

Bolivia



Colombia



Ecuador



Perú



Directrices Técnicas

PROYECTO
PRADICAN
PROGRAMA ANTI-DROGAS ILÍCITAS
EN LA COMUNIDAD ANDINA
COOPERACIÓN UE-CAN (DCHALA/2007/019 670)

Directrices Técnicas

Determinación del Contenido del Alcaloide
de Cocaína en Hoja de Coca

Determinación de la pureza de la cocaína
en productos intermedio y final

Análisis cualitativo de la hoja de coca
y productos de cocaína



DIRECTRICES TECNICAS



PROYECTO
PRADICAN
PROGRAMA ANTI-DROGAS ILÍCITAS
EN LA COMUNIDAD ANDINA
COOPERACIÓN UE-CAN (DCHALA/2007/019 670)



SECRETARÍA GENERAL DE LA COMUNIDAD ANDINA

Aramburú cuadra 4, esquina con Paseo de la República, San Isidro
Lima- Perú

Teléfono: (+511) 710 6400

Fax: (+511) 221 3329

www.comunidadandina.org

Responsable Temático:

Adolfo López Bustillo

Coordinador de Asuntos Políticos de la Secretaría General de la Comunidad Andina

Equipo Técnico:

Alejandro Reyes

Consultor del Proyecto PRADICAN

Tatiana Dalence Montaña

Experta en Drogas del Proyecto PRADICAN

Edición y revisión del informe:

Juana Prado Aliaga

Diseño, diagramación e impresión:

OHQUIS DESIGN E.I.R.L.

Este documento ha sido posible gracias al Proyecto "Programa Anti - Drogas Ilícitas de la Comunidad Andina – PRADICAN".

El contenido de esta publicación no compromete la opinión de la Secretaría General de la Comunidad Andina, de los Países Miembros de la Comunidad Andina, ni de la Unión Europea y sus Estados Miembros.

Primera Edición: Enero 2013

ÍNDICE

Introducción	5
Parte A	
Método Recomendado para la Determinación del Contenido del Alcaloide de Cocaína en Hoja de Coca.	7
Parte B	
Método recomendado para la determinación de la pureza de la cocaína en productos intermedio y final.	13
Parte C	
Análisis adicionales/Opcionales: Método recomendado para el análisis cualitativo de la hoja de coca y productos de cocaína.	17

Introducción

En base al Protocolo de Naciones Unidas, el documento que se presenta es el resultado de un trabajo, en 608 muestras de sustancias cocaínicas, de validación y armonización de procedimientos en los laboratorios químicos forenses de La Paz, Bolivia (FELCN), Bogotá, Colombia (FGN) y Lima Perú (DIRANDRO) y armonizado como instrumento para los laboratorios.

Este documento consiste en tres secciones orientadas a los aspectos analíticos del estudio de la eficiencia de laboratorios de cocaína. Cada sección está diseñada y se ocupa de la naturaleza específica de la muestra y el propósito del análisis. Las secciones son las siguientes:

Parte A: Método recomendado para la Determinación del contenido del alcaloide de la cocaína en la hoja de coca.

Parte B: Método recomendado para la Determinación de la pureza de la cocaína en los productos intermedio y final.

Parte C: Análisis opcional/ adicional: Método recomendado para el análisis cualitativo de hojas de coca y productos de cocaína.

Las partes 1 y 2 son métodos cuantitativos en GC-FID orientados específicamente al análisis de la cocaína en la hoja de coca y los productos de la cocaína. Los resultados de la pureza de la cocaína encontrados en la hoja de coca y los productos de la cocaína son cruciales en determinar el rendimiento teórico del proceso de extracción de la cocaína y la eficiencia total de la producción de laboratorios de cocaína.

El análisis opcional es un método cualitativo en GC-MS que podría proveer información valiosa con respecto a la presencia de otros alcaloides en la hoja de coca así como cualquier tipo de diluyentes usados en el proceso de producción en el producto intermedio y final.

Como este método no proporciona datos de pureza el análisis es opcional para el estudio de la eficiencia de los laboratorios.

Parte A

Método Recomendado para la Determinación del Contenido del Alcaloide de Cocaína en Hoja de Coca.

Reactivos y solventes

- Cloruro de metileno
- Metanol
- Estándar analítico de cocaína
- Tetracosano (estándar interno)

Preparación del solvente de extracción con estándar interno (ISTD)

Disolver 200 mg de Tetracosano en una mezcla de solventes que contiene 250 mL de metanol y 750 mL de cloruro de metileno (resulta en una concentración aproximada de 0,2 mg/mL de Tetracosano en 25:75 metanol: cloruro de metileno).

Preparación del estándar de calibración

1. Prepare una solución stock estándar de cocaína a una concentración de 1 mg/mL usando el solvente de extracción con estándar interno (por ejemplo si la pureza del estándar de la cocaína es de 89,2 %, se pesan exactamente 11,22 mg. de estándar de cocaína en un matraz aforado de 10 ml. y completar hasta la marca con la mezcla de solventes de extracción con el estándar interno).
2. Usando jeringas Hamilton, preparar las siguientes soluciones estándar de trabajo directamente en viales de 2 mL de vidrio.

Estándar de trabajo	Concentración de cocaína (mg/mL)	Volumen de solución stock (μ L)	Volumen de solvente de extracción (μ L)
A	0,050	50	950
B	0,100	100	900
C	0,200	200	800
D	0,300	300	700
E	0,400	400	600
F	0,500	500	500

3. Inyectar 1 μ L de cada solución estándar de trabajo (preferiblemente por triplicado) dentro del GC-FID y establecer una curva de calibración usando el método de estándar interno.



Preparación de solución estándar de control de calidad

1. Prepare una solución stock de cocaína estándar a una concentración de 0,2 mg/mL usando el solvente de extracción con estándar interno (por ejemplo si la pureza del estándar de cocaína es 89,2%, se pesan exactamente 2,25 mg. de cocaína estándar en un tubo de cultivo de 15 mL y se añaden 10 mL de solvente de extracción con estándar interno utilizando una pipeta volumétrica).
2. Calentar la mezcla a 75 °C en un horno por una hora con agitación ocasional a intervalos de 15 minutos.
3. Dejar que la solución se enfríe a temperatura ambiente.
4. Transferir 1 mL de la solución dentro de un vial de vidrio de 2 mL.
5. Inyectar 1 μ L de solución estándar de control de calidad dentro del GC-FID.

Preparación de muestras de hoja de coca

1. Secar las muestras de hoja de coca en el horno a 40 °C durante la noche o hasta que no haya ningún cambio de peso.
2. Usar un mortero y pistilo, moler y homogenizar una muestra representativa de un lote de hoja de coca secada en horno.
3. Se pesan exactamente dos porciones de 500 mg de la muestra de hoja de coca por separado en tubos de cultivo (al menos debe hacerse muestra duplicada para obtener el contenido medio del alcaloide de la cocaína en la hoja de coca).
4. Adicionar 10 mL de solvente de extracción con estándar interno dentro de los tubos de cultivo usando una pipeta volumétrica de 10 mL.
5. Calentar la mezcla a 75°C en un horno por una hora con agitación ocasional a intervalos de 15 minutos.
6. Permitir que la mezcla se asiente y enfriar a temperatura ambiente por otra hora.
7. Filtrar 2 mL del sobrenadante directamente dentro de un vial de vidrio de 2 mL usando una jeringa de 3 mL BD Luer Lok con un filtro de jeringa de 0,45 micras (sin aguja).
8. Inyectar 1 μ L del extracto de la muestra dentro del GC-FID.

Condiciones de operación del GC-FID para cuantificación de cocaína en hoja de coca

Condiciones de operación del GC-FID para cuantificación de cocaína en hoja de coca	
Columna:	DB-1 o equivalente (30m x 0,32 mm x 0,25 µm; no polar, 100% dimetilpolisiloxano)
Gas de arrastre:	1,4 mL/min Nitrógeno
Gas makeup:	28,6 mL/min Nitrógeno
Gas del detector:	30,0 mL/min Nitrógeno y 300,0 mL/min aire
Flujo Split:	7,0 mL/min
Flujo de purga del septum:	3,0 mL/min
Presión de cabeza de columna:	10.594 psi
Temperatura del inyector:	280 °C
Temperatura del detector:	280 °C
Programa de temperatura del horno:	180 °C (mantener por 3 min) rampa a 10 °C/ min 280 °C (mantener por 25 min)
Tiempo de equilibrio del horno:	0,5 min
Volumen de inyección:	1 µL
Relajación de Split :	1:5
Tiempo de corrida:	38 min

Cálculos

El porcentaje de cocaína en la muestra se calcula en primer lugar, trazando una curva de calibración lineal de la respuesta observada para los estándares de calibración (es decir, área de pico del estándar de la cocaína/ área de pico del estándar interno) frente a la concentración del estándar de la cocaína utilizado (mg/mL). De la respuesta de la solución de la muestra desconocida y el valor correspondiente en la curva de calibración, se puede obtener el porcentaje de cocaína en la hoja de coca utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cocaine} = 100 \times \frac{V \times \frac{(R_s - b)}{a}}{W_s}$$

Donde:

V: Volumen del solvente de extracción usado (mL)

RS: Respuesta de la razón observado para la muestra (área de pico de la cocaína/área de ISTD)

a: Gradiente de la curva de calibración

b: Intercepto de la curva de calibración

Ws: Peso de la muestra (mg)



Resultados

El orden de elución y el correspondiente tiempo de retención relativo de la cocaína, mayor y menor componentes en la hoja de coca usando las condiciones de operación descritas arriba (con respecto a la cocaína) son como sigue:

Compuesto	Tiempo de retención relativo (min)*
Metilester ecgonina	0,35
Ecgonina	0,56
Tropacocaína	0,77
Norcocaína	0,97
Cocaína	1,00
Tetracosano (ISTD)	1,18
Trans-Cinnamoilcocaína	1,27
Benzoylecgonina	1,29

**Valores so indicativos y pueden cambiar con condiciones analíticas diferentes, e.g tipo de columna y dimensiones.*

Notas analíticas

1. Este método no debería ser usado para la identificación de los compuestos en el extracto de hoja de coca. Para este propósito, un método de GC-MS sería el método preferible de elección (ver parte C).
2. La solución estándar de control de calidad deberá ser analizada simultáneamente con las soluciones de la muestra para comprobar la exactitud del método.
3. Entre cada muestra corrida, un método de lavado separado deberá usarse con un blanco de solvente de extracción. Esto se hace porque hay muchos picos de elución tardíos en el extracto de la hoja de coca que necesitan ser descargados o eliminados del sistema antes de que una nueva muestra sea inyectada. Las condiciones de operación del GC-FID para este método están dadas abajo:

Condiciones de operación del GC-FID para separar los compuestos de elución tardíos

Columna:	DB-1 o equivalente (30m x 0,32 mm x 0,25 µm; no polar, 100% dimetilpolisiloxano)
Gas de arrastre:	3,0 mL/min nitrógeno
Gas makeup:	27 mL/min nitrógeno
Gas del detector:	30,0 mL/min Hidrógeno y 300,0 mL/min aire
Flujo Split:	15,0 mL/min
Flujo de purga del septum:	3,0 mL/min
Presión de cabeza de columna:	25,435 psi
Temperatura del inyector:	280 °C
Temperatura del detector:	280 °C
Programa de temperatura del horno:	310 °C (mantener por 60 min)
Tiempo de equilibrio del horno:	0,5 min
Volumen de inyección:	1 µL
Relajación de Split:	1:5
Tiempo de corrida:	60 min

Parte B

Método recomendado para la determinación de la pureza de la cocaína en productos intermedio y final.

Reactivos y solventes

- Cloruro de metileno
- Metanol
- Estándar analítico de cocaína
- Tetracosano (estándar interno)

Preparación de solvente de extracción con estándar interno (ISTD)

Disolver 200 mg de Tetracosano en una mezcla de solventes que contienen 250 mL de metanol y 750 mL de cloruro de metileno (resulta en una concentración de 0,2 mg/mL de Tetracosano en 25:75 metanol: cloruro de metileno).

Preparación del estándar de calibración

1. Prepare un stock de solución estándar de cocaína a una concentración de 1 mg/mL usando el solvente de extracción con el estándar interno (por ejemplo si la pureza del estándar de cocaína es 89,2 %, pese exactamente 11,22 mg de Estándar de cocaína dentro de un matraz volumétrico de 10 mL y completar hasta la marca con el solvente de extracción con estándar interno).
2. Usando una jeringa Hamilton, prepare las siguientes soluciones estándar de trabajo directamente en viales de vidrio de 2 mL:

Estándar de trabajo	Concentración de cocaína (mg/mL)	Volumen de solución stock (µL)	Volumen de solvente de extracción (µL)
A	0.050	50	950
B	0,100	100	900
C	0,200	200	800
D	0,300	300	700
E	0,400	400	600
F	0,500	500	500

3. Inyectar 1 µL de cada solución estándar de trabajo (preferiblemente por triplicado) dentro del GC-FID y establecer una curva de calibración usando el método de estándar interno.



Preparación de la solución estándar de control de calidad

1. Prepare una solución de cocaína estándar de control de calidad a una concentración de 0,2 mg/mL usando el solvente de extracción con estándar interno (por ejemplo si la pureza del estándar de cocaína es 89,2%, pesar exactamente 2,25 mg de cocaína estándar en un matraz aforado de 10 mL y llenar hasta la marca con el solvente de extracción con estándar interno).
2. Transferir 1 mL de la solución dentro de un vial de vidrio de 2 mL.
3. Inyectar 1 μ L de solución estándar de control de calidad al GC-FID.

Preparación de muestras de cocaína en productos intermedio o final

1. Pulverizar y homogenizar la muestra de cocaína sólida usando un mortero y pistilo.
2. Pesar exactamente dos porciones de 50 mg de muestra de cocaína separadamente dentro de un matraz volumétrico de 100 mL para pureza de cocaína estimada > 20%. Para pureza < 20%, en su lugar sería usado un matraz volumétrico de 25 mL (a menos que se haga una muestra duplicada para obtener un promedio de pureza de cocaína).
3. Adicionar solvente de extracción con estándar interno hasta la marca en el matraz aforado.
4. Si la solución resultante es turbia, filtrar una alícuota de 2 mL utilizando una jeringa BD Luer- Lok con un filtro de jeringa de 0,45 micras (sin aguja) en un vial de 2 mL, de lo contrario transferir 1 mL de la solución a un vial de vidrio de 2 mL.
5. Inyectar 1 μ L del extracto de la muestra en el GC-FID

Condiciones de operación del GC-FID para cuantificación de cocaína en productos intermedio y final

Columna:	DB-1 o equivalente (30m x 0,32 mm x 0,25 μ m; no polar, 100% dimetilpolisiloxano)
Gas de arrastre:	1,4 mL/min nitrógeno
Gas makeup:	28,6 mL/min nitrógeno
Gas del detector:	30,0 mL/min Hidrógeno y 300,0 mL/min aire
Flujo Split:	7,0 mL/min
Flujo de purga del septum:	3,0 mL/min
Presión de cabeza de columna:	12,816 psi
Temperatura del inyector:	280 °C
Temperatura del detector:	280 °C
Programa de temperatura del horno:	250 °C (mantener por 8 min)
Tiempo de equilibrio del horno:	0,5 min
Volumen de inyección:	1 μ L
Relajación de Split:	1:5
Tiempo de corrida:	8 min

Cálculos

El porcentaje de cocaína en la muestra se calcula entonces manualmente primero trazando una curva de calibración lineal de la relación de respuesta observada para los estándares de calibración (es decir área pico del estándar de cocaína/área de pico de ISTD) frente a la concentración del estándar de cocaína usado (mg/mL). De la respuesta de la solución de la muestra desconocida y el valor correspondiente de la curva de calibración, el porcentaje de cocaína en el producto intermedio o final podría ser obtenida utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cocaine} = 100 \times \frac{V \times \frac{(R_s - b)}{a}}{W_s}$$

Donde:

V: volumen del solvente de extracción usado (mL)

Rs: relación de respuesta observada para la muestra (área de pico de cocaína/área de pico de ISTD)

a: gradiente de la curva de calibración

b: intercepto de la curva de calibración

Ws: peso de la muestra (mg)

Resultados

El orden de elución y el correspondiente tiempo de retención relativo de la cocaína, los componentes mayores y menores así como los diluyentes utilizando las condiciones de operación de arriba (con respecto a la cocaína) son los siguientes:



Compuesto	Tiempo de retención relativo (min)*
Metilester ecgonina	0,54
Benzocaina	0,55
Paracetamol	0,58
Fenacetina	0,58
Ecgonina	0,63
Cafeína	0,65
Lidocaína	0,69
Tropacocaína	0,75
Levamisol/Tetramisol	0,76
Procaína	0,78
Norcocaína	0,97
Cocaína	1,00
Tetracosano (ISTD)	1,33
trans-Cinamoilcocaína	1,70
Benzoylecgonina	1,80
Quinina (requiere tiempo de corrida extendido)	2,95
Hidroxicina (requiere tiempo de corrida extendido)	3,45
Diltiazem (requiere tiempo de corrida extendido)	4,01

**Valores son indicativos y pueden cambiar con condiciones analíticas diferentes, e.g tipo de columna y dimensiones.*

Notas analíticas

1. Este método no debería ser usado para identificación de compuestos en productos de cocaína. Para este propósito, un método GC-MS sería el método a elegir (ver parte C).
2. El estándar de solución de control de calidad podría ser analizado al mismo tiempo que las soluciones de muestra para comprobar la exactitud del método.
3. Entre cada muestra corrida, es aconsejable correr un blanco de solvente de extracción con el mismo método para asegurar que no arrastre cualquiera de los compuestos finales de elución que podrían interferir con la próxima muestra que se corra.

Parte C

Análisis adicionales/Opcionales: Método recomendado para el análisis cualitativo de la hoja de coca y productos de cocaína.

Reactivos y solventes

- Cloruro de metileno
- Metanol
- Estándar analítico
- Tetracosano (opcional- estándar interno)

Preparación del solvente de extracción (adición opcional de estándar interno si se requiere asegurar los tiempos de retención)

Prepare una mezcla de solventes de 25 mL de metanol y 75 mL de cloruro de metileno. Si se requiere asegurar los tiempos de retención adicione 100 mg de Tetracosano a la mezcla (resulta en una concentración aproximada de 1mg/mL de Tetracosano en 25:75 metanol: cloruro de metileno).

Preparación de soluciones estándar

1. Preparar una solución patrón de cocaína y sustancias relacionadas separadamente a concentraciones de 1 mg/mL usando el solvente de extracción.
2. Transferir 1mL de la solución a un vial de vidrio de 2 mL.
3. Inyectar 1-2 μ L de la solución patrón en el GC-MS.

Preparación de las muestras de hoja de coca

1. Secar las muestras de hoja de coca en el horno a 40°C durante la noche o hasta que no haya cambio en el peso.
2. Usando un mortero y pistilo, moler y homogenizar una muestra representativa de un lote de hoja de coca secada en horno.
3. Pesar 500 mg de hoja de la muestra de hoja de coca en un tubo de cultivo de 15 mL.
4. Adicionar 2 mL de solvente de extracción en el tubo de cultivo.
5. Calentar la mezcla a 75°C en un horno por una hora con agitación ocasional a intervalos de 15 minutos.
6. Permitir que la mezcla se asiente y enfriar a temperatura ambiente.
7. Filtrar 1 mL del sobrenadante directamente dentro de un vial de vidrio de 2 mL usando una jeringa de 3 mL BD Luer Lok con un filtro de jeringa de 0,45 micras (sin aguja).



8. Inyectar 1-2 μL del extracto de la muestra dentro del GC-MS.

Preparación de la muestra de cocaína en los productos intermedio y final.

1. Pulverizar y homogenizar la muestra de cocaína sólida usando un mortero y pistilo.
2. Pesar aproximadamente 5 mg de la muestra de cocaína en un tubo de ensayo y adicione 2 mL del solvente de extracción.
3. Mezclar la solución agitándola o con agitador vortex. Si la solución resultante está nublada, filtrar usando una jeringa BD Luer- Lok con un filtro de jeringa de 0,45 micras (sin aguja) dentro de un vial de vidrio de 2 mL, de otra manera transferir 1 mL de la solución a un vial de vidrio de 2 mL.
4. Inyectar 1-2 μL del extracto de la muestra dentro del GC-MS.

Condiciones de operación del GC-FID para análisis cualitativo de muestras de cocaína

Columna:	Ultra 2 o equivalente (25m x 0,2 mm x 0,33 m; ligada entrecruzada, 5% fenilmetilsiloxano)
Presión de cabeza de columna:	8 psi
Gas de arrastre:	1 mL/min helio
Modo de entrada:	Split
Temperatura del inyector:	280 °C
Temperatura del detector:	280 °C
Programa de temperatura del horno:	80 °C (mantener por 3 min) rampa a 40 °C/ min a 280 °C (mantener por 15 min)
Tiempo de corrida:	23 min
Modo de adquisición:	Scan
Rango de Scan:	33-500 uma

Nota: Las condiciones anteriores pueden ser alteradas, siempre y cuando se lleve a cabo la validación adecuadas

Resultados:

La identificación se realiza comparando el tiempo de retención y el espectro de masas del analito con la de un patrón de referencia. Todos los compuestos identificados por GC-MS y reportados por el analista deben ser comparados con un espectro de masas actual del estándar de referencia apropiado, preferiblemente obtenido en el mismo instrumento, operado bajo las mismas condiciones.

Librerías comerciales de espectros de masa o espectros generados por el usuario podrían ser usados con propósitos de referencia solamente.

El orden de elución y el correspondiente tiempo de retención para cocaína, componentes mayores y menores así como diluyentes usando las condiciones de operación anteriores son como siguen:

Compuesto	Tiempo de retención (min)*	Base, P1, P2, M ⁺ ions (m/z)
Ecgonina Metilester:	8.3	82, 96, 94, 199M ⁺
Benzocaína	8.6	120, 165M ⁺ , 92, 65
Paracetamol	9.1	109, 151M ⁺ , 43, 80
Fenacetina	9.1	108, 109, 179M ⁺ , 137
Cafeína	9.8	194M ⁺ , 109, 55, 67
Lidocaína	9.9	86, 87, 58, 234M ⁺
Tropacocaína	10.4	124, 82, 94, 245M ⁺
Levamisol/Tretamisol	10.6	204M ⁺ , 148, 73, 101
Procaína	10.6	86, 99 120, 58
Norcocaína	11.7	168, 68, 136, 289M ⁺
Cocaína	11.8	82, 182, 94, 303M ⁺
Tetracosano (ISTD)	12.5	57, 71, 43, 338M ⁺
<i>trans-Cinamoilcocaína</i>	15,1	82, 182, 96, 329M ⁺
Benzoylecgonina	16.2	124, 82, 77, 289M ⁺
Quinina	21.1	136, 137, 81, 42
Hidroxicina (requiere tiempo de corrida extendido)	22.6	201, 165, 299, 374M ⁺
Diltiazem (requiere tiempo de corrida extendido)	25.6	58, 71, 72, 414M ⁺

* Los valores son indicativos y pueden cambiar en condiciones analíticas, diferentes, como el tipo de columna y dimensiones.

<http://www.comunidadandina.org/pradican.htm>

COMUNIDAD
ANDINA 

PROYECTO
PRADICAN
PROGRAMA ANTI-DROGAS ILÍCITAS
EN LA COMUNIDAD ANDINA
COOPERACIÓN UE-CAN (DCH-ALA/2007/019 670)

 UNION
EUROPEA



PERÚ
Presidencia del
Consejo de Ministros

Comisión Nacional para el Desarrollo
y Vida Sin Drogas - DEVIDA