

Determinación simultánea de Cocaína y sus principales metabolitos en orina por Cromatografía Gaseosa con Detector de Nitrógeno-Fósforo

Juan Francisco Sánchez Bruzón*, Isabel Farrás Fernández*, Homero Cruz Rodríguez*, Beatriz Valera Lozano*, Hilda Herrera Torrientes*, Mailen Iglesias Guerra*, Jacqueline Yanes González* y Luis González Bravo**

*Instituto de Medicina Legal, Departamento de Toxicología Forense, Avenida Independencia y Hernán Cortés, Ciudad de La Habana, CP 10 600, Cuba, **Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6880, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 15 de enero del 2000

Aceptado: 9 de marzo del 2000

Palabras clave: Cocaína y metabolitos, orina, cromatografía gaseosa semicapilar, Evidex™ - EFS
Key words: Cocaine and metabolites, urine, widebore gas chromatography, Evidex™ - SPE

RESUMEN. La determinación simultánea de cocaína (COC) y sus principales metabolitos en orina benzoilecgonina (BE), ecgonina metil éster (EME) y ecgonina (EG) es el procedimiento más eficaz para realizar el diagnóstico del consumo de COC. El presente trabajo trata de la validación de un método analítico para la determinación simultánea de COC, cocaetileno (COCET) y los trimetilsilil derivados de la EME, EG y BE, con lidocaina (LIDO) como patrón interno, que emplea un paso de extracción en fase sólida (EFS) con columnas Evidex™, seguida de la ejecución de una técnica por cromatografía gas-líquido, empleando para ello una columna DB-1 (15 m x 0,53 mm x 3 µm), con un programa de temperatura que va desde 60 °C (por 2 min) hasta 140 °C a razón de 20 °C/min, entonces sube a 170 °C (4 °C/min), luego a 208 °C (40 °C/min), entonces 214 °C (6 °C/min), mantenida por 6 min, terminado a 30 °C/min hasta 244 °C (10 min), con nitrógeno como gas portador (4 mL/min). Se empleó un detector de nitrógeno-fósforo (DNF). Los gráficos fueron lineales en un rango de concentraciones de 406 a 4 060, 224 a 2 240, 108 a 1 088, 116 a 1 167, 184 a 1 840 ng/mL para la EME, EG, COC, COCET y BE respectivamente, con coeficientes de variación menores del 5 % para los Factores Máficos de Respuesta (FMR). Los recobrados obtenidos con muestras fortificadas fueron de 39, 62, 92, 85 y 92 % para la EME, EG, COC, COCET y BE respectivamente. Los límites de detección en orina fueron en ese mismo orden de 87, 79, 41, 10 y 67 ng/mL. El método se validó para muestras de orina y constituye el primer reporte de extracción simultánea de COC y sus principales metabolitos con columnas Evidex™.

ABSTRACT. The simultaneous detection in urine of cocaine (COC) and the main biotransformation products benzoylecgonine (BE), ecgonine methyl ester (EME) and ecgonine (EG) is a reliable way of confirmation of COC use. The purpose of this paper is the validation of qualitative and quantitative method to simultaneous analysis in urine of COC, cocaethylene (COCET) and the BE, EME and EG trimethylsilyl derivatives (BSTFA) with lidocaine (LIDO) as internal standard. This method involves a solid-phase extraction (SPE) procedure using Evidex™ cartridges, and gas chromatographic system, equipped with DB-1 widebore column (15 m x 0.53 mm x 3 µm), operated with temperature programming from 60 °C (held for 2 min) to 140 °C at 20 °C/min then to 170 °C at 4 °C/min, then to 208 °C (40 °C/min), then to 214 °C at 6 °C/min (held for 6 min), then to 244 °C at 30 °C/min (held for 10 min), with specific nitrogen-phosphorus detector (NPD), and N₂ as carrier gas (4 mL/min). The calibration graph was linear from 406-4 060, 224-2 240, 108-1 088, 116-1 167, 184-1840 ng/mL to EME, EG, COC, COCET and BE respectively. The relative standard deviation of response factors was < 5 % in all cases. Recoveries of spiked samples were 39, 62, 92, 85 and 92 % to EME, EG, COC, COCET and BE respectively. The method was validated for use with urine samples. This is the first report of simultaneous SPE of COC and its main metabolites with Evidex™ cartridges.

INTRODUCCION

La Cocaína (COC) es el principal alcaloide que se obtiene de la planta *Eritoxilum coca*, la cual tiene una larga historia de uso y de abuso.¹ La COC es un poderoso estimulante del sistema nervioso central y un anestésico local de gran potencia.^{2, 3} Además esta droga tiene una amplia gama de posibilidades de consumo: puede ser inhalada, fumada, inyectada, bebida en infusiones, aplicada en las mucosas, y también puede mezclarse con otras drogas.⁴

La COC 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 y el cocaetileno (COCET), que se forma en presencia de etanol.⁵⁻⁸

La determinación simultánea de COC y sus principales metabolitos en orina es el procedimiento más eficaz para realizar un diagnóstico inequívoco del consumo de esta sustancia, sin embargo la mayoría de los métodos reportados están diseñados para la detección de BE solamente.⁹⁻¹¹ Se han descrito unos pocos métodos de determinación simultánea de COC y sus principales metabolitos en orina, y esto es debido fundamentalmente a la diferencia en propiedades físico-

químicas, que hace que la coextracción de estos compuestos sea realmente difícil. Los procedimientos de extracción líquido-líquido (ELL) producen recobrados muy bajos para los metabolitos más polares pero las extracciones en fase sólida (EFS), mejoran considerablemente los recobrados y permiten la coextracción de dichos metabolitos.¹²⁻¹⁵ La cromatografía gas-líquido acoplada con 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), los cuales han permitido obtener resultados con la adecuada sensibilidad y selectividad para realizar un diagnóstico inequívoco.¹⁶⁻¹⁸

El presente trabajo tuvo como objetivo fundamental la validación de un método analítico para la determinación simultánea de COC, COCET, y los trimetilsilil derivados de la EG, EME y BE, con LIDO como estándar interno, empleando un paso de EFS (con columnas EvidexTM), seguida de la ejecución de un procedimiento por CG/DNF.

MATERIALES Y METODOS

Equipos

Cromatógrafo de gases con DNF, modelo HRGC-4000A (Konik Tech, España), acoplado a una computadora, equipada con un programa para el registro y almacenamiento de los cromatogramas (Konikrom, Konik Tech, España). *Condiciones cromatográficas:* columna de cuarzo de fenilmetilsilicona de tipo DB-1 con (15 m x 0,53 mm x 3 µm). *Programación:* De 60 °C (por 2 min) hasta 140 °C (20 °C/min), entonces sube a 170 °C/min (4 °C/min), luego a 208 °C (40 °C/min), entonces a 214 °C (6 °C/min), mantenida por 6 min, terminando en 244 °C (30 °C/min), con 10 min en esta temperatura.

Equipo completo de extracción en fase sólida (EFS) de 12 posiciones (Vacuum Manifold, J & W Scientific, EUA).

Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico. *Patrones de referencia:* COC, BE, EME, EG, COCET, Anfetamina, Metanfetamina, Metadona, (Programa de las Na-

ciones Unidas para la Fiscalización Internacional de las Drogas). La LIDO, cafeína y amitriptilina (Sigma, USA). *Soluciones de trabajo:* Se prepararon disolviendo la cantidad necesaria de los analitos sólidos en metanol para producir concentraciones de 160, 140, 100, 170 y 100 µg/mL de EME, EG, COC, BE y COCET respectivamente. El patrón interno y el resto de las drogas se prepararon a una concentración de 1 mg/mL. *Agente derivatizante:* Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) (REGIS Technologies, Inc., USA). *Columnas de EFS:* Accu Bond[®] SPE Evidex, de 400 mg y 6 mL de capacidad (J & W Scientific, USA).

Muestras

Orinas procedentes de donantes vivos, los cuales no refirieron el consumo de ningún fármaco, las que se fortificaron con los patrones. *Preparación de las muestras para EFS:* A 5 mL de orina conteniendo 10 µL del patrón interno se le adicionaron 3 mL de solución de K₂HPO₄ 0,1 M de pH-6. Las columnas se acondicionaron mediante la adición de 6 mL de metanol y 6 mL de solución de K₂HPO₄ 0,1 M de pH-6. Se aplicó la muestra a la columna y seguidamente se lavó con 3 mL de agua destilada, 3 mL de HCl 0,1 N y con 3 mL de metanol. Finalmente se realizó la elución con 3 mL de una mezcla de cloroformo: isopropanol: amoníaco (78:20:2).¹⁹ El eluato se evaporó a sequedad en corriente de nitrógeno a 40 °C. *Derivatización:* Se añadieron 20 µL de acetato de etilo y 20 µL de BSTFA, se homogeneizó y se colocó en una estufa a 80 °C durante 30 min. Después de alcanzar la temperatura ambiente se inyectó 1 µL en el cromatógrafo.

Validación del método analítico

Linealidad

Se tomaron 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µL de los patrones de cada analito, con 10 µL del patrón interno en viales de 1 mL de capacidad, se evaporó a sequedad en corriente de N₂ y se derivatizó. Se calcularon las ecuaciones de regresión lineal por los mínimos cuadrados de la relación de las áreas de los analitos con la del patrón interno en función de la relación de concentraciones de los analitos con la del patrón interno. Además se verificó la linealidad mediante el cálculo para todos los analitos y en cada nivel de concentración de los Factores Mási-

cos de Respuesta (FMR), de la desviación estándar (DE) y del coeficiente de variación (CV). Como criterios de aceptación se consideraron: el CV (FMR) < 5 %, el CV de la pendiente (CVb) < 2 % y que el cero quedara incluido dentro del intervalo de confianza del intercepto (IC).

Precisión

La repetibilidad de los tiempos de retención relativos a la LIDO (r_{i,p}) para cada analito se realizó inyectando 6 réplicas de una mezcla de patrones, determinando la DE y el CV. Se calculó el IC mediante la expresión: $r_{i,p} = t (DE/\sqrt{n})$. Además se estudió la repetibilidad de los FMR mediante la inyección en un mismo día de una mezcla de patrones (n = 10). Se calcularon los IC, la DE y los CV. Se estudió la influencia de la concentración en los FMR realizando un test de Cochran para p = 0,05.²⁰

Exactitud

Utilizando las columnas de EFS (EvidexTM) se calculó el por ciento de recuperación para cada uno de los analitos. Se procesaron paralelamente muestras de orina sin fortificar. Además, en ambos casos se investigó mediante un test de Cochran la influencia de las concentraciones en la recuperación.

Límite de detección (LD) y cuantificación (LQ)

Los LD se calcularon mediante el valor de la ordenada en el origen en cada calibración, expresadas en unidades de concentración de analito en orina. O sea se utilizó la relación $3 \times |a| / |b|$. El LQ fue definido como la menor concentración que pudo ser cuantificada con un CV aceptable y fue establecida como el punto más bajo en los gráficos de calibración expresadas en unidades de concentración de los analitos en la orina.²¹

Especificidad

Se aplicó un programa de temperatura que tuvo en cuenta el efecto de Grob para lograr separar los picos de interés entre sí y con el frente del disolvente. Además se calcularon los r_{i,p} para la COC y sus metabolitos. Para probar las posibles interferencias del método se procesaron patrones de cafeína, amitriptilina, metadona, anfetamina, metanfetamina, calculándose los r_{i,p} para cada uno de ellos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Linealidad

Los gráficos de calibración fueron lineales en el rango de concentraciones entre 20 a 200 ng/ μ L para la EME, 17,5 a 175 ng/ μ L para la EG, 12,5 a 125 ng/ μ L para la COC y el COCET y 21,5 a 212,5 ng/ μ L para la BE. De acuerdo a la recuperación obtenida con las columnas EvidexTM estos rangos lineales se corresponden con concentraciones de dichos analitos en la orina en el rango de 406 a 4 060 ng/mL para la EME, 224 a 2 240 ng/mL para la EG, 108 a 1 088 ng/mL para la COC, 116 a 1 167 ng/mL para el COCET y 184 a 1 840 ng/mL para la BE. Estos rangos lineales coinciden con los reportados por varios autores que trabajaron con columnas de EFS, especialmente de tipo mixto (Bond Elut Certify).^{15, 22, 23} Para cada uno de los analitos se obtuvo la ecuación de regresión, con todos los parámetros estadísticos necesarios en este tipo de evaluaciones (Tablas 1 y 2). Todos los coeficientes de correlación fueron superiores a 0,999 y todos los interceptos incluyeron al cero en su intervalo de confianza. Además los CV de los FMR estuvieron por debajo del 2 %, (Tabla 3) para la mayoría de los analitos, de manera que podemos afirmar que el método empleado muestra una linealidad excelente en un rango de concentraciones bastante amplio.

Exactitud

Recobrados: En la literatura consultada no se encontraron reportes de extracción simultánea de COC y sus metabolitos con columnas EvidexTM, sin embargo de acuerdo con un anuncio comercial de la J & W Scientific se plantea que la BE se extrae con más del 90 % de muestras de orina, lo cual coincide con lo encontrado en este trabajo.¹⁹ Los resultados obtenidos en la extracción de COC y sus metabolitos de muestras fortificadas a dos niveles de concentración muestran que los recobrados son reproducibles e independiente de la concentración (Tablas 4 y 5) y coinciden de manera general con lo informado con la utilización de otras columnas de EFS de tipo mixto (Bond Elut Certify).^{15, 24-26} Por otra parte se pudo constatar que los extractos obtenidos con estas columnas son muy limpios, (Figuras 1 y 2) y que la matriz biológica no aporta ningún pico que pudiera interferir en los análisis.

Tabla 1. Resultados del estudio de linealidad de la COC y 4 de sus principales metabolitos. Intervalo de confianza del término independiente

Analito	a $\pm$ DE	CV	IC
EME	-0,010 $\pm$ 0,008	0,79	-0,011 $\pm$ 0,029
EG	-0,025 $\pm$ 0,003	1,04	-0,025 $\pm$ 0,073
COC	-0,017 $\pm$ 0,009	0,54	-0,017 $\pm$ 0,026
BE	-0,001 $\pm$ 0,005	5,55	-0,001 $\pm$ 0,014
COCET	-0,001 $\pm$ 0,001	1,18	-0,001 $\pm$ 0,004

Tabla 2. Resultados del estudio de linealidad de la COC y 4 de sus principales metabolitos. Significación estadística de la varianza de la pendiente

Analito	r ²	a $\pm$ DE	CV	IC
EME	0,9996	0,901 $\pm$ 0,008	0,96	0,901 $\pm$ 0,025
EG	0,9987	1,726 $\pm$ 0,034	1,80	1,726 $\pm$ 0,086
COC	0,9996	1,408 $\pm$ 0,012	0,88	1,408 $\pm$ 0,039
BE	0,9993	0,395 $\pm$ 0,05	1,31	0,395 $\pm$ 0,014
COCET	0,9998	0,304 $\pm$ 0,002	0,75	0,304 $\pm$ 0,006

Tabla 3. Precisión de los FMR para la COC y 4 de sus principales metabolitos (n = 10)

Analito	IC	DE	CV
EME	0,883 $\pm$ 0,009	0,014	1,61
EG	1,677 $\pm$ 0,023	0,034	2,04
COC	1,367 $\pm$ 0,016	0,024	1,77
BE	0,300 $\pm$ 0,002	0,003	1,22
COCET	0,398 $\pm$ 0,005	0,008	1,99

Tabla 4. Recuperación con columnas EvidexTM (n = 10)

Analito	Concentración de orina (μ g/mL)		Recuperación (%)	CV
	Teórica	Calculada		
EME	0,5	0,20	40	20,90
	1,0	0,38	39	7,95
EG	0,5	0,32	64	7,89
	1,0	0,60	61	6,03
COC	0,5	0,44	89	5,36
	1,0	0,94	95	2,00
COCET	0,5	0,42	85	9,99
	1,0	0,85	85	6,65
BE	0,5	0,46	93	7,63
	1,0	0,91	91	5,36

Tabla 5. Efecto de la concentración en la recuperación. (G tabla = 0,8010 para p = 0,05 y n = 10, k = 2)

Analito	Concentración de orina (ng/mL)		DE	G _{exp.}
	Teórica	Calculada		
EME	0,5	0,20	0,042	0,539
	1,0	0,37	0,031	
EG	0,5	0,32	0,025	0,676
	1,0	0,61	0,036	
COC	0,5	0,44	0,024	0,612
	1,0	0,95	0,018	
COCET	0,5	0,43	0,042	0,645
	1,0	0,86	0,057	
BE	0,5	0,48	0,036	0,648
	1,0	0,96	0,038	

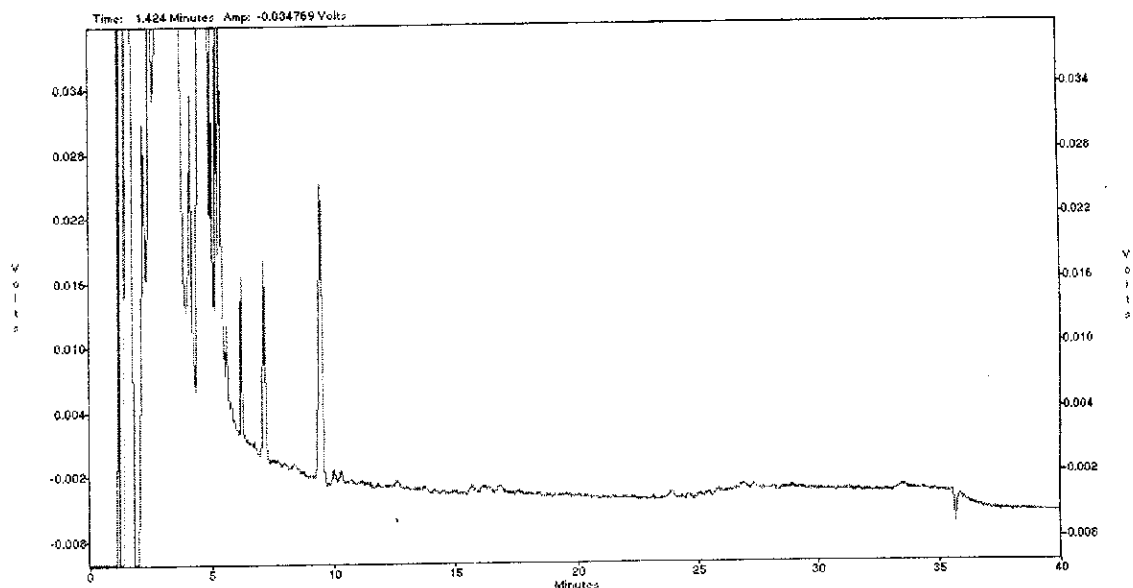


Fig. 1. Cromatograma de una muestra de orina extraída con Evidex™ antes de ser fortificada

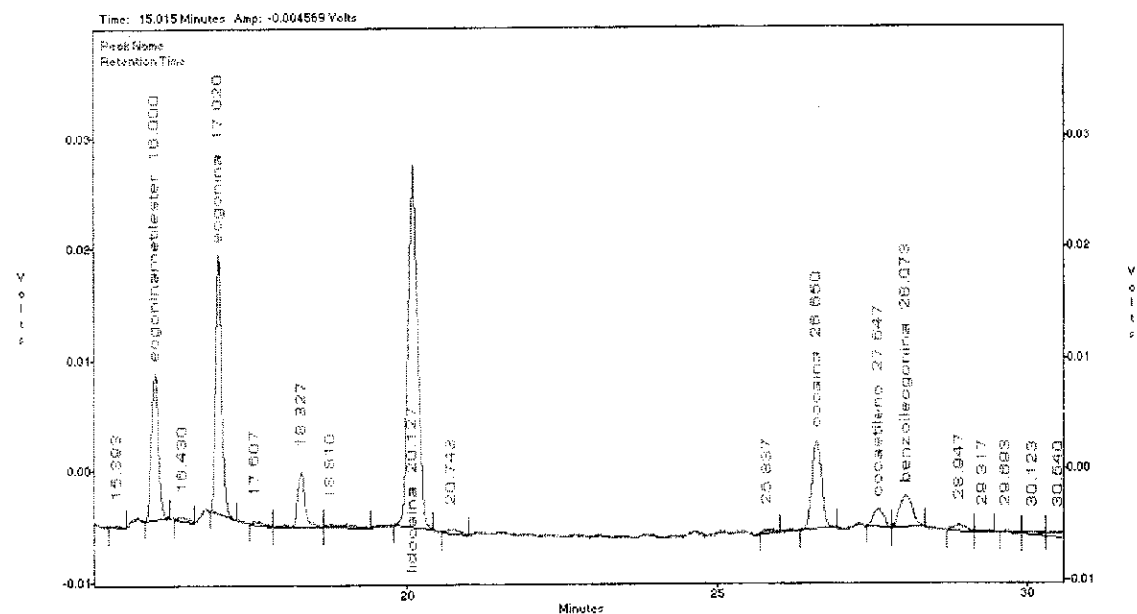


Fig. 2. Perfil cromatográfico de una muestra de orina extraída con Evidex™ la cual fue fortificada con patrones (1-EME, 2-EG, 3-LIDO, 4-COC, 5-COCET, 6-BE)

Precisión

La precisión intradía de los $r_{i,p}$ (Tabla 6) resultó excelente, con CV en el rango de 0,02 a 0,05, por lo que indudablemente cumplen los requisitos para ser utilizados en el diagnóstico. En la literatura consultada se informa la utilización de LIDO como estándar interno para la determinación de COC y sus metabolitos, pero estos análisis se han llevado a cabo por cromatografía líquida de alta presión.²⁷ Los FMR para los 5 analitos estudiados (Tabla 3) mostraron CV aceptables, e independientes de la concentración dentro del rango lineal.

Se aplicó un test de Cochran y en todos los casos la G tabulada fue mayor que la experimental lo que indica que puede ser utilizado para la evaluación cuantitativa de la COC y sus metabolitos en el rango de concentraciones estudiado y con el IC establecido.

LD y LQ

Los LD, de acuerdo a como se definieron en la sección experimental, oscilaron entre 9 y 79 ng/mL (Tabla 7) y de manera general coinciden con los encontrados por otros autores que emplearon DNF para las determina-

ciones.^{10, 14, 16, 17} Los LQ establecidos permiten la cuantificación de estos analitos con un CV aceptable dentro del rango lineal del método.

Tabla 6. Repetibilidad de los $r_{i,p}$ (n = 6)

Analito	IC	CV
EME	0,7943 ± 0,0005	0,02
EG	0,8450 ± 0,0009	0,04
COC	1,3236 ± 0,0014	0,04
COCET	1,3735 ± 0,0012	0,03
BE	1,3948 ± 0,0019	0,05

Tabla 7. Estudios de sensibilidad

Analito	LD (ng/mL)	LQ
EME	87,5	400,0
EG	79,5	224,4
COC	41,4	108,9
COCET	9,9	117,6
BE	66,9	184,8

Especificidad

Para obtener una resolución adecuada entre los picos de interés cromatográficos y a su vez con el del frente del disolvente, se aplicó un programa de temperatura que comenzó en 60 °C para tener en cuenta el efecto de Grob, ya que como se usó acetato de etilo como disolvente, al entrar la muestra a la columna a una temperatura por debajo de su punto de ebullición, casi todo el extracto se concentra en los primeros platos teóricos de la columna, contribuyendo de esta forma a una separación eficiente de los picos en el cromatograma (Fig. 3). Este perfil cromatográfico coincide con el informado por la RESTEK INC., el cual trata de la separación cromatográfica de los TMSD de los metabolitos de la COC, incluyendo además el COCET, con la diferencia de que para ello utilizaron una columna de tipo capilar Rtx®-5 y otro programa de temperatura.²⁸ La programación multi-rampa empleada por

nosotros coincide con lo reportado por algunos autores, aunque ninguno de ellos utilizó una columna semicapilar de tipo DB-1, sino que realizaron los trabajos con columnas capilares de tipo HP-1 y HP-5.²⁹⁻³¹ Algunas de las drogas consideradas como potencialmente interferentes en los análisis fueron estudiadas (Tabla 8), con resultados satisfactorios.

Tabla 8. r_{ip} de algunos patrones de drogas (100 ng/ μ L) (n = 6)

Droga	IC
Cafeína	0,773 $\pm$ 0,007
Anfetamina	0,326 $\pm$ 0,004
Metanfetamina	0,287 $\pm$ 0,004
Amitriptilina	1,269 $\pm$ 0,001
Metadona	1,057 $\pm$ 0,009

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método por CG/ DNF para la determinación simultánea de COC y sus principales metabolitos en muestras de orina, usando una EFS con columnas Evidex™ y utilizando LIDO como patrón interno. Este trabajo constituye el primer reporte de extracción simultánea de cocaína y sus principales metabolitos con estas columnas, con las cuales se obtiene un perfil cromatográfico muy útil para la confirmación del diagnóstico del consumo de COC.

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. Karlis 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. Wallace J.E., Hamilton E.H., King D.E., Bason D.J., Schwertner H.A. and Harris S.C. Gas-Liquid chromatographic determination of cocaine and benzoylecgonine in urine. *Anal. Chem.*, 48, 34, 1976.
10. Froidl R., Gambaro V., Mariani R., Pisoni F. and Procaccianti P. Rapid quantitation of cocaine and benzoilecgonine in urine by "on column" capillary gas chromatography after Extrelut extraction. *Il Farmaco*, 12, 417, 1984.
11. Griesemer E.C., Liu Y., Budd R.D., Raftogiannis L. and Noguchi T.T. Determination of cocaine and its metabolites, benzoylecgonine in post-mortem fluids and tissues by computerized gas chromatography-mass spectrometry. *J. Forensic Sci.*, 28, 894, 1993.

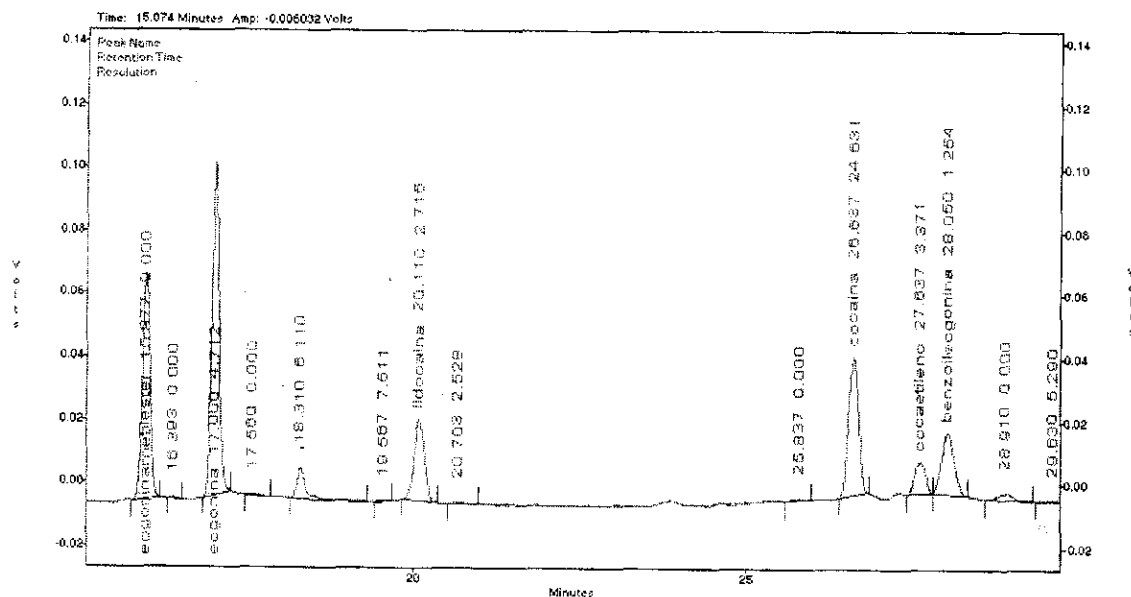
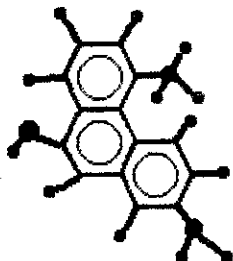


Fig. 3. Perfil cromatográfico representativo que muestra la eficiencia separativa de una mezcla de patrones (1-EME, 2-EG, 3-LIDO, 4-COC, 5-COCET, 6-BE)

12. Matsubara K., Maseda C., and Fukui Y. Quantitation of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester by g.d. - chemical ionization (m.s) - selected-ion monitoring after Extrelut extraction. *Forensic Sci. Int.*, 26, 181, 1984.
13. Isenschmid D., Levine B.S. and Caplan Y.H. Method for the simultaneous determination of cocaine, benzoilecgonine 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.
14. 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.
15. De la Torre R., Ortuño J., Gonzalez 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.
16. Soriano C., Guerra J. M., Carreras D., Rodríguez C., Rodríguez A. F., and Cortis R. Automated analysis of drugs in urine. *J. Chromat. B*, 687, 183, 1996.
17. 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.
18. 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.
19. Evidex- Rapid Solid Phase Extraction of drug of abuse from urine. J & W homepage (<http://www.jandw.com>).
20. Grob K. and Neukom P.H. Dependence of splitting ratio on column temperature in split injection capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 236, 297, 1982.
21. Cels C.M., Forá S.G., Form M.P., Roca J.M.S. y Pla L.V. Validación de métodos analíticos. Monografía. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. AEFI. Editado por Hewlett Packard. P-87 1989.
22. Clauwaert K.M., Van Bocxlaer J.F., Lambert W.E., Van Den Beekhout E.G., Lemiere 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, 2 336, 1998.
23. Announcement. Analysis of cocaine and cocaine metabolites. *The Restek Advantage*, 6, 14, 1995.
25. 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.
26. Kintz P., Cirimele V., Sengler C., and Mangin P. Testing human hair and urine for anhidroecgoninemethylester, a pyrolysis product of cocaine. *J. Anal. Toxicol.*, 19, 479, 1995.
27. 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.
28. 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.
29. Singer K., Wenz B., Seefeld V and Speer U. Determination of drugs of abuse using solid phase microextraction. *Labor Med.* 18, 112, 1995.
30. 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.*, 66, 149, 1994.
31. 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.

ANÁLISIS ELEMENTAL ORGÁNICO SERVICIO ANALÍTICO

La Dirección de Química del Centro Nacional de Investigaciones Científicas le brinda su servicio de Análisis Elemental Orgánico.



Composición cuantitativa de C, H, N, S y halógenos en moléculas orgánicas.
Calidad garantizada en los análisis.

Precios moderados:	USD
C/H (duplicado)	30.00
C/N (duplicado)	30.00
S (duplicado)	17.00
Cl, Br (duplicado)	17.00

Dirección de Química, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave. 25 y 158, Playa, Apartado postal 6990, Ciudad de La Habana, Cuba.

Teléfonos: 21 1235; 21 8066 ext. 294, E-mail: xray@infomed.sld.cu; marbot@quimica.cneuro.cu