 mL cada una), realizando una extracción después de pulverizada la muestra con etanol, refluendo durante 2 h. El filtrado se evaporó a sequedad y se reconstituyó en 100 μ L de un control negativo de orina donde se realizó la determinación final.

De manera general podemos decir que en la actualidad las determinaciones de COC y sus metabolitos en muestras de pelos siguen el esquema siguiente:^{34, 89-94}

1. Lavado de la muestra con un solvente orgánico, por ejemplo, metanol, diclorometano, etc., con agitación o ultrasonido.
2. Secado y trituración del cabello en porciones lo más pequeñas posible (entre 1 y 5 mm) con posterior pesado de la muestra.
3. Procedimiento de hidrólisis, que puede ser química (hidrólisis ácida) o enzimática (con proteasas o glucuronidasas), con un paso de centrifugación.
4. Aislamiento de los analitos en el sobrenadante obtenido mediante un procedimiento de EFS o ELL tal y como se describió para las muestras de orina, sangre y tejidos.

5. Determinación mediante una técnica sensible y específica como la CG/EM o CLAP/EM.

Por ejemplo, Cone y col.⁹⁵ aplicaron un método de CG/EM para determinar COC, BE, EME, NORCOC, COCET y NORCOCET en muestras de pelo pertenecientes a 10 individuos sujetos a tratamiento de rehabilitación. Estos autores ensayaron dos procedimientos de lavado: con metanol (100 mg de pelo, 1 mL de metanol colocados a 37 °C durante 15 min, repitiéndose este proceso 3 veces) y con etanol-buffer fosfato (100 mg de pelo, 1 mL de etanol y colocados a 37 °C durante 15 min seguido de 3 lavados durante 30 min a 37 °C con porciones de 1 mL de buffer fosfato de pH 6). Posteriormente realizaron un proceso de extracción con ácido sulfúrico (1 mL 0,05 M) a 37 °C y durante toda la noche. Estos extractos se neutralizaron, ajustaron a pH 4 y se extrajeron con columnas de EFS Clean Screen DAU (130 mg, 1 mL). Después de los respectivos procedimientos de activación y lavado, la elución fue realizada con tres porciones de 1 mL cada una de cloruro de metileno: 2-propanol (8:2) conteniendo un 2 % de amoníaco. La COC fue el principal analito encontrado en muestras de pelo, considerándose además por estos autores el COCET (detectada en 8 casos) y la NORCOC como metabolitos marcadores del consumo de COC, debido a que nunca podría llegar al cabello por contaminación externa.

Más recientemente se ha seguido el mismo esquema expuesto anteriormente pero con la utilización de dos espectrómetros en serie (EM/EM) para las detecciones. Así, Clauwaert y col.⁹⁶ analizaron COC, BE y COCET en muestras de pelo (200 mg) procedentes de casos de fallecidos, los cuales tenían el antecedente de abuso de drogas. Para esto realizaron EFS con columnas HCX IST Isolute confirm (130 mg de 3 mL), seguida de dos métodos de determinación (CLAP con detección fluorescente y CLAP acoplada con EM/EM). Estos autores descontaminaron las muestras mediante un lavado con 5 mL de diclorometano (2 min), 5 mL de agua (2 min) y otros 5 mL de diclorometano (2 min), aplicando ultrasonido todo el tiempo. Posteriormente realizaron una digestión ácida (2 mL de HCl 0,1 M a 56 °C durante 15 h). Estos

autores no obtuvieron buenos resultados con las columnas BEC y trabajaron con las mencionadas anteriormente, con la particularidad de que el paso de activación lo iniciaron con el solvente de elución (2 mL de diclorometano: 2-propanol:amoníaco 25 %, 78:20:2), seguido de los que tradicionalmente se usan en este tipo de extracciones (3 mL de metanol y 3 mL de buffer fosfato). Estos autores plantean que el paso de lavado fue muy importante para no obtener interferencias en las determinaciones (3 mL x 3 mL de HCl 0,1 M, 3 mL x 3 mL de metanol y 3 mL x 3 mL de acetonitrilo). Otro trabajo que ejemplifica la importancia que está ganando este acoplamiento lo constituye el trabajo de Baurland y col.⁹⁷ quienes utilizaron hidrólisis ácida y EFS seguida de CG/EM/EM para analizar COC, COCET, BE, EME y NORCOC en 30 muestras de pelo.

Uñas

Aunque se conoce que las uñas han sido objeto de análisis de metales pesados, la determinación de drogas de abuso en estas muestras es relativamente reciente.⁹⁸ En la literatura especializada existen pocos reportes de determinación de COC y sus metabolitos en muestras de uñas, sin embargo estos análisis son muy útiles cuando se pretende demostrar la manipulación reciente de esta droga, aunque está demostrado que efectivamente las drogas se incorporan al interior de esta matriz. En este sentido Tiess y col.⁹⁹ evaluaron la determinación de COC en muestras de uñas procedentes de dos fallecidos de sobredosis, utilizando para ello una técnica de inmunoensayo enzimático con posterior confirmación por un procedimiento de CG/EM. Estos autores sometieron las uñas de pies y manos a un procedimiento de lavado con metanol (2 min; 20 °C) y después de trituradas se extrajo con metanol y ultrasonido (5h; 55 °C). De esta forma, detectaron COC en las soluciones de lavado de las uñas de las manos demostrando la manipulación reciente de esta sustancia. Mediante reflujo con metanol Roper-Miller y col.¹⁰⁰ aislaron COC, EME, COCET, NORCOC, NORBE, BE, y AEME de muestras de uñas utilizando una técnica de CG/EM para las determinaciones, demostrando que hubo metabolismo e incorporación de estos analitos a la matriz de las uñas.

Sudor

El sudor es una secreción normal en todos los humanos y su función está relacionada con el control de la temperatura corporal, protección inmunológica e hidratación de la piel, entre otras.

La determinación de drogas en muestras de sudor es relativamente reciente y de manera general se ha llevado a cabo por métodos de inmunoensayo (MIE) y por CG/EM. Las muestras de sudor se toman con almoadillas adhesivas adsorbentes (AAA) especialmente diseñadas para este fin, en las cuales se acumula el sudor. El agua contenida en el sudor se volatiliza por el calor corporal y pasa a través de la capa adhesiva de poliuretano que cubre dicha almoadilla. Estas AAA pueden ser colocadas en una región determinada del cuerpo durante varios días (entre 3 y 10 días), y transcurrido este tiempo se realiza un proceso de elución, generalmente con un buffer disuelto en metanol. El eluato resultante se somete a las técnicas analíticas mencionadas anteriormente. El paso crítico en estas determinaciones es el procedimiento de muestreo que se use.

Aunque se han reportado muy pocos estudios relacionados con la determinación de COC y sus metabolitos en muestras de sudor, el progreso en las técnicas de muestreo y detección posibilitarán el incremento de las investigaciones en este campo. Existen dispositivos especialmente diseñados y comercializados para la toma de muestras de sudor, así como métodos recomendados para el muestreo y posterior elución, con el objetivo de determinar drogas de abuso que se excretan por esta vía.⁷⁵

Wtsadik y col.¹⁰¹ aplicaron dos procedimientos de muestreo de sudor: el primero fue de forma rápida e intermitente, realizando una limpieza de la piel a intervalos de 5 a 30 min y con la almoadilla caliente, de manera de estimular la producción de sudor (se mantuvo caliente con un dispositivo especialmente diseñado para esto), y la segunda fue de forma continua, dejando la AAA fija en la piel, experimentándose con diferentes intervalos entre 1 y 7 días. De esta forma después de un procedimiento de elución se detectó COC, BE y EME por CG/EM después de varios días de la administración subcutánea de diferentes dosis del alcaloide demostrándose de esta manera la utilidad de

este fluido para el diagnóstico del consumo de COC, ubicándose incluso entre la orina y el pelo en cuanto a utilidad diagnóstica en este tipo de estudio, debido a su tiempo de detección después del último consumo.

Spiehler y col.¹⁰² validaron un método inmunoanalítico para la determinación de COC en muestras de sudor. Para esto, las muestras se tomaron con AAA especialmente diseñadas (sudormed), las cuales se colocaron sobre la piel durante 7 días. La COC se eluyó con una mezcla de buffer acetato 0,2 M de pH 5 y metanol (1:3). Estos autores encontraron que la COC es el analito que predomina en muestras de sudor y que la eliminación por el sudor puede estar entre el 1 y el 2 % de las dosis excretadas por otras vías como la orina, el pelo etc.

Burns y Baselt¹⁰³ en un experimento con 18 voluntarios determinaron COC en muestras de sudor por radioinmunoensayo (RIE) entre 60 min y 8 días después de la administración de diferentes dosis de clorhidrato de COC por vía intranasal. Las muestras de sudor se tomaron con AAA (sudormed), las cuales se eluyeron con 2,5 mL de una mezcla de buffer acetato 0,2 M de pH 5 con Tritón X-100 0,1 %. Posteriormente 25 µL de este eluato se sometió al procedimiento de RIE, realizando las confirmaciones por CG/EM. Estos autores demostraron que dosis tan bajas como 50 mg, pueden ser detectadas en el sudor hasta después de 7 días de su consumo, constatando además que pueden encontrarse a las pocas horas del consumo y que estas concentraciones van aumentando hasta 48 h posterior al dosage, disminuyendo después paulatinamente.

Meconio

El consumo de COC durante el embarazo se ha convertido en un problema de salud en los últimos años en varios países, fundamentalmente en los EEUU, donde cada año nacen más de 100 000 niños que durante el embarazo de sus madres han estado expuesto a la COC. Las complicaciones neonatales asociadas al uso de COC durante el embarazo son muy variadas e incluyen por ejemplo, retardo en el crecimiento, malformaciones congénitas y muerte súbita entre otras complicaciones.¹⁰⁴ La terminología "crack babies" que se refiere fundamentalmente a los niños que durante el embarazo de sus madres estuvieron

expuestos a la COC, ya se ha generalizado y muchas veces se vincula a los niños que han estado expuestos a través de sus madres a cualquier droga de abuso.¹⁰⁵

Ostrea y col.^{106, 107} fueron los primeros en demostrar la utilidad del meconio para el diagnóstico de la exposición gestacional a drogas de abuso, destacando además que esta muestra es superior a la orina para estos fines, debido a que generalmente los niveles de drogas son más altos y brindan más información acerca de una historia anterior de consumo.

Las muestras de meconio requieren de un pretratamiento antes de ser sometidas a los métodos de extracción y análisis. Generalmente estas muestras son homogeneizadas con metanol y/o soluciones buffers, se centrifugan y en el sobrenadante resultante se aplican métodos inmunoanalíticos y/o se someten a extracciones (ELL, EFS) para ser analizados los extractos por CG/EM.^{108, 109}

En el meconio se han identificado muchos metabolitos de la COC, entre los cuales predomina la meta hidroxibenzoilecgonina (m-OHBE), pero no se ha podido demostrar que sea un metabolito exclusivo del metabolismo fetal. Lewis y col.¹¹⁰ determinaron COC, BE y m-OHBE en 366 muestras de meconio, utilizando para ello un método de inmunoensayo de polarización fluorescente para el rastreo inicial y un procedimiento por CG/EM para las confirmaciones. Estos autores partieron de 0,5-1 g de meconio, y aislaron los analitos mediante EFS (columnas de tipo mixto) y demostraron la prevalencia del metabolito meconado en dichas muestras.

Oyler y col.¹¹¹ detectaron COC, EME, BE, AEME, EEE, COCET, NORCOC, NORCOCET, NORBE, m-OHBE, para hidroxibenzoilecgonina (p-OHB), meta hidroxicoína (m-OH COC) y para hidroxicoína (p-OHCOC) en muestras de meconio procedentes de neonatos hospitalizados en cuidados intensivos, empleando para ello un método por CG/EM. Al meconio (0,1 - 0,7 g) se le añadieron 2 mL de metanol y se centrifugó, mezclándose el sobrenadante con 3 mL de buffer acetato de sodio 2 M de pH 4. Después de centrifugar, el sobrenadante se sometió a una EFS con columnas Clean Screen (de tipo mixto). Estos autores demostraron que los metabolitos m y p-OHBE no son propios del metabolismo fetal debido a que fueron detectados en orinas procedentes de sujetos adultos, incluyendo las madres de los niños.

Recientemente El Sohly y col.¹¹² determinaron NORCOC, BE, NORBE, EME, COCET, p-OHCOC, m-OHCOC, p-OHBE y m-OHBE en muestras de meconio procedentes de neonatos por CG/EM. Para esto partieron de 1 g de meconio y le adicionaron 6 mL de metanol, se homogeneizó perfectamente la mezcla y el sobrenadante se evaporó hasta 0,5 mL seguido de la adición de 3 mL de un buffer fosfato 0,1 M de pH 6. Esta mezcla se sometió a una EFS con columnas Clean Screen(r) (acondicionamiento: con 2 x 3 mL de metanol, 2 x 3 mL de agua desionizada, y 1 x 3 mL de buffer fosfato de pH 6, lavado: con 1 mL de agua desionizada, 1 mL de HCl 0,1 N y 3 mL de metanol, elución: 3 mL de cloruro de metileno: isopropanol:amoníaco (78:20:2). Estos autores sugirieron que el diagnóstico del consumo de COC debe monitoriarse directamente a través de la determinación de BE y sus meta y para hidroxiderivados.

Análisis de cocaína y sus metabolitos por cromatografía gas-líquido

Uno de los factores más importantes que influye en la eficiencia de un método cromatográfico es la columna cromatográfica y por supuesto la fase estacionaria presente en ella. Columnas capilares con fases estacionarias del tipo SE-30, OV-1, SE-54, OV-17, OV-225, etc. han sido utilizadas para el análisis de gran cantidad de drogas de abuso, ya sea de carácter ácido, básico o neutro.¹¹³ Existe una gran diferencia entre las columnas empacadas o de relleno, las capilares y semicapilares, refiriéndose no sólo a sus dimensiones sino también a la eficiencia que se obtiene con estas dos últimas. Los detectores más utilizados en cromatografía gas-líquido de drogas de abuso son: el de ionización de llama, el de llama alcalina y la espectrometría de masas. La mayoría de los métodos reportados en los últimos años para el análisis de COC y su metabolitos involucran la utilización de columnas capilares de tipo HP-1 (100 % dimetilpolisiloxano), HP-5 (metilpolisiloxano con 5 % de fenilo) con la EM, utilizando ionización por impacto electrónico (IE) y monitoreo selectivo de iones (MSI) como método de detección.

La derivatización de los analitos antes de ser cromatografiados es otro aspecto importante en el análisis de drogas de abuso y sus metabolitos, y constituye en muchos casos un procedimiento esencial para obtener una separación óptima. Aunque estos procedimientos incrementan el costo y el

tiempo requerido para realizar un análisis, tienen varios beneficios, entre los cuales se pueden citar: el mejoramiento de la especificidad, sensibilidad, precisión, linealidad y la estabilidad térmica de dichos analitos. Algunos de los agentes derivatizantes más utilizados para analizar los metabolitos de la COC son: N-metil-N,(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), N-metil-N-(t-butildimetilsilil) trifluoroacetamida (MTBSTFA), N,O,bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), N,O,bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), anhídrido pentafluoropropiónico (APFP), pentafluoropropanol (PFP), anhídrido heptafluoropropiónico (AHFP), anhídrido pentafluoropropiónico (APFP), dimetilformamida-dihidro-propilacetil (DMF/DPA), iodobutano (IB), diazometano (DZ), etc.¹¹⁴ El objetivo de estas derivatizaciones es el de preparar los trimetilsilil derivados o los pentafluoropropioiderivados de los analitos correspondientes. Estas reacciones se llevan a cabo generalmente a temperaturas entre los 50 y los 80 °C (entre 15 y 30 min).¹¹⁵

En la Tabla 1 aparecen resumidos algunos de los métodos informados para el análisis de COC y sus metabolitos por CG en diferentes muestras biológicas.

Como puede apreciarse la mayoría de los métodos de análisis simultáneo de COC y sus metabolitos por CG, utilizan columnas capilares de cuarzo (metil silicona o fenil metil silicona), con He como gas portador, empleando un programa de temperatura que generalmente comienza por debajo de los 100 °C y que llega hasta alrededor de los 280 °C en la mayoría de los reportes. Las reacciones de derivatización más empleadas son la preparación de los fluoropropio derivados y los trimetilsilil derivados, empleando la espectrometría de masas en cualquiera de sus variantes como método de detección.

CONCLUSIONES

La mayoría de los métodos que se han informado en los últimos 10 años para la determinación de COC y sus principales metabolitos en fluidos biológicos involucran procedimientos de EFS seguido de una técnica de cromatografía capilar con fases de tipo HP-1 y HP-5, utilizando la EM como método de detección en el modo MSI y con IE como modo de ionización. El presente trabajo considera todas las matrices posibles donde la COC y sus metabolitos pueden ser investigados y constituye una recopilación de datos

completa de una importancia crucial para todos los químicos que trabajan en esta temática en el mundo.

BIBLIOGRAFIA

1. Renzo A.A. Coca, cocaína: su historia, producción y consumo. *Rev. Prev. Salud Soc.*, 3, 4, 1990.
2. Ferrara S.D. Il Laboratorio di Farmacologia e Tossicologia clinica. Capitolo 15. Stupefacenti. CG. De. Med. Scient. Torino, p-41, 1989.
3. Patrinely J.R., Cruz O.A., Reyna G.S. and King J.W. The use of Cocaine as an Anesthetic in Lacrimal Surgery. *J. Anal. Toxicol.*, 18, 54, 1994.
4. Pérez A.G. Cocaína, surgimiento y evolución de un mito. Catálogo Científico, p-50 Colombia. 1987.
5. Zhang J.Y. and Foltz R.L. Cocaine metabolism in man: identification of four previously unreported cocaine metabolites in human urine. *J. Anal. Toxicol.*, 14, 201, 1990.
6. Cone E.J., Tsadik A., Oyler J. and Darwin W.D. Cocaine metabolism and urinary excretion after different routes of administration. *Ther. Drug Monit.*, 20, 556, 1998.
7. Karlix J. and Bertholf R.L. Detection of cocaine and its metabolites in amniotic fluid and umbilical cord tissue. *J. Anal. Toxicol.*, 21, 97, 1997.
8. Jenkins A.J. and Goldberger B.A. Identification of unique cocaine metabolites and smoking by-products in post-mortem blood and urine specimens. *J. Forensic Sci.*, 42, 824, 1997.
9. Lillsunde P. and Korte T. Comprehensive drug screening in urine using Solid-Phase Extraction and combined TLC and GC/MS identification. *J. Anal. Toxicol.*, 15, 71 1991.
10. Ramcharitar V., Levine B. and Smialek J.E. Benzoylcegonine and ecgonine methyl ester concentrations in urine specimens. *J. Forensic Sci.*, 40, 99, 1995.
11. Katagi M., Nishioka H., Nakajima K. and Tsuchihashi H. Analysis of abused drugs in humans urine with commercial enzyme immunoassay reagents. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 42, 159, 1996.
12. Drummer O.H., Horomidis S., Kourtis S., Syrjanen M.L. and Tippett P. Capillary gas-chromatographic drug screen for use in forensic toxicology. *J. Anal. Toxicol.*, 18, 134 1994.
13. Cone E.J. and Mitchell J. Validity testing of commercial urine cocaine metabolite assays: II. Sensitivity, specificity, accuracy and confirmation by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Forensic Sci.*, 34, 32, 1989.
14. Weinmann W. and Svodoba M. Fast screening for drugs of abuse by solid Phase extraction combined with flow-injection inospray tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, 22, 319, 1998.
15. Verebey K. and DePace A. Rapid confirmation of enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT[®]) cocaine positive urine samples capillary gas-liquid chromatography/nitrogen phosphorus detection. (GLC/NPD). *J. Forensic Sci.*, 34, 46, 1989.
16. Kumazawa T., Watanabe K., Sato K., Seno H., Ishii A. and Suzuki O. Detection of cocaine in human urine by solid phase microextraction and capillary gas chromatography with Nitrogen-Phosphorus detection. *Jpn. J. Forensic Toxicol.*, 13, 207, 1995.
17. Scheuer J. and Moore C.M. Solid-Phase Extraction of drugs from biological tissues-A review. *J. Anal. Toxicol.*, 16, 264 1992.
18. Kenneth G.F. Trends in techniques for the extraction of drugs and pesticides from biological specimens prior to chromatographic separation and detection. *Anal. Chim. Acta.*, 236, 99 1990.
19. Penton Z. Sample preparation for gas chromatography with solid phase extraction and solid phase microextraction. *Adv. Chrom.*, 37, 205, 1996.
20. Degel F. Comparison of new solid phase extraction methods for chromatographic identification of drugs in clinical toxicological analysis. *Clinical Biochem.*, 29, 529, 1996.
21. Chen X., Wisbeek J., Van Veen J., Franke J.P. and de Zeeuw R.A. Solid phase extraction for the screening of acidic, neutral and basic drugs in plasma using a single column procedure on Bon-Elut Certify. *J. Chromatogr.*, 529, 161, 1990.
22. Chen X., Franke J.P., Wijsbeek J. and de Zeeuw R.A. Determination of basic drugs extracted from biological matrices by means of solid phase extraction and Wide-Bore capillary gas chromatography with Nitrogen-Phosphorus detection. *J. Anal. Toxicol.*, 18, 150 1994.
23. Logan B.K., Stanifford D.T., Tebbett T.R., and Moore C.M. Rapid screening for 100 basic drugs and metabolites in urine using cation exchange solid phase extraction and high performance liquid chromatography with diode array detection. *J. Anal. Toxicol.*, 14, 154, 1990.
24. Chen X., Franke J.P., Wijsbeek J. and de Zeeuw R.A. Isolation of acidic, neutral and basic drugs from whole blood using a single mixed mode solid phase extraction column. *J. Anal. Toxicol.*, 15, 35 1992.
25. Clauwaert K.M., Lambert W. and De Leenheer A. High performance liquid chromatographic determination of cocaine and its main metabolites in biological samples: A review. *J. Liq. Chromatogr.*, 18, 2 097, 1995.
26. Verebey K. Laboratory methodology for drug and alcohol addiction. Comprehensive handbook of drug and alcohol addiction. Ed., Marcel DEKKER, inc. New York. 809-824, 1991.
27. Puchades Q.A., Magallon I.E., del Baño M.J.P., Caqigral B.F.J. and Noguera S.B. Evaluación de los controles de orina de centros asistenciales y rehabilitación del programa municipal de drogodependencias. *Rev. Esp. Drogodep.*, 19, 245 1994.
28. Department of Health and human service. Mandatory Guideline for Federal workplace drug testing programs. Federal Register. Vol. 53 No. 69. Monday. April 11, p 1 170-1 189, 1988.
29. European workplace drug testing group. (EWDGTG). *Bulletin of TIAFT*, 28, 3, 1998.
30. Recommendations for the reliable detection of illicit drugs in urine in the European Union, with special attention to the workplace. *Bulletin of TIAFT*, 27, 14, 1997.
31. United Nation International Drug Control Programme. Recommended methods for the detection and assay of heroin, cannabinoids, cocaine, amphetamine, methamphetamines and ring-substituted amphetamines derivatives in biological specimens, ST/NAR/27, Ed United Nation, New York., 5-14, 1995.
32. Sweeney W., Goldbaum L.R. and Lappas N.T. Detection of benzoilecgonine in urine by means of UV spectrophotometry. *J. Anal. Toxicol.* 7, 235, 1983.
33. Soriano C., Guerra J.M., Carreras D., Rodríguez C., Rodríguez A. F. and Cortés R.

- Automated analysis of drugs in urine. *J. Chromat. B*, **687**, 183, 1996.
34. Kintz P., Cirimele V., Sengler C. and Mangin P. Testing human hair and urine for anhidroecgoninemethyl ester, a pyrolysis product of cocaine. *J. Anal. Toxicol.*, **19**, 479, 1995.
35. Levine B., Ramcharitar V. and Smialek J.E. Stability of ecgonine methyl ester in post-mortem urine specimens. *J. Forensic Sci.*, **41**, 126, 1996.
36. Sukbuntherng J., Walters A., Chow H. and Mayersohn M. Quantitative determination of cocaine, cocaethylene (ethylcocaine), and metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.*, **84**, 799, 1995.
37. Hombeck C.L., Barton K.M. and Czarny R.J. Urine concentrations of ecgonine from specimens with low levels using a new ecgonine assay. *J. Anal. Toxicol.*, **19**, 133, 1995.
38. Matsubara K., Masada C. and Fukui Y. Quantitation of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester by g.d.-chemical ionization (ms)-selected-ion monitoring after Extrelut extraction. *Forensic Sci. Int.*, **26**, 181, 1984.
39. Isenschmid D., Levine B.S. and Caplan Y.H. Method for the simultaneous determination of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester in blood and urine using GC-EIMS with derivatization to produce high-mass molecular ions. *J. Anal. Toxicol.*, **12**, 242, 1988.
40. Ferrara S.D., Tedeschi L., Frison G., and Castagna F. Solid Phase Extraction and HPLC-UV confirmation of drugs of abuse in urine. *J. Anal. Toxicol.*, **16**, 217, 1992.
41. De la Torre R., Ortuño J., González M. L., Farre M., Cami J. and Segura J. Determination of cocaine and its metabolites in human urine by gas chromatography-mass spectrometry after simultaneous use of cocaine and ethanol. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **13**, 305, 1995.
42. Fernández P., La Fuente N., Bermejo A. M., López-Rivadula M. and Cruz A. HPLC determination of cocaine and benzoylecgonine in plasma and urine from abusers. *J. Anal. Toxicol.*, **20**, 224, 1996.
43. Ortuño J., De la Torre R., Segura J. and Cami J. Simultaneous detection in urine and its metabolites. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **8**, 911, 1990.
44. Clauwaert K.M., Van Bocxlaer J.F., Lambert W.E. and De Leenheer A.D. Analysis of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in urine by HPLC with diode array detection. *Anal. Chem.*, **68**, 3021, 1996.
45. Nishihikawa M., Nakajima K., Tatsunno M., Kasuya F., Igarashi K., Fukui M. and Tsuchihashi H. Analysis of cocaine and its metabolites by liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical-ionization-mass spectrometry (LC-APCI-MS). *Forensic Sci. Int.*, **6**, 149, 1994.
46. Jenkins A.J. and Goldberger B.A. Identification of unique cocaine metabolites and smoking by-products in post-mortem blood and urine specimens. *J. Forensic Sci.*, **42**, 824, 1997.
47. DuBey I.S. and Caplan Y.H. The storage of forensic urine drug specimens as dry stains: recovery and stability. *J. Forensic Sci.*, **41**, 845, 1996.
48. Dugan S., Bogema S., Schwartz R.W. and Lappas N.T. Stability of drugs of abuse in urine samples stored at -20°C. *J. Anal. Toxicol.*, **18**, 391, 1994.
49. Hippenstiel M.J. and Gerson B. Optimization of storage conditions for cocaine and benzoylecgonine in urine. A review. *J. Anal. Toxicol.*, **1**, 104, 1994.
50. Singer K., Wenz B., Seefeld V. and Speer U. Determination of drugs of abuse using solid phase microextraction. *Labor. Med.*, **18**, 112, 1995.
51. Lillsunde P., Michelson L., Forsström T., Korte T., Shultz E., Arinniemmi K., Portman M., Sihvonen M.L. and Seppälä T. Comprehensive drug screening in blood for detecting abuse drugs or drugs potentially hazardous for traffic safety. *Forensic Sci. Int.*, **77**, 191, 1996.
52. Lillsunde P. Drugs and driving, analytical and epidemiological aspects. Publications of the National Public Health Institute. Academic Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy. KTL A3/p-29. Helsinki. 1996.
53. Zweipfennig P.G.M., Wilderink A.H.C.M., Horsthuis P., Franke J.P. and De Zeeuw R.A. Toxicological analysis of whole blood samples by means of Bond Elut Certify columns and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J. Chromatogr.*, **674**, 87, 1994.
54. Tebbett I.R. and McCartney Q.W. Rapid method for the extraction of cocaine and benzoylecgonine from body fluids. *Forensic Sci. Int.*, **39**, 287, 1988.
55. Soriano T., Jurado C., Menéndez M. and Repetto M. Improved solid phase extraction method for systematic analysis in biological fluids. Proceedings of TIAFT annual meeting. Poster Session. October 9, Albuquerque, 1998.
56. Abusada G.M., Abukhalaf I.K., Alford D.D., Vinzon-Buastista I., Ansari N.A., Manno J.E. and Manno B.R. Solid-phase extraction and GC-MS quantitation of cocaine, ecgonine methyl ester, benzoylecgonine and cocaethylene from meconium, whole blood and plasma. *J. Anal. Toxicol.*, **17**, 353, 1993.
57. Aderjan R.E., Schmitt G., Wu M. and Meyer C. Determination of cocaine and benzoylecgonine by derivatization with iodomethane D3 or PFPA-HFIP in human blood and urine using GC/MS (EI or PCI mode). *J. Anal. Toxicol.*, **17**, 51, 1993.
58. Miller S.R., Salo A.L., Boggan W.O. and Patrick K.S. Determination of plasma cocaine and ethylcocaine (cocaethylene) in mice using gas chromatography-mass spectrometry and deuterated internal standards. *J. Chromatogr. B*, **656**, 335, 1994.
59. Cox R.A., Crifasi J.A., Dickey R.E., Ketzler S.C. and Pshak G.L. A single step extraction for screening whole blood for basic drugs by capillary GC/NPD. *J. Anal. Toxicol.*, **13**, 224, 1989.
60. Sims D.N., Felgate P.D., Felgate H.E. and Lokan R.J. Application of a simple extraction procedure using aqueous ammonia to the analysis of basic drugs in blood by gas chromatography. *Forensic Sci. Int.*, **49**, 33, 1991.
61. Logan B.K., Smirnow D. and Gulberg R.G. Lack of predictable site-dependent differences and time co-dependent changes in post-mortem concentrations of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in humans. *J. Anal. Toxicol.*, **20**, 23, 1997.
62. Moriya F. and Hashimoto Y. Post-mortem Stability of cocaine and cocaethylene in blood and tissues of humans and rabbits. *J. Forensic Sci.*, **41**, 612, 1996.
63. Moriya F. and Hashimoto Y. The effect of post-mortem interval on the concentrations of cocaine and cocaethylene in blood and tissues: an experiment using rats. *J. Forensic Sci.*, **41**, 129, 1996.
64. Sukbuntherng J., Martin D.K., Pak Y. and Mayersohn M. Characterization of the properties of cocaine in blood: blood clearance, blood to plasma ratio, and plasma protein binding. *J. Pharm. Sci.*, **85**, 567, 1996.
65. Ma F., Zhang J. and Lau C.E. Determination of cocaine and its metabolites in serum microsamples by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetics in rats. *J. Chrom. B*, **693**, 307, 1997.
66. Coburn M.R. and Koves E.M. Gas chromatography-mass spectrometry for determination of cocaine and benzoylecgonine over a wide concentration range (0.005-5 mg/dL) in post-mortem blood. *J. Forensic Sci.*, **39**, 136, 1994.
67. Smirnow D. and Logan B.K. Analysis of Ecgonine and other cocaine biotransformation products in post-mortem whole blood by protein precipitation-Extractive Alkylation and GC-MS. *J. Anal. Toxicol.*, **20**, 463, 1996.
68. Shankar V., Damodaran C. and Sekharan C.P. Comparative evaluation of some enzymic digestion procedures in the release of basic drugs for tissue. *J. Anal. Toxicol.*, **11**, 164, 1987.
69. Pounder D.J. and Jones G.R. Post-mortem drug redistribution- A toxicological nightmare. *Forensic Sci. Int.*, **45**, 253, 1990.
70. Spiehler V.R. and Reed D.B.S. Brain concentrations of cocaine and benzoylecgonine in fatal cases. *J. Forensic Sci.*, **30**, 1003, 1985.
71. Browne S.P., Moore C.M., Sheuer J., Tebbett I.R. and Logan B.K. A rapid method for the determination of cocaine in brain tissue. *J. Forensic Sci.*, **36**, 1662, 1991.
72. Moore C., Browne S., Tebbett I.R. and Negrusz A. Determination of cocaine and its metabolites in brain tissue using flow solid Phase extraction columns and High performance Liquid chromatography. *J. Forensic Sci. Int.*, **53**, 215, 1992.
73. Karch S.B., Heam L., Mash D. and Ruttenberg J. Post-mortem diagnosis of cocaine toxicity: the utility of brain concentration measurements. Proceeding of TIAFT annual meeting. Thursday October 8, 1998 (<http://www.cbft.unipd.it/tiaft/meeting>).
74. Huang Z.P., Chen X.H., Wijsbeek J., Franke J.P. and De Zeeuw R.A. An enzymic digestion and Solid Phase extraction procedure for the screening for acidic, neutral, and basic drugs in liver using gas chromatography for analysis. *J. Anal. Toxicol.*, **20**, 248, 1996.
75. United Nations International Drug Control Programme. Guidelines for testing drugs under international control in Hair, sweat and saliva. United Nations, ST/NAR/30/Rev.1, New York, p - 15-18, 1998.
76. Saliva Sampler, <http://www.sav.com>, 1998.
77. Schramm W., Smith R.H., Craig P.A. and Kidwell D.A. Drugs of abuse in saliva: A review. *J. Anal. Toxicol.*, **16**, 1, 1992.
78. Schramm W., Craig P.A., Smith R.H., and Berger G.E. Cocaine and benzoylecgonine in saliva, serum and urine. *Clin. Chem. (Winston-Salem, NC)*, **39**, 481, 1993.
79. Barberi E.J., DiGregorio G.J., Ferko A.P. and Ruch E.K. Rat cocaethylene and benzoylecgonine concentrations in plasma and parotid saliva after the administration of cocaethylene. *J. Anal. Toxicol.*, **18**, 60, 1994.
80. Peel H.W., Perrigo B.J., and Mikhael N.Z. Detection of drugs in saliva of impaired drivers. *J. Forensic Sci.*, **29**, 185, 1984.

81. Cone E.J. and Weddington W.W. Prolonged occurrence of cocaine in human saliva and urine after chronic use. *J. Anal. Toxicol.*, **13**, 65, 1989.
82. Cone E.J., Oyler J. and Carwin D.W. Cocaine disposition in saliva following intravenous, intranasal, and smoked administration. *J. Anal. Toxicol.*, **21**, 465, 1997.
83. Kato K., Hills Grove M., Weinhold L., Gorelic D.A., Darwin W.D., and Cone E.J. Cocaine and metabolite excretion in saliva under stimulated and non-stimulated conditions. *J. Anal. Toxicol.*, **17**, 338, 1993.
84. Henderson G.L. Mechanisms of drug incorporation in hair. *Forensic Sci. Int.*, **63**, 19, 1993.
85. Nakahara Y., Takahashi K., and Kikura R. Hair analysis for drugs of abuse. X. Effect of physicochemical properties of drugs on the incorporation rates into hair. *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1223, 1995.
86. Joseph R.E., Su T.P. and Cone E.J. In vitro binding studies of drugs to hair: influence of melanin and lipids on cocaine binding to caucasoid and african hair. *J. Anal. Toxicol.*, **20**, 338, 1996.
87. Baumgartner A.M., Black C.T. and Jones P.F. Radioimmunoassay of cocaine in hair: concise communication. *J. Nucl. Med.*, **23**, 790, 1982.
88. Smith F.P. and Liu R.H. Detection of cocaine metabolite in perspiration stain, menstrual bloodstain, and hair. *J. Forensic Sci.*, **31**, 1269, 1986.
89. Springfield A.C., Cartmell L.W., Aufderheide A.C., Buikstra J., and Ho J. Cocaine and metabolites in the hair of ancient Peruvian coca leaf chewers. *Forensic Sci. Int.*, **63**, 269, 1993.
90. Moeller M.R., Fey P., and Rimbach S. Identification and quantitation of cocaine and its metabolites, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester, in hair of Bolivian coca chewers by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, **16**, 291, 1992.
91. Bermejo-Barrera A.M. and Strano-Rossi S. Hair and urine analysis: relative distribution of drugs and their metabolites. *Forensic Sci. Int.*, **70**, 203, 1995.
92. Gaillard Y. and Pepin G. Simultaneous solid - Phase extraction on C - 18 cartridges of opiates and cocaine for an improved quantitation in human hair by GC - MS: one year of forensic applications. *Forensic Sci. Int.*, **86**, 49, 1997.
93. Hold K.M., Hubbard D.L., Wilkins D.G., and Rollins D.E. Quantitation of cocaine in human hair, the effect of centrifugation of hair digest. *J. Anal. Toxicol.*, **22**, 414, 1998.
94. Hold K.M., Wilkins D.G., Rollins D.E., Joseph R.E., and Cone E.J. Simultaneous quantitation of cocaine, opiates and their metabolites in human hair by positive ion chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.*, **36**, 125, 1998.
95. Cone E.J., Yousefnejad D., Darwin W.D., and Maguire T. Testing human hair for drugs of abuse. II. Identification of unique cocaine metabolites in hair of drugs abusers and evaluation of decontamination procedures. *J. Anal. Toxicol.*, **15**, 250, 1991.
96. Clauwaert K.M., Van Boclaer J.F., Lambert W.E., Van Den Eeckhout E.G., Lemiére F., Esmans E.L. and De-Leenheer A.P. Narrow-Bore HPLC in combination with fluorescence and electrospray mass spectrometric detection for the analysis of cocaine and metabolites in human hair. *Anal. Chem.*, **70**, 2336, 1998.
97. Bourland J.A., Hayes E.F., Sweeney S.A. and Nelly R.C. Quantitation of cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene, methylecgonine and norcocaine in human hair by positive ion chemical ionization (PICI) gas chromatography-tandem mass spectrometry (CG/MS/MS). TIAFT annual meeting. Poster Session 1, Wednesday October 7, 1998. <http://www.cbft.unipd.it/tiaft/meeting>
98. Suzuki O., Hattori H. and Asako M. Nail as useful materials for detection of methamphetamine or amphetamine abuse. *Forensic Sci. Int.*, **24**, 9, 1984.
99. Tiess D., Wegener R., Rudolph L., Steffen U., Tiefenbach B., Weirich V. and Zack F. Cocaine and benzoylecgonine concentrations in hair, nails and tissue: comparative study of ante and post mortem materials in a case of an acute lethal cocaine intoxication. Proceedings of the 1994 Joint TIAFT/SOFT International meeting. V. Spiehler, Ed. TIAFT/SOFT Joint congress, p-343, 1994.
100. Roper-Miller J.D., Gorside D., Goldberger B.A., Hamilton W.F. and Maples W.R. Nails: another useful matrix for the identification of cocaine exposure. Proceeding of the 50th Anniversary meeting of American Academy of Forensic Science, p-262, 1998.
101. Wtsadik A.T., Oyler J.M., Cone E.J., Joseph R.E., and Schoendorfer D.W. Sweat testing for drugs of abuse I: comparison of cocaine disposition in sweat collected with a heated sweat patch device and the PharmChek™ swate patch. TIAFT annual meeting, Scientific Session 3. Thursday October 8, 1998.
102. Spiehler V., Fay J., Fogerson R., Schoendorfer D. and Niedbala R.S. Enzyme immunoassay validation for qualitative detection of cocaine in sweat. *Clin. Chem.*, **42**, 34, 1996.
103. Burns M., and Baselt R.C. Monitoring drug use with a sweat patch: an experimental with cocaine. *J. Anal. Toxicol.*, **19**, 41, 1995.
104. Guillet A.F., Breunec J.Y., Baert A., Javaudin L. and Chevrant-Breton O. Cocaine et Grossesse: revue Littéraire. *J. Pharm. Clin.*, **14**, 299, 1995.
105. Litt J. and Mcneil M. "crack babies" and the politics of reproduction and nurturance. Troubling children, studies of children and social problem. Ed Aldine de Gruyter, New York, p-93-113, 1994.
106. Ostrea E.M., Porus P.M. and Brady M.J. Rapid isolation and detection of drugs in meconium of infants of drug dependent mothers. *Clin. Chem.*, **34**, 2372, 1988.
107. Ostrea E.M., Brady M.J., Parks P.M., Arsenio D.C., and Noluz A. Drug screening of meconium in infants of dependent mothers: an alternative to urine testing. *J. Pediatrics*, **115**, 474, 1989.
108. Lewis D.E., Moore C.M., Leikin J.B. and Koller A. Meconium analysis for cocaine: a validation study and comparison with paired urine analysis. *J. Anal. Toxicol.*, **19**, 148, 1995.
109. ElSohly M.A., Stanford D.F., Morphy T.P., Lester B.M., Wright L.L., Smeriglio V.L., et al. Immunoassay and procedures for the analysis of drug abuse in meconium. *J. Anal. Toxicol.*, **23**, 436, 1999.
110. Lewis D., Moore C., Becker J. and Leikin J. Prevalence of methyldihydroxybenzoylecgonine (m-OHBE) in meconium samples. Proceedings of the 1994 joint TIAFT/SOFT International meeting. Tampa, Florida, pp-513-518, 1994.
111. Oyler J., Darwin W.D., Preston K.L., Sress D., and Cone E.J. Cocaine disposition in meconium from newborns of cocaine abusing mothers and urine of adult drug user. *J. Anal. Toxicol.*, **20**, 453, 1996.
112. ElSohly M.A., Kopycki W., Feng S. and Murphy T.P. Identification and analysis of the major metabolites of cocaine in meconium. *J. Anal. Toxicol.*, **23**, 446, 1999.
113. Leach H. and Ramsey J.D. Gas chromatography. In Clarke's Isolation and Identification of drugs. AC Moffat, Jackson J.V. Moss M., Widdop B. The Pharmaceutical press, London, ISBN 0-85369-166-5, p-178-200, 1986.
114. Karch S.B., Heam L., Mash D. and Ruttenber J. Post-mortem diagnosis of cocaine toxicity: the utility of brain concentration measurements. TIAFT annual meeting. Thursday October 8, 1998.
115. Segura J., Ventura R. and Jurado C. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **713**, 61, 1998.
116. Peterson K.L., Logan B.K., and Christian G.D. Detection of cocaine and its polar transformation products and metabolites in human urine. *Forensic Sci. Int.*, **73**, 183, 1995.
117. Hernández A., Andolfi W. and Hearn W.L. Analysis of cocaine and metabolites in human brain using solid-phase extraction and full scanning gas chromatography ion trap mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.*, **65**, 149, 1994.
118. Harzer K. Detection of narcotics in serum. *LaborPraxis*, **20**, 44, 1996.
119. Cárdenas S., Gallego M., and Valcárcel M. An automated preconcentration derivatization system for the determination of cocaine and its metabolites in urine and illicit cocaine samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 631, 1996.
120. Wang L., Darwinn W.D. and Cone E.J. Simultaneous assay of cocaine, heroin and metabolites in hair, plasma, saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **660**, 279, 1994.
121. Virag L., Jandor S., Chao C.R., and Morishima H.O. Sensitive assay for cocaine and benzoylecgonine using solid phase extraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. B*, **658**, 135, 1994.
122. Crouch D.J., Alburges M.E., Spanbauer A.C., Rollins D.E., Moody D.E. and Chasin A.A. Analysis of cocaine and its metabolites from biological specimens using solid phase extraction and positive ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, **19**, 352, 1995.
123. De Giovanni N. and Strano Rossi S. Simultaneous extraction of cocaine and heroin metabolites in urine by solid Phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **658**, 69, 1994.
124. Cone E.J., Hills Grove M., and Darwin W.D. Simultaneous measurement of cocaine, cocaethylene, their metabolites, and "crack" pyrolysis product by gas chromatography - mass spectrometry. *Clin. Chem. (winston-Salem, NC)*, **40**, 1299, 1994.
125. Paul B.D., Dreka C., Summers J.L. and Smith M.L. One-step esterification of benzoylecgonine with dimethylformamide-dipropylacetal or dimethylformamide-diisopropylacetal in the presence of pyridine. *J. Anal. Toxicol.*, **20**, 506, 1996.

Tabla 1. Análisis de cocaína y sus metabolitos por cromatografía de gases

Referencia	Muestras y analitos	Modo de extracción	Agente derivatizante	Estándar interno	Programa de temperatura	Modo de detección	Límite de detección	Gas portador	Columna
Lillsinde y col. ⁹	Sangre, COC, BE, COCET	ELL	AHFP	Procaina	15 °C/min-320 °C-1 min	DNF CE	BE, COCET- 0,01 µg/mL COC- 0,025 µg/mL	He 1 mL/min	HP-5
Lillsinde y col. ⁹	Sangre, COC, BE,	ELL	APFP		60 °C-1 min 30 °C/min-300 °C-2 min	EM, IE, MSI	BE, COCET- 0,01 µg/mL COC- 0,025 µg/mL	He 1 mL/min	HP-1
Peterson y col. ¹¹⁶	Orina, COC, EME, BE, EG	EFS	DZ		100 °C 13 °C/min-295 °C-7 min	EM, IE, MSI	0,025 µg/mL 0,5 µg/mL	He 1 mL/min	HP-5
Bermejo y col. ⁹¹	Orina, pelo, COC, BE	"toxi tube A"	BSTFA	Proadifen	130 °C-1 min 12 °C/min-280 °C-5 min	EM, IE MSI		He 1 mL/min	BP-5
Drummer y col. ¹²	Sangre, plasma COC	ELL		Ciclizina	100 °C-2 min 75 °C/min-310 °C-10 min	DNF	0,02 µg/mL	He 3 mL/min	BP-5
Hernández y col. ¹¹⁷	Cerebro COC	EFS	HFP/APFP	Análogos deuterados	115 °C-1,3 min 15 °C/min-290 °C-2 min	EM, IE, MSI	25 ng/mL	He 1 mL/min	DB-5
Aderjan y col. ⁵⁷	Sangre, orina, COC, BE	EFS	APFP		170 °C-1 min 20 °C/min-290 °C-1 min	EM, IE MSI	COC- 20 ng/mL BE- 40 ng/mL	He 1 mL/min	CP-SIL (tipo HP-1)
Isenschmid y col. ³⁸	Sangre, orina, COC, BE, EME	Chem-Elut	DMF/DPA	Análogos deuterados	100 °C 30 °C/min-250 °C	EM, IE MSI		He 1 mL/min	HP-1
Matzubara y col. ³⁷	Orina, plasma, COC, BE, EME	Extrelut	DMF/DPA	Análogos deuterados	270 °C-(COC, BE) 200 °C 8 °C/min-250 °C (EME)	EM, MSI, IO	BE, COC- 1 ng/mL EME- 10 ng/mL	He 1 mL/min	OV-17 en gas- chrom Q

Tabla 1. Análisis de cocaína y sus metabolitos por cromatografía de gases (Continuación)

Referencia	Muestras y analitos	Modo de extracción	Agente derivatizante	Estándar interno	Programa de temperatura	Modo de detección	Límite de detección	Gas portador	Columna
Harzer ¹¹⁸	Suero, BE	EFS			100 °C-1 min 20 °C/min-240 °C 15 °C/min-340 °C-8 min	EM, IE, MSI	2,5 ng/mL	He 1,2 mL/min	HP-5
Cárdenas y col. ¹¹⁹	Orina, COC, BE, EME	EFS	BSA		100 °C-1 min 12 °C/min-310 °C	EM, MSI, IE	COC- 1 ng/mL BE- 20 ng/mL EME- 200 ng/mL	He 0,8 mL/min	DB-5
Ramcharita y col. ¹⁰	Orina, BE, EME	ELL	IB	Análogos deuterados Mepivacain	260 °C BE 100 °C/min 10 °C/min-260 °C 20 °C/min-300 °C-8 min	EM, IE, MSI, BE, DSNF EME		He 1 mL/min	HP-5
De la Torre y col. ⁴⁰	Orina, COC, BE, EME COCET	EFS	APFP	Análogos deuterados	100 °C 20 °C/min-200 °C 3 °C/min-240 °C 20 °C/min-278 °C	EM, IE MSI	1-2 µg/mL	Hc 0,65 mL/min	HP-5
Wang y col. ²⁰	Pelos, plasma, saliva	EFS	BSTFA		70 °C-min 35 °C/min-220 °C -0,25 min 10 °C/min-250 °C-3 min	EM, IE MSI	5 ng/mL en orina 0,5 ng/mL en pelos	He 1 mL/min	HP-1
Virag y col. ¹²¹	Orina, COC, BE Plasma COC, BE	EFS		Benzoil n-propil éster	200 °C-2 min 30 °C/min-280 °C-6 min	DSNF	COC- 1 ng/mL BE-4 ng/mL ng/mL	Hc 1 mL/min	HP-5
Kintz y col. ³⁴	Orina, pelos, COC, BE EME, COCET	ELL	BSTFA	Análogos deuterados	60 °C-min 30 °C/min-290 °C-5 min	EM EI (70 ev) MSI		Hc 1 mL/min	HP-5

Tabla 1. Análisis de cocaína y sus metabolitos por cromatografía de gases (Continuación)

Referencia	Muestras y analitos	Modo de extracción	Agente derivatizante	Estándar interno	Programa de temperatura	Modo de detección	Límite de detección	Gas portador	Columna
Crough y col. ²²	Sangre, plasma, orina, COC, BE, EME	EFS C18	MSTFA	Análogos deuterados	115 °C-1,5 min 20 °C/min-280 °C-1 min	EM, (IQ), MSI		He 1 mL/min	DB-5
De Giovanni y col. ¹²³	Orina COC, BE, EME	EFS C18	BSTFA	Análogos deuterados	120 °C-1 min 20 °C/min-220 °C-1 min 5 °C/min-260 °C 20 °C/min-280 °C-2 min	EM, IQ MSI	50 ng/mL	He 1 mL/min	HP-1
Cone y col. ¹²⁴	Sangre total, plasma, saliva, orina, COC, BE, EME	EFS	BSTFA	Análogos deuterados	70 °C 220 °C-15 s 33 °C/min-250 °C-15 s 3,5 °C/min-260 °C-15 s	EM, IE, MSI	1-6 µg/mL	He 0,8 mL/min	Metil-silicona
Zhang y col. ⁵	Orina	ELL	APFP, HFP		100 °C-30 s 10 °C/min-250 °C	EM, IE, MSI		He 60 cm/s	DB-1
Miller y col. ⁵⁸	Plasma, COC, COCET	ELL	PFBA	Análogos deuterados	240 °C	EM, IE, MSI		He 55 cm/s	DB-5
United Nation ³¹	Orina, COC, BE	ELL EFS BEC	MSTFA MSTBSTFA	Etilmorfina nalorfina	150 °C 9 °C/min-280 °C	Ionización de llama DNF		HE 2 mL/min	Metil-silicona
Spiehler y col. ⁷⁰	Sangre, cerebro, hígado, COC, BE	ELL	DMF-DPA	Análogos deuterados	270 °C	EM, IE MSI		HE 5 mL/min	OV-17
Kumazawa y col. ¹⁶	Orina COC, BE,	Micro, EFS		Coca propileno	120 °C/1 min-280 °C	DNF	3 ng/mL	He 3 mL/min	DB-1
Soriano y col. ³³	Orina COC	ELL		Difenil-amina	90 °C 10 °C/min-180 °C 30 °C/min-300 °C-5 min	DNF Ionización de llama	0,5 µg/mL	He 0,8 mL/min	5 % fenil Metil-silicona
Verebey y col. ¹⁵	Orina BE	ELL	APFP	Nalorfina	190 °C-0,7 min 30 °C/min-220 °C	DNF	1 µg/mL	He 1,5 mL/min	DB-1
Paul y col. ¹²⁵	Orina BE	EFS	DMF-DPA		180 °C-1 min 30 °C/min-270 °C-2 min 40 °C/min-320 °C-1 min	EM, IE MSI	10 ng/mL	He 1,3 mL/min	DB-5

HFP: Heptafluoro propanol