



Servicio Nacional
de Medicina Legal
y Ciencias Forenses

**INSTRUCTIVO PARA LA
DETERMINACIÓN CUALITATIVA
DE CANNABINOLES Y SUS
METABOLITOS POR
CROMATOGRAFÍA DE GASES –
MASAS EN MUESTRAS
BIOLÓGICAS COMO MÉTODO
CONFIRMATORIO.**

Octubre, 2017



CONTROLES

ELABORACIÓN DEL INSTRUCTIVO.

Fase	Nombre / Cargo	Firma	Fecha
Elaborado o Modificado por:	Microbióloga Luz Cadavid		22/03/2017
	BQC. Catalina Carrillo		
	BQ. Silvia Yumiseba		
	PERITOS DE LA GESTIÓN TOXICOLOGÍA FORENSE		

APROBACIÓN METODOLÓGICA DE LA GESTIÓN ESTRATÉGICA

Fase	Nombre / Cargo	Firma	Fecha
Asistencia técnica:	Ing. Alejandra Pérez M. ANALISTA DE LA UNIDAD DE PROCESOS, SERVICIOS Y CALIDAD		29/09/2017
Revisado por:	Lcdo. Christian Escobar RESPONSABLE DE LA UNIDAD DE PROCESOS, SERVICIOS Y CALIDAD		29/09/2017
Aprobado por:	Mgs. Sheldon López COORDINADOR GENERAL DE PLANIFICACIÓN Y GESTIÓN ESTRATÉGICA.		29/09/2017

APROBACIÓN TÉCNICA.

Nombre / Cargo	Firma	Fecha
Lcda. María Elisa Lara COORDINADORA DE MEDICINA LEGAL		30/10/2017

CONTROL E HISTORIAL DE CAMBIOS

Versión	Descripción del cambio	Fecha de creación/actualización
1.0	Primer versión del Instructivo para la determinación cuantitativa de Salicilatos/AAS mediante por Espectrofotometría UV	22/03/2017

ÍNDICE DE CONTENIDO

INFORMACIÓN BÁSICA.....	4
GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS.....	5
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	5
ABREVIATURAS.....	6
PROCEDIMIENTO.....	6
NORMAS DE SEGURIDAD.....	9
BIBLIOGRAFÍA.....	9
ANEXOS.....	10

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.

ILUSTRACIÓN 1.....	10
ILUSTRACIÓN 2.....	11
ILUSTRACIÓN 3.....	11
ILUSTRACIÓN 4.....	12
ILUSTRACIÓN 5.....	12
ILUSTRACIÓN 6.....	13
ILUSTRACIÓN 7.....	13
ILUSTRACIÓN 8.....	14
ILUSTRACIÓN 9.....	14
ILUSTRACIÓN 10.....	15
ILUSTRACIÓN 11.....	15
ILUSTRACIÓN 12.....	16
ILUSTRACIÓN 13.....	16



Código: SNMLCF-ML-TOXICOLOGÍA-10	INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOLES Y SUS METABOLITOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES – MASAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS COMO MÉTODO CONFIRMATORIO.	Versión: 1.0
		Página 4 de 11

1. INFORMACIÓN BÁSICA.

Macroproceso:	PERICIAS TÉCNICO CIENTÍFICAS
Proceso:	PERICIAS TÉCNICO CIENTÍFICAS MEDICINA LEGAL
Subproceso:	GESTIÓN PERICIAL TOXICOLOGÍA FORENSE
Nombre del instructivo:	INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOLES Y SUS METABOLITOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES – MASAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS COMO MÉTODO CONFIRMATORIO.
Código del instructivo:	SNMLCF-ML-TOXICOLOGÍA-10
Descripción:	<p>PROPÓSITO:</p> <p>Estandarizar la determinación cualitativa de cannabinoles y sus metabolitos en muestras biológicas, mediante cromatografía de gases-masas, como método confirmatorio.</p> <p>ALCANCE:</p> <p>Se aplica en muestras biológicas (sangre, suero sanguíneo y orina) y muestras no biológicas (bebidas, residuos sólidos, etc.), relacionados con el hecho de interés criminalístico.</p>
Responsable:	Jefe de la gestión pericial y peritos acreditados de la Gestión de Toxicología Forense del Servicio Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses.
Marco Legal:	<p>1. CONSTITUCIÓN DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR.</p> <ul style="list-style-type: none">➤ Art. 195. La Fiscalía General del Estado.➤ Art. 233. Deberes de servidores públicos <p>2. CÓDIGO ORGÁNICO INTEGRAL PENAL.</p> <ul style="list-style-type: none">➤ Art. 292. Alteración de evidencias y elementos de prueba➤ Art.448. Organización y Dirección➤ Art. 449. Atribuciones. Numerales 8 y 9.➤ Art. 456. Cadena de Custodia.➤ Art. 458. Preservación de la escena del hecho o indicios➤ Art. 459.



Actuaciones y Técnicas Especiales de Investigación. Numeral 1.

- **Art. 463.**
Obtención de muestras.
- **Art. 498.**
Medios de prueba.
- **Art. 511.**
Reglas Generales.

3. DECRETO EJECUTIVO N°759. Reglamento de Coordinación Interinstitucional para la Organización, Dirección, Administración y Operación del Sistema Especializado Integral de Investigación, Medicina Legal y Ciencias Forenses.

- **Art.13**
Director General del Servicio Nacional de medicina legal y Ciencias Forenses, **numeral: 5**
- **Art. 14.**
Atribuciones del Servicio Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, **numeral: 1, 2, 4,5.**

4. RESOLUCIÓN N° 040-2014. Reglamento del Sistema Pericial Integral de la Función Judicial.

- **Capítulos:** 2, 3,4 y 5.

5. RESOLUCIÓN N°073-FGE-2014. Suplemento del Registro Oficial 318,25-VIII-2014.

- **Acápites:** Manual de Química y Toxicología Forense.

Lineamientos:

- El instructivo es "RESTRINGIDO" y de uso exclusivo del Laboratorio de Criminalística y Ciencias Forenses de Pichincha-Quito en su Gestión Toxicología Forense.
- El instructivo es de "USO OBLIGATORIO" para el personal de la Gestión de Toxicología.
- Es responsabilidad del Jefe de la Gestión de Toxicología Forense garantizar la aplicación y el cumplimiento del presente instructivo.
- Se prohíbe reproducción total o parcial del instructivo sin autorización expresa.

2. GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS.

2.1. GLOSARIO DE TÉRMINOS.

- **Derivatizar:** "transformación de un compuesto químico en uno de estructura química similar, pero con propiedades químicas diferentes".

Código: SNMLCF-ML-TOXICOLOGIA-10	INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOLES Y SUS METABOLITOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES – MASAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS COMO MÉTODO CONFIRMATORIO.	Versión: 1.0
		Página 5 de 11

(TESAURO, BIBLIOTECA AGRICOLA NACIONAL DE LOS ESTADOS UNIDOS, 2013)

- **Marihuana/Cannabinol:** la Marihuana cuyo nombre científico corresponde a *Cannabis Sativa* es una planta que sintetiza más de 60 Cannabinoides siendo su principal componente activo el isómero 1-delta 9-THC. (Benavidez Luis, 2011)
- **Muestra biológica:** "especimen sobre el cual se realizará el análisis toxicológico de rutina, cuya adquisición, almacenamiento y transporte al laboratorio se han documentado adecuadamente para garantizar la debida Cadena de Custodia". (Jickells S. y., 2008)

2.2. ABREVIATURAS.

- BSFTA : N, O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide
- CG-MS : Cromatografía de gases masas
- COC : Cocaína
- SNMLCF : Servicio Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses
- THC : Tetrahydro Cannabinol.

3. DESCRIPCIÓN DEL INSTRUCTIVO.

3.1. FUNDAMENTO TEÓRICO.

La Marihuana cuyo nombre científico corresponde a *Cannabis Sativa* es una planta que sintetiza más de 60 Cannabinoides siendo su principal componente activo el isómero 1-delta 9-THC. (Benavidez Luis, 2011).

El THC es rápidamente metabolizado en dos compuestos: el 11-hidroxi-THC (11-OH-THC) y el 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH). Este último es el biomarcador más prevalente en orina y el que se suele utilizar para detectar el consumo de Marihuana o cannabis. Debido a que los cannabinoides son altamente retenidos por los tejidos, se pueden detectar en orina durante días o semanas después de su uso, según su cantidad y frecuencia de consumo. Esto es debido a su amplia distribución por el organismo y retención en los tejidos, que liberan lentamente el THC de nuevo a la sangre, con su consecuente metabolismo.

En consumidores ocasionales, el pico de concentración de THCCOOH en orina, ocurre pasadas 10-18 horas después del consumo. Pasado este tiempo, esa concentración decrece rápidamente y se puede mantener una concentración baja, pero detectable por un test de drogas, durante 80-100 horas (de 3 a 5 días).

En cambio, en consumidores diarios, el tiempo de detección de THCCOOH en orina puede ser superior a los 30 días, llegando incluso a detectarse a los 67 ó 93 días (S.L, 2016).

Es por esta razón que se han desarrollado técnicas como la Cromatografía de gases-masas para su identificación.

La cromatografía de gases (GC) es útil para los compuestos que son volátiles en su estado natural o que puedan convertirse con facilidad en una forma



Código: SNMLCF-ML-TOXICOLOGÍA-10	INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOLES Y SUS METABOLITOS POR CROMATOGRFÍA DE GASES – MASAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS COMO MÉTODO CONFIRMATORIO.	Versión: 1.0
		Página 7 de 11

volátil. La GC ha sido un método ampliamente utilizado desde hace décadas gracias a su elevada resolución, bajos límites de detección precisión y corto tiempo de análisis. Su aplicación incluye varias moléculas orgánicas, incluyendo muchas drogas. (Henry, 2005)

La Cromatografía de gases masas-espectroscopia de masas (GC-MS) ha demostrado ser ese método de referencia debido a su sensibilidad y a sus técnicas: la cromatografía de gases y la espectroscopia de masas. En la primera, los compuestos se calientan directamente para que pasen al estado gaseoso o se derivan para hacerlos más lábiles y facilitar su paso al estado gaseoso por calentamiento. (Henry, 2005)

En la Segunda "el detector de masas, permite obtener un espectro de masas que muestra la relación masa/carga de la molécula, sus fragmentos y su abundancia relativa. La ionización de la molécula puede llevarse a cabo mediante impacto electrónico, ionización química negativa o positiva e ionización por campo eléctrico". (Benavidez Luis, 2011)

3.2. EQUIPOS, MATERIALES, REACTIVOS Y CONDICIONES AMBIENTALES.

3.2.1. EQUIPOS:

- Cromatógrafo de Gases – Masas;
- Baño María; y,
- Cabina de Extracción.

3.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO:

- Pipetas automáticas;
- Vasos de precipitación;
- Puntas de 100ul; y,
- Viales.

3.2.3. REACTIVOS Y ESTÁNDARES DE REFERENCIA:

3.2.3.1. REACTIVOS:

- Cloroformo grado P.A;
- Metanol grado P.A; y,
- Derivatizante BSFTA.

3.2.3.2. ESTÁNDARES:

- Estándar disponible en el laboratorio;

3.2.4. MATERIALES VARIOS:

- Guantes desechables; y,
- Papel absorbente.

Código: SNMLCF-ML-TOXICOLOGIA-10	INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOLES Y SUS METABOLITOS POR CROMATOGRFÍA DE GASES – MASAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS COMO MÉTODO CONFIRMATORIO.	Versión: 1.0 Página 8 de 11
----------------------------------	---	--------------------------------

3.2.5. CONDICIONES AMBIENTALES:

- Ver: Instructivo para el control de temperatura.

3.3. MANEJO DE INDICIOS Y MUESTRAS:

3.3.1. TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO:

- Ver: Instructivo para Transporte, Almacenamiento y Conservación de Indicios.

3.3.2. PREPARACIÓN. Y MANIPULACIÓN:

- Ver: Protocolo de Toma, Conservación y Recepción de Muestras Biológicas para Análisis Toxicológicos.

3.4. PROCEDIMIENTO.

Realizar el procedimiento de extracción según lo describe el instructivo denominado "**DETERMINACIÓN DE CANNABINOLES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS MEDIANTE INMUNOENSAYO Y CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA**", apartado 3.4.2.1., posteriormente:

3.4.1. FASE 1: DERIVATIZACIÓN.

- Adicionar al residuo que se obtuvo de la extracción 80ul de derivatizante BSFTA.
- Colocar esta mezcla en un vial y llevar a baño maría por 20 minutos a 80°C.

3.4.2. FASE 2: ANÁLISIS INSTRUMENTAL.

- Realizar un lavado de la columna del CG-MS con metanol grado P.A esto previo al análisis de la muestra.
- Colocar cloroformo en los viales para lavado de la aguja de inyección.
- Llevar los viales al equipo de CG-MS e inyectar la muestra con el método específico para el análisis de Cannabinos y sus metabolitos (COC-THC).

Nota Técnica: las condiciones generales del equipo para el desarrollo del ensayo, así como las ilustraciones orientativas inherentes a los espectros por sustancias podrán ser observadas en el campo de anexos.

3.5. MÉTODO DE CÁLCULO:

N/A

3.6. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

Los resultados serán estipulados de conformidad a lo siguiente:

- Seleccionar la muestra corrida en el equipo.
- Seleccionar el ícono "view" y posteriormente la opción "Chromatogram".
- Observar el cromatograma de la muestra analizada
- Cotejar el cromatograma de la muestra con el cromatograma del estándar.
- Identificar el "pico" de la sustancia sujeto de análisis.
- Seleccionar el "pico" a analizar y observe el espectro
- Verificar las masas correspondientes a la sustancia sujeto de análisis.
- Seleccionar el ícono de librería y haga una revisión de las posibles sustancias correspondientes al pico analizado.
- Verificar que el porcentaje de identificación de la sustancia sea mayor a 800 puntos porcentuales.

4. NORMAS DE SEGURIDAD.

Considere lo estipulado en la Resolución N°073-FGE-2014. Suplemento del Registro Oficial 318,25-VIII-2014, acápite: Manual de Bioseguridad.

5. BIBLIOGRAFÍA.

Benavidez Luis. (2011). *ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA POR GC-MS PARA LA DETERMINACIÓN DE COCAÍNA, BENZOILECGONONA, ACIDO 11-NOR-DELTA-9-TETRAHIDROCANNABINOL*. PEREIRA: TRABAJO DE GRADO.

Henry, J. B. (2005). *El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico*. Madrid: Marbán Libros, S. L.

Jickells, S. (2008). *Clarke´s Analytical Forensic Toxicology*. Londres: Pharmaceutical Press.

Jickells, S. y. (2008). *Clarke´s Analytical Forensic Toxicology*. Londres: Pharmaceutical Press.

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN. (s.f.). Obtenido de <http://metodologiaeconomia2011.blogspot.com/2011/05/investigacion-cuantitativa.html>

S.L, M. (2016). <http://www.mideloy.com/duracion-del-thc-en-orina-cannabis-marihuana/>.

TÉLLEZ JAIRO, C. M. (2005). EFECTOS TOXICOLÓGICOS Y NEUROPSIQUIÁTRICOS PRODUCIDOS POR CONSUMO DE COCAÍNA . 14.

TESAURO, BIBLIOTECA AGRICOLA NACIONAL DE LOS ESTADOS UNIDOS . (2013). Recuperado el 5 de abril de 2017, de <https://boletinagrario.com/ap-6,derivatizacion,2088.html>

ANEXOS.

ILUSTRACIÓN 1 CONDICIONES DEL CROMATÓGRAFO DE GASES.



method editor - C:\TurboMass\PT51\KLDAS.PRO\ACQUDB\COC-THC.mth - [Method Summary]

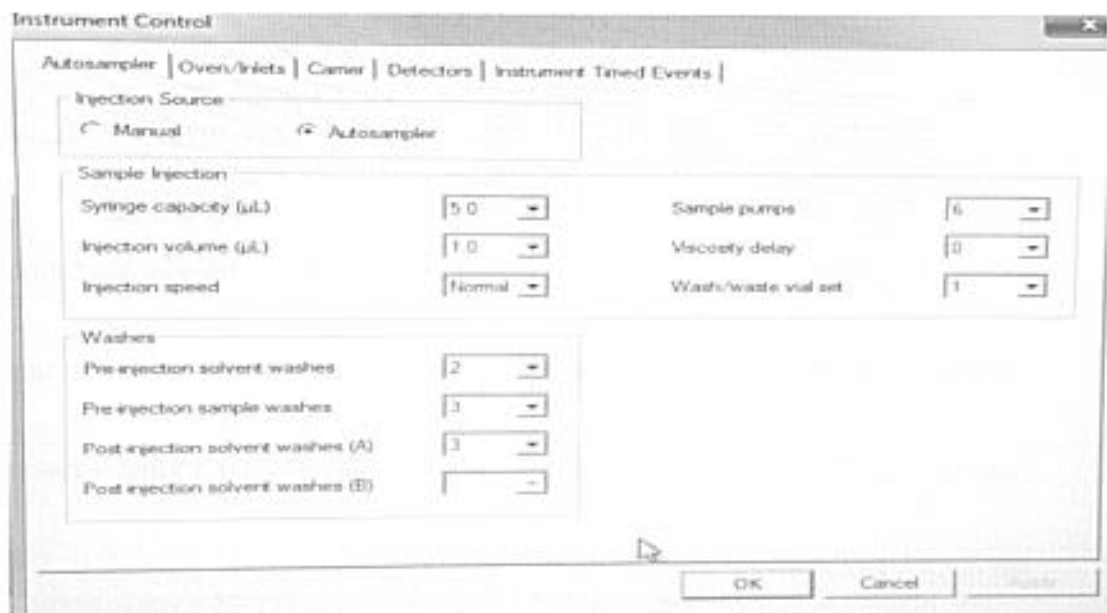
File Instrument Equilibrate View Help

GC Control

Instrument Name	inst1	Injection	AUTO	Inlet A	PSSI
Experiment Time	22.83 min	Injection Volume	1.0 µL	Inlet B	NONE
Delay Time	0.00 min	Sampling Rate	1.56250 pts/s	Detector A	NONE
Run Time	22.83 min	Channel	NONE	Detector B	NONE

Oven Temperature Program

- Initial Temperature: 100 deg for 1.00 min
- Ramp 1: 40.0 deg/min to 200 deg, hold for 1.00 min
- Ramp 2: 5.0 deg/min to 250 deg, hold for 3.00 min
- Ramp 3: 15.0 deg/min to 300 deg, hold for 2.00 min



Instrument Control

Autosampler | Over/Inlets | Camer | Detectors | Instrument Timed Events |

Injection Source

Manual Autosampler

Sample Injection

Syringe capacity (µL)	5.0	Sample pumps	6
Injection volume (µL)	1.0	Viscosity delay	0
Injection speed	Normal	Wash/waste vial set	1

Washes

Pre-injection solvent washes	2
Pre-injection sample washes	3
Post-injection solvent washes (A)	3
Post-injection solvent washes (B)	-

OK Cancel

ILUSTRACIÓN 2 CONDICIONES DEL AUTOSAMPLER DEL CG-MS

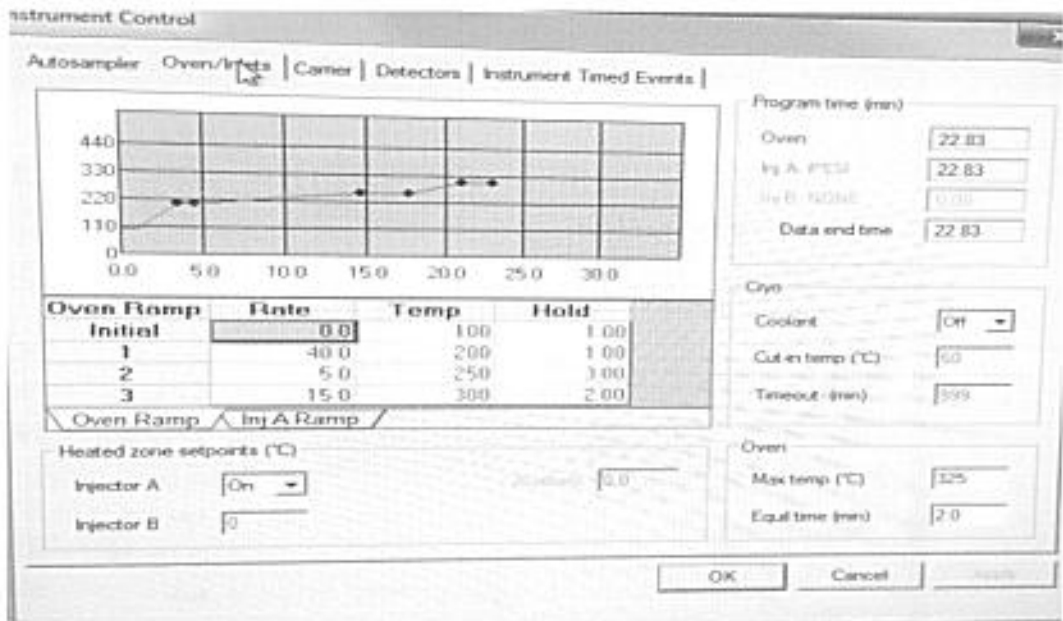


ILUSTRACIÓN 3 CONDICIONES DEL HORNO (RAMPA DE TEMPERATURAS) DEL CG-MS

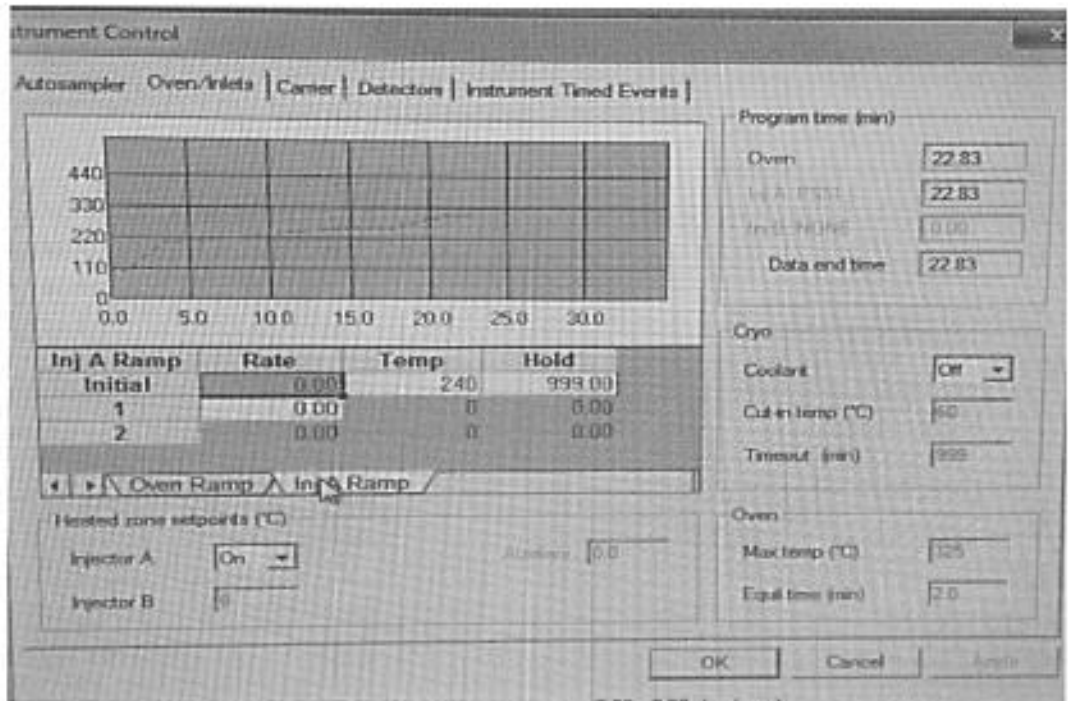


ILUSTRACIÓN 4
CONDICIONES DEL HORNO (RAMPA DE TEMPERATURAS) DEL CG-MS

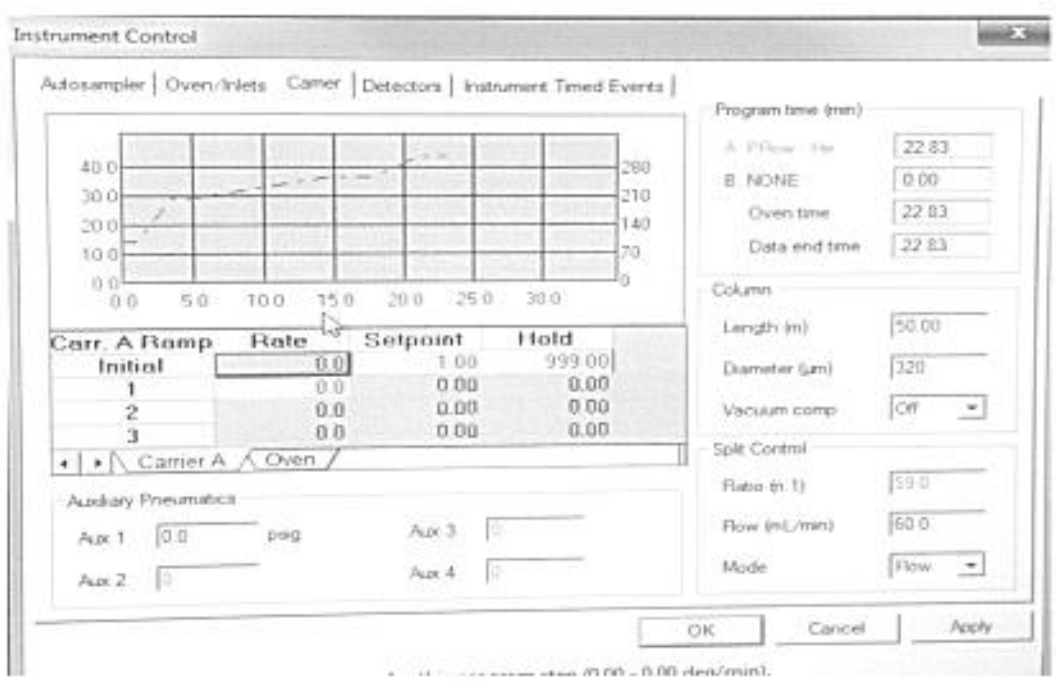


ILUSTRACIÓN 5
CONDICIONES DEL CARRIER (RAMPA DE TEMPERATURAS) DEL CG-MS

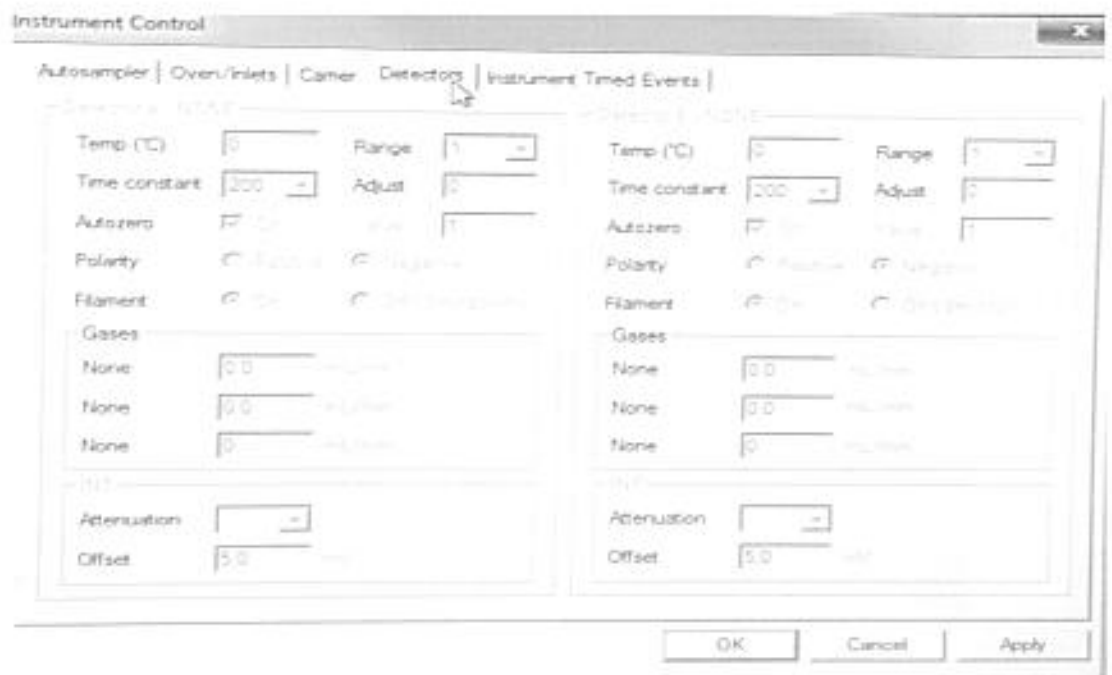


ILUSTRACIÓN 6 CONDICIONES DEL DETECTOR DEL CG-MS

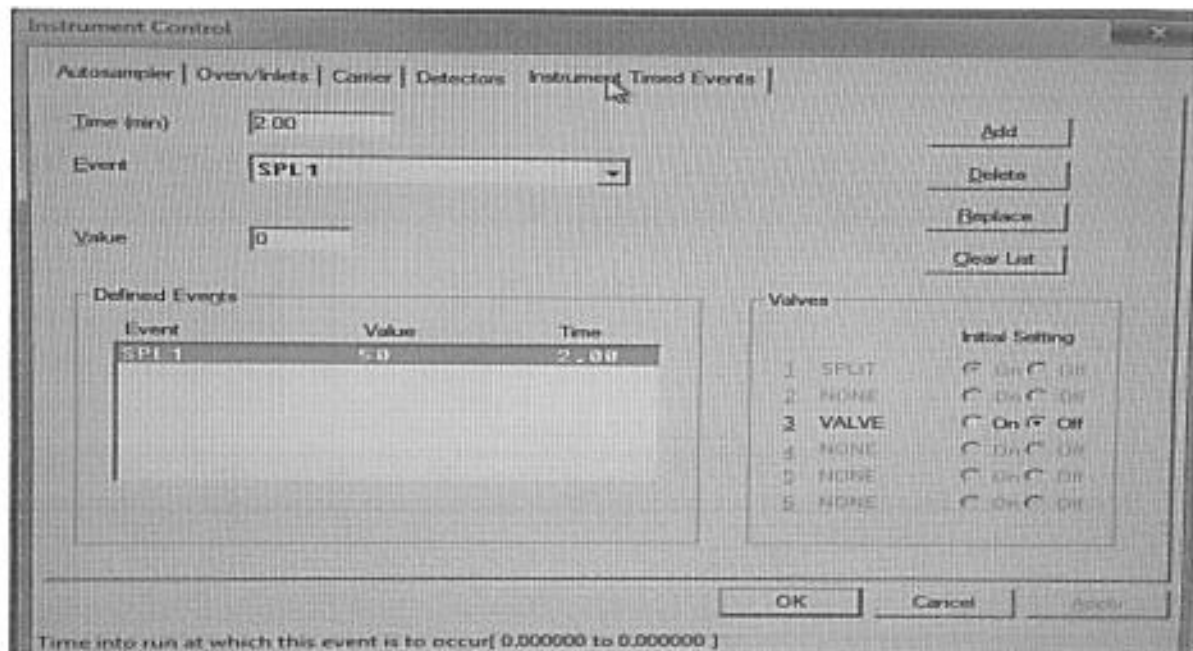


ILUSTRACIÓN 7 CONDICIONES GENERALES DEL MS.



ILUSTRACIÓN 8

ESPECTRO DE THC EN UNA MUESTRA BIOLÓGICA

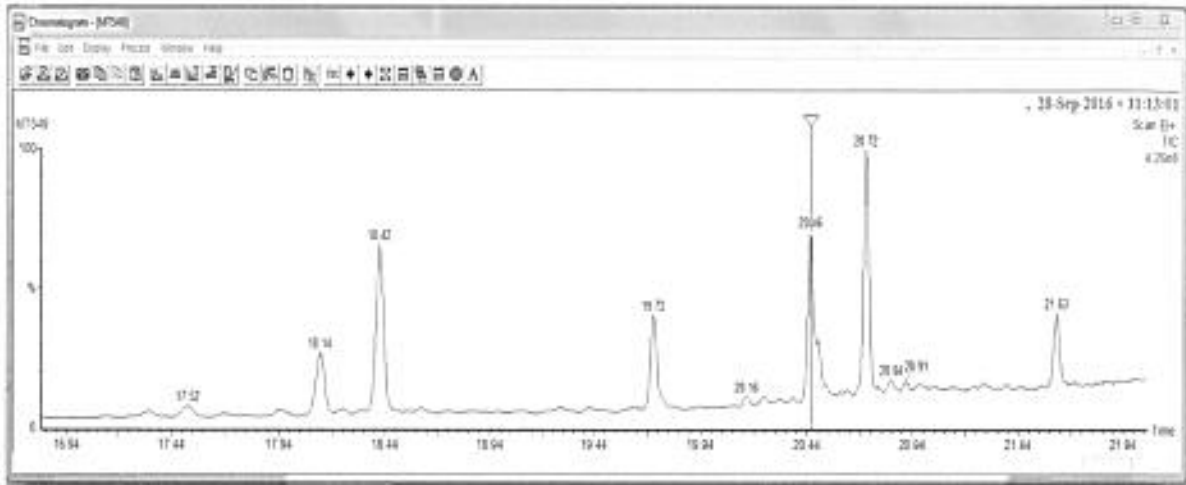


ILUSTRACIÓN 9

ESPECTRO DE THC EN UN ESTÁNDAR

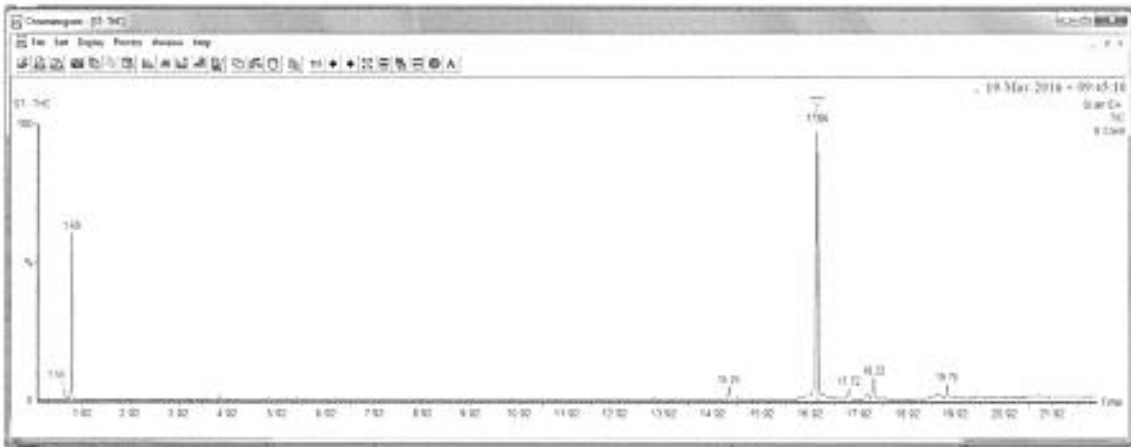


ILUSTRACIÓN 10 MASAS DE THC EN UNA MUESTRA BIOLÓGICA.

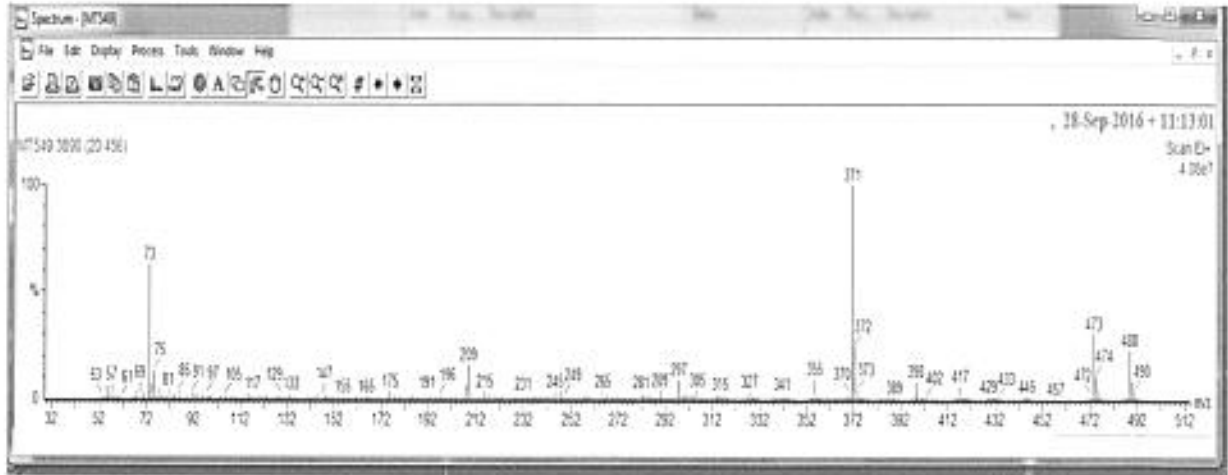


ILUSTRACIÓN 11 MASAS DE THC EN UN ESTÁNDAR

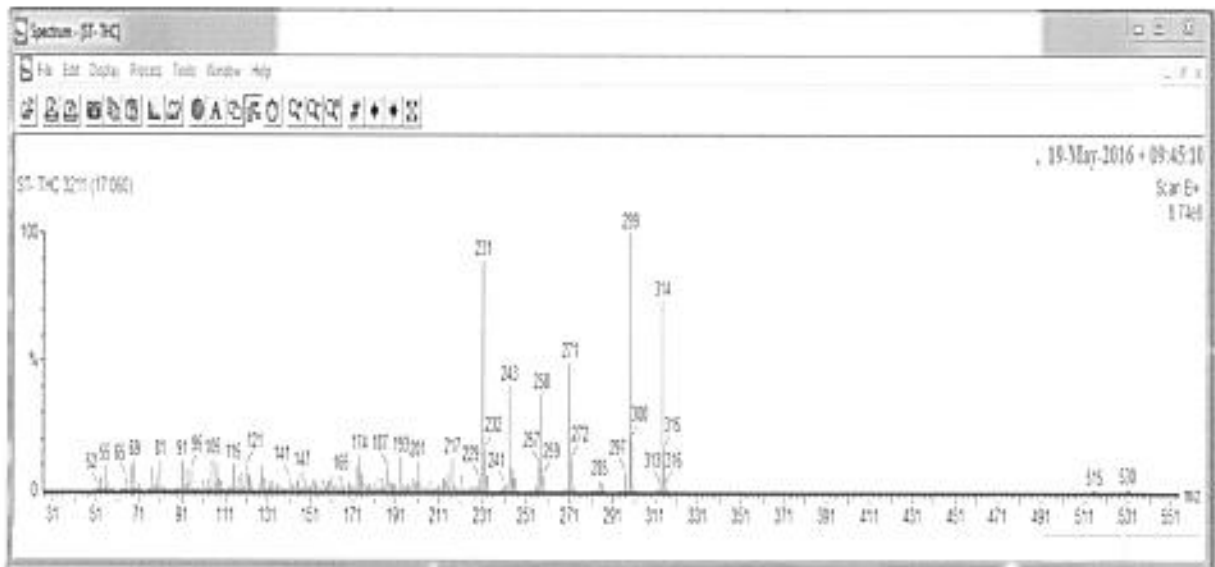


ILUSTRACIÓN 12 IDENTIFICACIÓN DE THC EN MUESTRA BIOLÓGICA

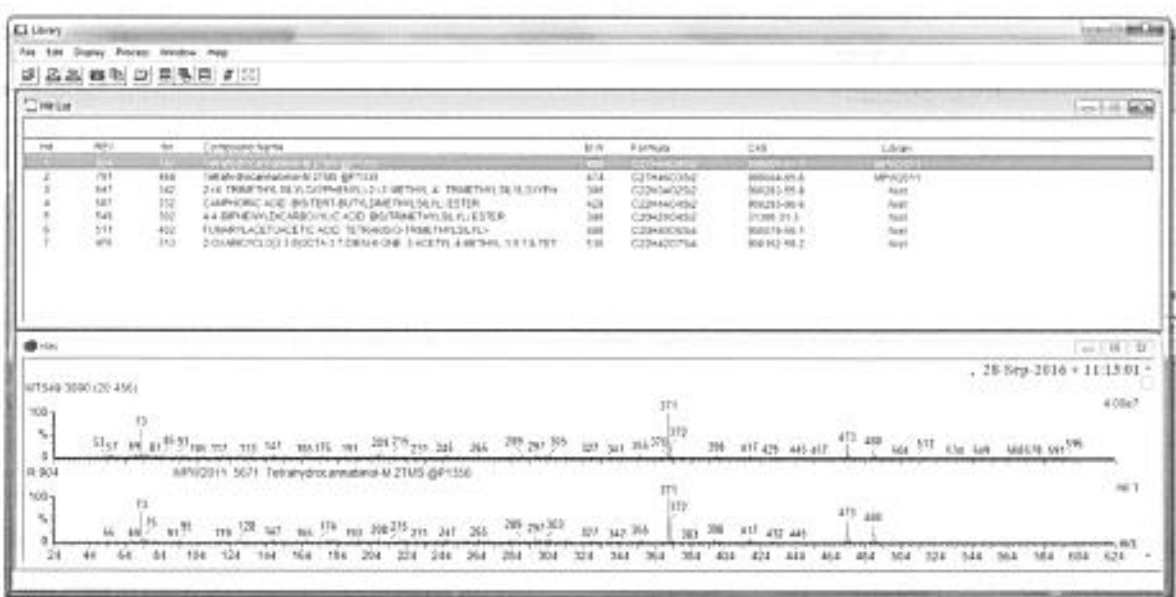
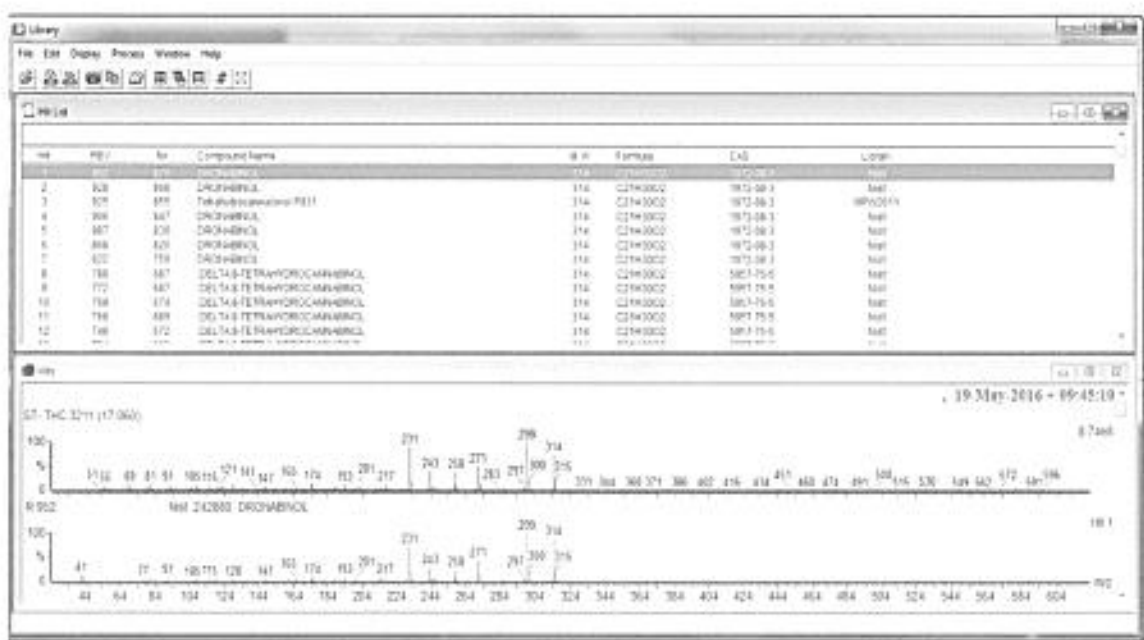


ILUSTRACIÓN 13 IDENTIFICACIÓN DE THC EN UN ESTÁNDAR



Código: SNMLCF-ML-TOXICOLOGÍA-10	INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CANNABINOLES Y SUS METABOLITOS POR CROMATOGRFÍA DE GASES – MASAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS COMO MÉTODO CONFIRMATORIO.	Versión: 1.0 Página 17 de 11
----------------------------------	---	---------------------------------

TRAZABILIDAD DEL DOCUMENTO, COPIAS Y COMPULSAS.

No. de Versión	No. de Copias Distribuidas	Nombre de la persona que recibe	Firma	Fecha	Firma del SGC - Devolución

