



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI



MÁSTER EN GENÉTICA, FÍSICA Y QUÍMICA FORENSE

Desarrollo y optimización del análisis de GHB en matrices biológicas mediante GC-MS

Clàudia Lázaro Álvarez

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

2024 – 2025

Tutora INTCF: Tamara Khazooz del Castillo

Tutora URV: Carme Aguilar Anguera

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar expresando mi más sincero agradecimiento a Tamara y Marta, por su paciencia, su orientación y todo lo que me han enseñado. He aprendido muchísimo más de lo que jamás habría imaginado durante mi estancia en el centro, y gran parte de eso os lo debo a vosotras.

También quiero dar las gracias al resto de Facultativos del centro, que siempre nos han hecho un hueco en el laboratorio con paciencia para que pudiéramos llevar a cabo nuestra investigación.

Al equipo de Técnicos y Ayudantes de laboratorio, gracias por responder a todas mis dudas (que no han sido pocas) con tanta paciencia. En especial, gracias a Maite, con quien he compartido un montón de horas en las campanas, entre cotilleo y batallitas... ¡te voy a echar muchísimo de menos!

También quiero agradecer a Carmen por su ayuda y por guiarme en cómo enfocar y elaborar este trabajo. Su orientación ha sido clave para poder darle forma a todo esto.

Gracias a Clàudia y Paula. Por los desayunos, las comidas, las risas y el chisme. Me hace muy feliz teneros como amigas, y estoy muy orgullosa de vosotras.

Y, por supuesto, gracias a mi familia y amigos. Por aguantarme hablando sin parar de esta investigación y por escucharme recitar la memoria como quinientas veces. Sin vosotros, esto no habría sido posible.

En especial, gracias a mi madre, por ser una mujer increíble y enseñarme a ser persistente y valiente.

RESUMEN

El presente trabajo se centra en la optimización del análisis de ácido gamma-hidroxibutírico (GHB) en matrices biológicas, específicamente orina y sangre, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El GHB es una sustancia de interés forense por su uso recreativo y su implicación en delitos de sumisión química. Sin embargo, su análisis se ve dificultado por la aparición de interferentes, su rápida metabolización y problemas en el suministro de estándares de referencia.

El estudio se divide en tres fases: identificación de interferencias endógenas en orina, evaluación del impacto de la concentración del estándar interno (GHB-D₆) y desarrollo de un nuevo protocolo de extracción de GHB en sangre. Se implementaron nuevos métodos cromatográficos capaces de resolver completamente el pico de GHB obteniendo resultados que permiten una identificación y cuantificación más fiable.

Adicionalmente, se realizó la definición de valores umbral en muestras blanco de sangre.

Palabras clave: GHB, matrices biológicas, GC-MS, sumisión química, análisis forense, optimización analítica.

ABSTRACT

The current study focuses on the optimization of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) analysis in biological matrices, specifically urine and blood, using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). GHB is a substance of forensic interest due to its recreational use and its involvement in drug-facilitated crimes. However, its analysis is complicated by the presence of interfering substances, its rapid metabolism, and issues related to the supply of reference standards.

The study is divided into three phases: identification of endogenous interferences in urine, evaluation of the impact of the internal standard concentration (GHB-D6), and development of a new extraction protocol for GHB in blood. New chromatographic methods were implemented, capable of fully resolving the GHB peak, yielding results that allow for more reliable identification and quantification.

Additionally, threshold values were defined in blank blood samples.

Keywords: GHB, biological matrices, GC-MS, drug-facilitated crime, forensic analysis, analytical optimization.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	OBJETIVOS	7
3.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	8
3.1	Material, Equipos y Reactivos.....	8
3.2	Preparación de soluciones madre	9
3.3	Pretratamiento: Extracción en orina.....	9
3.4	Procedimientos analíticos.....	10
3.5	Condiciones cromatográficas	14
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.	CONCLUSIONES	31
	BIBLIOGRAFÍA	32
	ANEXOS.....	37

1. INTRODUCCIÓN

El ácido gamma-hidroxibutírico (GHB) es un precursor y metabolito del ácido gamma-aminobutírico (GABA), un aminoácido clave en la regulación de la excitabilidad cerebral¹, las estructuras de ambos compuestos pueden verse en la *Figura 1*. El GHB se trata de un ácido graso endógeno de cadena corta presente en el sistema nervioso central (SNC), donde actúa como un inhibidor y ejerce un efecto depresor^{2,3}. La biosíntesis de este ocurre a partir del glutamato, y se produce principalmente en las regiones del tálamo y la amígdala⁴.



Figura 1. Estructura del GHB y del GABA

El GHB se sintetizó por primera vez en 1874 y ha sido empleado con finalidades clínicas desde 1960 como anestésico, en el tratamiento de trastornos del sueño y del síndrome de abstinencia alcohólica^{2,5}. Sin embargo, en la década de los 2000 se dejó de distribuir como medicamento de venta libre debido a numerosos casos de depresión respiratoria y muertes relacionadas con su consumo⁵. En la actualidad, su presencia en España está exclusivamente vinculada al consumo ilícito. A nivel internacional, el GHB está incluido en la Lista II de la *Green List*, que agrupa las sustancias psicotrópicas sometidas a fiscalización⁶.

El GHB es conocido principalmente por su uso como droga de abuso, y se le suele denominar “éxtasis líquido”, “Fantasy”, “G” o “date-rape drug”, debido a su implicación en delitos de violencia sexual facilitados por sumisión química. Su capacidad para inducir somnolencia, desinhibición y amnesia anterógrada lo ha convertido en una de las sustancias más utilizadas en este tipo de agresiones. Además, su consumo se ha extendido en contextos como el *chemsex*, una práctica que combina el uso de sustancias psicoactivas con encuentros sexuales prolongados, aprovechando sus efectos euforizantes y desinhibidores⁵.

El aspecto del GHB es el de una sustancia transparente e incolora en su forma líquida, y el de un polvo blanco en su forma sólida. Presenta un sabor ligeramente salado, que puede pasar desapercibido al mezclarse con bebidas alcohólicas. Esto permite su administración sin que la víctima lo perciba, siendo el consumo oral la vía más habitual⁷. Desde el punto de vista químico, el GHB es una molécula pequeña y polar, altamente soluble en agua, etanol y otros disolventes comunes. Todos estos factores contribuyen a su utilización en contextos delictivos relacionados con la sumisión química⁵.

Aunque el GHB está catalogado como sustancia controlada en muchos países, el abuso persiste debido a la disponibilidad de fármacos precursores como la γ -butirolactona (GBL), el 1,4-butanodiol (BD) y el ácido gamma-hidroxiácido (GHA), los cuales se transforman rápidamente en GHB tras su ingestión, hecho que complica mucho su control^{8,9,10}.

Los motivos expuestos destacan la importancia de contar con métodos analíticos sensibles y específicos para la detección de GHB en el contexto forense. Por ello, se ha realizado una revisión bibliográfica con el fin de identificar áreas de mejora en comparación con la metodología actualmente empleada en el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (INTCF).

1.1 Técnicas analíticas para la determinación de GHB

1.1.1 Estado del arte: revisión bibliográfica

Todos los estudios revisados para establecer los antecedentes analíticos del GHB se incluyen en forma de tabla en el Anexo I.

La detección de GHB en matrices biológicas representa un reto analítico significativo debido a sus propiedades fisicoquímicas, como su baja masa molecular, alta polaridad y su presencia endógena en concentraciones variables, además de su rápida eliminación del organismo. Tradicionalmente, la GC-MS ha sido la técnica de referencia en el análisis forense y toxicológico del GHB. Sin embargo, muchas veces este enfoque requiere una etapa obligatoria de derivatización para mejorar la volatilidad del analito y facilitar su detección, utilizando agentes como BSTFA o TMS, lo cual añade complejidad al procedimiento y aumenta el tiempo de análisis.

En respuesta a estas limitaciones, técnicas como la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS y UPLC-MS/MS) han ganado protagonismo. Estas metodologías permiten la cuantificación directa del GHB sin necesidad de derivatización, lo cual reduce el tiempo de preparación. La extracción en fase líquida (LLE) suele emplearse en la preparación de muestras para estas técnicas, permitiendo su aplicación en matrices como sangre, orina, suero y cabello.

Actualmente, con la finalidad de poder ampliar la ventana de detección del GHB, algunos autores proponen el uso de técnicas emergentes como: el uso de biomarcadores en vez del análisis directo del GHB²⁴ o emplear matrices donde la presencia del GHB prevalece durante más tiempo, como por ejemplo el pelo. También se ha llegado a proponer el uso de técnicas avanzadas como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de relación isotópica por combustión (GC-C-IRMS) debido a que este método permite determinar diferencias significativas en el cociente isotópico del carbono entre el GHB de origen endógeno y el de síntesis química.

1.1.2 Técnicas empleadas en el INTCF

Aunque estas técnicas emergentes ofrecen ventajas en términos de sensibilidad y ventana de detección, en el INTCF se requiere un enfoque más práctico que permita un análisis rápido y con el menor pretratamiento posible, debido a la elevada carga de trabajo (ya que de rutina se analizan todas las orinas con presunta sumisión química) y a la necesidad de obtener resultados en plazos operativos.

La técnica utilizada para el análisis de GHB tanto en sangre como en orina es la GC-MS en modo de adquisición SIM. A las muestras se les realiza una extracción líquido-líquido (LLE) y el extracto no requiere derivatización, ya que se ha demostrado que esta metodología proporciona mejores resultados según estudios realizados en el INTCF de Barcelona. Para garantizar la fiabilidad del análisis, se deben cumplir tres criterios clave:

- Presencia del estándar interno (GHB-D₆¹)
- Tiempo de retención: que aparezca un pico al tiempo de retención establecido

¹ El cual tiene la misma estructura que el GHB, pero sustituye los hidrógenos por deuterio.

- Iones característicos del GHB: deben detectarse los iones correspondientes en sus proporciones relativas esperadas.

El tiempo de retención y los iones que observar se detallan en el apartado 3.5.2

“Métodos cromatográficos GC-MS”.

El cumplimiento de estos tres parámetros permite evaluar de forma precisa y confiable la presencia de GHB en la muestra analizada. Además, para una correcta interpretación analítica de los resultados es fundamental conocer la base toxicológica forense. Por ello, se ha realizado una revisión general de la farmacología del GHB, detallada en el apartado 1.2 “Farmacología general”.

1.2 Farmacología general

A nivel farmacocinético, el GHB presenta una dinámica no lineal, lo que implica que a medida que se incrementa la dosis administrada los efectos clínicos no aumentan de forma proporcional, pudiendo dar lugar a respuestas inesperadas o potencialmente tóxicas^{8,10,28}. Tras su administración oral, el GHB es rápidamente absorbido, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas entre los 25 y 45 minutos, siendo entonces cuando se empiezan a observar sus efectos²⁹. Su biodisponibilidad oral es relativamente moderada (25–40%) y se ve afectada por el contenido gástrico⁸. Una vez en el organismo, el GHB se distribuye ampliamente en el agua corporal total, atravesando con facilidad la barrera hematoencefálica, lo que explica la rápida aparición de sus efectos en el SNC^{10,8}. En cuanto a su metabolismo, el GHB es transformado casi en su totalidad en productos inactivos a través de vías metabólicas fisiológicas, siendo posteriormente degradado a CO₂ y agua^{30,31,32}. El metabolismo completo se ilustra en la *Figura 2*.

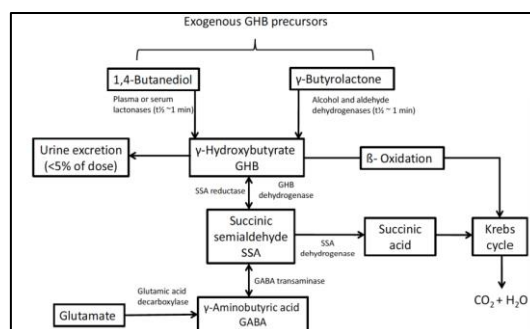


Figura 2. Ruta metabólica del GHB, GBL y 1,4-BD

Esta eficiente transformación metabólica explica por qué solo una fracción mínima (1–5%) se excreta sin cambios por la orina^{8,31}. La ventana de detección útil es de 3 a 10 horas en matriz urinaria, y en torno a 6 horas cuando se analiza sangre^{8,10}. Las concentraciones normales endógenas se reestablecen 12 horas tras el consumo¹⁶ debido a su corto tiempo de vida media de eliminación plasmática^{8,10}.

A nivel farmacodinámico, el GHB destaca por su capacidad para interferir en la neurotransmisión GABAérgica. A diferencia de otros depresores del sistema nervioso central, como el etanol o las benzodiazepinas, que actúan sobre los receptores GABA_A, los efectos farmacológicos del GHB provienen principalmente a través de la activación del receptor GABA tipo B, debido a su similitud estructural con el GABA^{8,10,32}, así como la interacción directa con los receptores específicos de GHB³. En ambos casos, la unión del GHB resulta en una disminución de la actividad neuronal⁷.

Dado que estas sustancias suelen consumirse de forma simultánea, su combinación produce un efecto sinérgico que potencia la acción depresora sobre el sistema nervioso central⁷.

Las concentraciones fisiológicas del GHB pueden variar dependiendo del individuo, especialmente en orina. Esta situación exige establecer límites *cut-off* claros y precisos para diferenciar niveles naturales de aquellos derivados de consumo exógeno, evitando así falsos positivos o negativos^{8,19,35}. Todas estas concentraciones están recogidas en la *Tabla 1*.

*Tabla 1. Concentraciones endógenas y cut-off del GHB en sangre y orina*¹⁹

Matriz	Concentraciones endógenas	Concentraciones cut-off recomendadas (ppm)
Sangre (ante mortem)	<1.0	5
Sangre (post mortem)	1-30	30-50
Orina (ante mortem)	1-10	15
Orina (post mortem)	1-30	30

La administración exógena de GHB da lugar a concentraciones muy superiores a las fisiológicas en muestras antemortem y post mortem¹⁹. Un resultado por encima del *cut-off* en orina confirma el consumo, pero no permite establecer ni la dosis exacta ni el momento preciso de la ingesta¹¹.

1.3 Desafíos analíticos del GHB con el método actual

Previo a la realización del presente estudio, se llevó a cabo una validación teórica del procedimiento para el análisis de GHB mediante GC-MS. Sin embargo, la aplicación de éste en condiciones reales evidenció diversas problemáticas que afectaron la correcta cuantificación y análisis de GHB en distintas matrices biológicas:

- Interferencia en los análisis de orina mediante GC-MS: Se ha detectado una interferencia recurrente en los cromatogramas, incluso al aplicar el método validado, lo que compromete la especificidad del análisis.
- Problemas con el suministro del estándar GHB-D₆: La distribución irregular de este estándar ha obligado a reducir su cantidad a la mitad respecto a la establecida durante la validación del método.
- Extracción ineficaz de GHB en sangre blanca: La elevada concentración de hematíes y la ausencia de anticoagulante en estas muestras favorecen su coagulación durante el proceso de extracción.

La presente investigación se inscribe en este contexto, con el propósito de dar respuesta a la problemática vigente.

Adicionalmente, y en respuesta a requerimientos del INTCF, ha sido necesario realizar un ensayo para determinar la posible contaminación exógena en blancos de sangre. Esta necesidad surge de la importancia de mantener bajo control las posibles fuentes de contaminación, ya que se ha detectado la presencia de señales correspondientes a distintos compuestos en los blancos analíticos preparados junto con cada tanda de muestras.

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente TFM es optimizar el procedimiento analítico empleado en la determinación de GHB en matrices biológicas, principalmente orina y sangre mediante GC-MS, en el INTCF. Para alcanzar este objetivo general, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar un nuevo método capaz de separar la interferencia en las muestras de orina en el análisis de GHB mediante GC-MS. Posteriormente, caracterizar e identificar el interferente. Finalmente, se elaborarán curvas de calibración comparando la metodología actual con el nuevo método optimizado.
- Evaluar el impacto de la variación en la concentración del estándar interno en la cuantificación de GHB en muestras de orina, comparando estadísticamente la cantidad establecida en los Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) tras la validación frente a la mitad de dicha concentración, ante la problemática del suministro irregular de reactivos deuterados.
- Desarrollar un procedimiento de extracción de GHB en sangre más rápido y eficiente, comparando diferentes métodos y seleccionando aquel que ofrezca un mejor rendimiento.

Objetivo adicional:

- Analizar posibles fuentes de contaminación exógena en muestras de sangre blanco, con el objetivo de establecer valores umbral que permitan distinguir entre resultados atribuibles a contaminación externa y aquellos que indiquen un consumo real.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1 Material, Equipos y Reactivos

Todo el material, reactivos y equipos descritos en este apartado han sido cedidos por el INTCF para la realización del estudio.

3.1.1 Material

- Tubos de ensayo de cristal de centrífuga de 10 mL
- Gradillas para tubos de ensayo
- Matraces de 5, 10, 50 mL
- Pipetas de cristal
- Micropipetas automáticas (Rainin)
- Viales de cromatografía

3.1.2 Equipos

- Vórtex
- Centrífuga Eba20 (Hettich)
- Estufa (Selecta)
- Cromatógrafo de Gases 7890A acoplado a espectrómetro de masas 5975C con inyector automático 7693 (Agilent)
- Evaporador (Pierce)

3.1.3 Reactivos

- Metanol de la marca PanReac AppliChem
- Agua destilada Milli-Q
- Orina GHB-negativa²
- Ácido sulfúrico con una pureza del 95-95% (PanReac AppliChem)
- Acetato de Etilo (Sigma-Aldrich)
- Acetona con una pureza del 99,80% (Sigma-Aldrich)

- Material certificado químico (MRQ) de la marca ACQ Science GmbH
 - FDT -25% UR (1191), con una concentración para GHB de 7,244 ppm
 - FDT +25% UR (1192), con una concentración para GHB de 12,204 ppm

- Estándares certificados de Cerilliant-Corporation
 - Sal sódica de GHB con un 99,95% de pureza
 - Ampolla de GHB-D6 (1 mg/mL)

² También se refiere a este reactivo como orina blanca.

3.2 Preparación de soluciones madre

La preparación del patrón de GHB 1000 ppm se realizó a partir de sal sódica de GHB con una pureza del 99,95% y se disolviéndola en metanol en un matraz aforado de 10 mL. A partir de este patrón de 1000 ppm se preparó la solución 100 ppm pipeteando 1 mL de éste y llevándolo a 10 mL de metanol.

La preparación del patrón de GHB-D₆ 100 ppm se realizó pipeteando 1 mL de GHB-D₆ y diluyéndolo en metanol en un matraz aforado de 10 mL.

3.3 Pretratamiento: Extracción en orina

Las muestras de orina se conservan -20°C desde su ingreso al INTCF. Previo a su análisis se dejan atemperar durante 10 minutos a 25°C.

El procedimiento es el siguiente:

1. Se toma 1 mL de orina en un tubo de ensayo de cristal y se añaden 100 µL del estándar interno GHB-D₆.
2. Se añaden 3 gotas de H₂SO₄ con pipeta Pasteur de cristal (aproximadamente 25 µL) y se agita con vórtex 15 segundos.
3. Las muestras se dejan incubar 45 minutos a 60°C en estufa. Este paso es clave para favorecer la reacción de GHB a su forma lactónica (GBL).
4. Se retiran las muestras y se dejan atemperar en campana hasta que alcanzan la temperatura ambiente.
5. Se añade 1 mL de acetato de etilo y se agita con vórtex 15 segundos.
6. Se centrifugan las muestras durante 10 minutos a 4000 rpm.
7. Se recoge la fase superior (fase orgánica) y se traspasa a un vial de cromatografía de 2 mL debidamente identificado.

Con cada tanda de muestras extraídas con este procedimiento se incluye:

- Un control negativo de GHB.
- Una muestra control que tendrá una concentración en torno al límite de cuantificación de 5 ppm.
- Una muestra control que tendrá una concentración en torno al cut-off de 10 ppm.

Las tres muestras se preparan con las cantidades especificadas en µL en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Volumen en μL a añadir para preparar los tres controles que se realizan en las extracciones

	Orina blanca	GHB 100 ppm	GHB-D6 100 ppm
Control negativo	1000	-	100
Control 5 ppm GHB	950	50	100
Control 10 ppm GHB	900	100	100

3.4 Procedimientos analíticos

Con el fin de cumplir adecuadamente con todos los objetivos propuestos, se planteó dividir el estudio en distintas fases. En cada fase se detallan los procedimientos para la preparación de muestras necesarias para complementar dichos objetivos:

3.4.1 Fase 1: Optimización cromatográfica y caracterización de compuestos interferentes en orina

Preparación de solución de acetona

Se pipetea 50 μL de acetona con una pureza del 99,80 % en un matraz de 10 mL y se ha enrasa con agua destilada, obteniendo una solución de acetona de 3,9421 g/L.

Para este ensayo se preparan las siguientes muestras

- Muestra negativa para GHB y para acetona de la extracción, para asegurar que la extracción se ha realizado correctamente.
- Muestra negativa para GHB con 0,39421 g/L de acetona, para ver si el interferente que se ha estado observando en las muestras proviene de la acetona.
- Muestra positiva para una concentración de 5 ppm de GHB con 0,39421 g/L de acetona, para ver si la presencia de acetona dificulta la cuantificación del GHB.

Preparación de comprimidos de AHB y BHB

Se prepara una solución de hidroxibutiratos a partir de unas cápsulas de la marca Drasanvi, se puede ver el envase del producto en la *Figura 3*.



Figura 3. Producto dietético "Keto BHB MCT 600 mg" de la marca Drasanvi

1. Por cada cápsula de comprimido se añaden 50 mL de acetato de etilo³. La solución resultante es un líquido semitransparente con una parte inmiscible.
2. Se filtra con un papel de filtro y se lleva a un Erlenmeyer de 100 mL. La solución resultante es un líquido completamente transparente.
3. Se pipetea volúmenes pequeños de la solución resultante a un tubo de ensayo de cristal de 10 mL.
4. Se colocan en campana bajo un flujo de nitrógeno para su evaporación.
5. Se repiten los pasos 4 y 5 hasta agotar los 50 mL obtenidos en el paso 3.
6. Se reconstituye en 60 µL de acetato de etilo. El resultado es un líquido turbio.
7. Se añade más acetato de etilo hasta que la solución se vuelva completamente transparente.

Preparación de muestras de orina con AHB y BHB

Las muestras de orina fueron recogidas a las 2 y 6 horas tras la ingesta del suplemento y se conservaron a -20°C hasta el momento de su análisis. Para poder analizarlas se les realiza una extracción de la forma descrita en el apartado 3.3 *“Pretratamiento: Extracción en orina”*.

Curvas de calibrado

Se preparan dos curvas metanólicas no extraídas de las cuales se hace la media de los resultados para obtener una única curva de procesado. Las curvas se prepararon realizando diluciones cruzadas con 5 puntos: 20 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 2,5 ppm, 0 ppm.

Material de referencia químico (MRQ)

Para la preparación del MRQ este se reconstituye en 2 mL de agua Milli-Q y se somete al mismo procedimiento de extracción que las muestras de orina, especificado en el apartado 3.3 *“Pretratamiento: Extracción en orina”*.

3.4.2 Fase: 2 Evaluación del impacto de la concentración del estándar interno en la cuantificación de GHB

1. Se preparan 10 tubos de ensayo de cristal de 10 mL
2. Para las muestras de 5 ppm se añaden en cada tubo 1900 µL de orina blanca sin contaminar; Para las muestras de 10 ppm se añaden 1800 µL.
3. Para las muestras de 5 ppm se añaden 100 µL de GHB; Para las muestras de 10 ppm se añaden 200 µL de GHB.

³ Para intentar que la máxima cantidad de hidroxibutirato de calcio se disuelva en este.

4. De cada tubo se pipetea dos alícuotas de 1 mL a dos tubos de ensayo, quedando finalmente 20 tubos de ensayo de cristal.⁴
5. A los 10 primeros tubos se añaden 50 µl de GHB-D6, a los 10 tubos restantes se le añaden 100 µl de GHB-D6.
6. Se realiza la extracción como se describe en el proceso del apartado 3.3 “Pretratamiento: Extracción en orina”

3.4.3 Fase 3: Desarrollo del proceso de extracción de GHB en sangre

Se preparan cinco tubos etiquetados como A, B, C, D y E³⁶, con los siguientes contenidos:

(Los protocolos de extracción A, B, C, D están fundamentados en principios relacionados con la precipitación de proteínas, mientras que el protocolo E se basa en el estudio realizado por Zörntlein et al. (2012))

- Tubos A, B, C y D: Se añade a cada uno 1 mL de sangre previamente diluida 1:2 con suero fisiológico. Los tubos A y B contienen un conservante, mientras que los tubos C y D no lo contienen.
- Tubo E: Se adicionan 1000 µL de sangre sin conservante y 2,5 mL de metanol.

Tratamiento de los tubos A a D:

1. A los tubos A y C se les añaden 3 gotas de ácido sulfúrico (H₂SO₄) utilizando una pipeta de vidrio.
2. A los tubos B y D se les añaden 2 mL de ácido tricloroacético (TCA).
3. Se centrifugaron nuevamente a 4000 rpm durante 10 minutos.
4. Se decanta el sobrenadante.
5. Se procede a realizar una digestión ácida del sobrenadante recogido durante 45 minutos.
6. Se deja atemperar.
7. Se añade 1 mL de acetato de etilo.
8. Se centrifuga una última vez a 4000 rpm durante 10 minutos.
9. Se recoge la fase orgánica (fase superior).

Tratamiento del tubo E:

1. Se centrifuga a 8000 rpm durante 8 minutos y se recoge el sobrenadante con pipeta. (Si se decanta se levanta el residuo proteico y hay que volver a centrifugar).
2. Se añaden 3 gotas de ácido sulfúrico (H₂SO₄).

⁴ La contaminación de orina con GHB se ha realizado de esta forma para que el único factor que influya en el estudio sea el estándar interno. Si se contaminasen individualmente los 20 tubos no se podrían analizar bien los resultados debido a la incorporación de más variables en el error.

3. Se coloca en una estufa durante 45 minutos.

Las siguientes muestras se prepararon con el fin de evaluar si el método de extracción seleccionado tiene la capacidad de extraer bien GHB a distintas concentraciones. Se prepararon 20 muestras, 10 a 10 ppm y 10 a 20 ppm, siguiendo este procedimiento:

1. Se preparan 10 tubos de ensayo de cristal de 10 mL para cada concentración (10 ppm y 20 ppm), sumando un total de 20 tubos.
2. Para la preparación de las muestras de 10 ppm, se pipetea 1 mL de solución de GHB a 100 mg/L en un matraz aforado de 10 mL y se enrasa con sangre diluida 1:2 en suero fisiológico. Para las muestras de 20 ppm, se pipetean 2 mL de GHB a 100 mg/L en un matraz aforado de 10 mL y se enrasa igualmente con sangre diluida 1:2 en suero fisiológico.
3. De cada solución preparada (10 ppm y 20 ppm), se pipetea 1 mL en cada uno de los 10 tubos correspondientes.
4. A cada tubo se añaden 100 µL de patrón interno GHB-D₆.
5. Se realiza la extracción siguiendo el procedimiento tipo C descrito en el apartado correspondiente.

3.4.4 Fase 4: Determinación de valores umbral para la interpretación de resultados en muestras blanco de sangre

Se evalúan 30 muestras blanco, procedentes de bolsas de sangre donadas por centros hospitalarios, preparadas en 2025 por el equipo de técnicos del INTCF. Por motivos de confidencialidad institucional, no se pueden incluir los parámetros específicos de análisis empleados por el INTCF.

Para el análisis sin derivatización:

1. Se reconstituye cada muestra en 60 µL de metanol.
2. Se lleva a un vial de cromatografía para su posterior análisis.

Para el análisis con derivatización:

1. Las muestras se dejan evaporar a 60°C durante 90 minutos.
2. Se reconstituye cada muestra en 60 µL de BSTFA-TMS al 1 %.
3. Se incuba a 60°C durante 90 minutos.

3.5 Condiciones cromatográficas

3.5.1 Condiciones cromatográficas GC-MS

Se utilizó una columna capilar HP-PLOT⁵ de 30 metros de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y un grosor de película de 20 µm. El gas portador empleado fue helio, con un caudal de 1,5 ml/min. La presión de operación varió según el periodo de análisis, registrándose un valor de 6,16 psi durante el mes de abril y aumentando a 7,00 psi a partir de mayo. El flujo total del sistema fue de 20,5 ml/min, con un flujo de purga de 16 ml/min durante 0,3 minutos. La velocidad lineal del gas fue de 49 cm/s. Las inyecciones se realizaron con un volumen de 1 µL utilizando un inyector operado a 270 °C en modo *splitless*. La detección se llevó a cabo mediante un detector de iones tipo multiplicador de electrones (EM), con un haz de iones de 400 V. La temperatura de la interfaz del sistema se mantuvo constante a 280 °C.

3.5.2 Métodos cromatográficos GC-MS

Método 1: Método clásico SIM

Método con el que se habían realizado todos los ensayos para la detección de GHB en el INT.

- Iones:
 - Para el GHB-D6: 48;60;92
 - Para el GHB: 42;56;86
- Rampa:

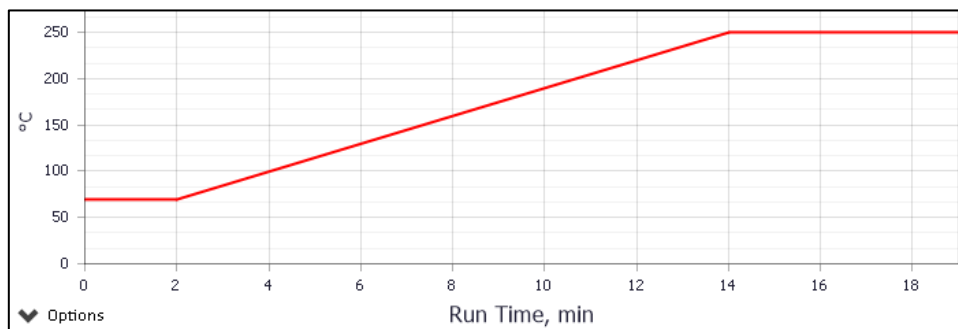


Figura 4. Rampa de temperatura del Método 1

⁵ Esta columna, de tipo open-tubular, cuenta con una fase estacionaria de poliestireno-divinilbenceno, un adsorbente sólido polar que ha demostrado ser particularmente adecuada para la separación de isómeros de C1 a C3, así como para alcanos hasta C12.

- Tiempos de retención aproximados:
 - GHB-D6: 16,602 minutos
 - GHB: 16,693 minutos

Método 2: Método modificado para la separación de interferentes SIM

Método con una modificación en la rampa de temperatura para retener los analitos durante más tiempo en columna y favorecer su separación.

- Rampa:

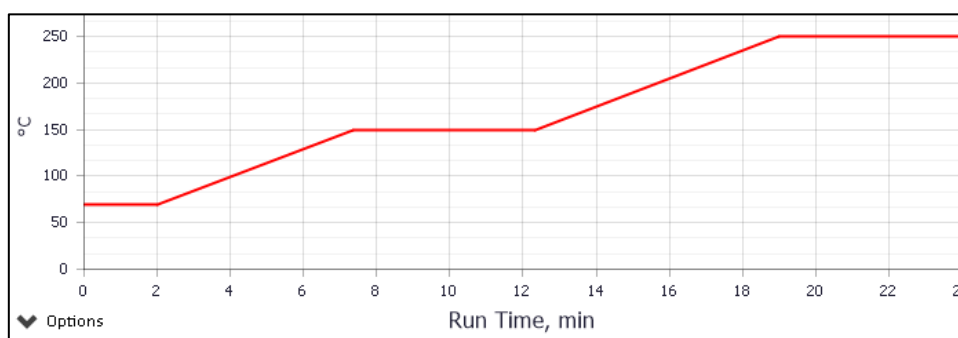


Figura 5. Rampa de temperatura del Método 2

- Tiempos de retención aproximados:
 - GHB-D6: 21,305 minutos
 - GHB: 21,395 minutos
 - Interferente: 21,550 minutos

Método 3: Método modificado para la separación de interferentes SCAN

Método full scan donde el equipo registra todos los iones de las muestras pinchadas. Se emplea la rampa de temperatura del *Método 2* y se mantienen los mismos tiempos de retención.

Método 4: Método modificado para la separación de interferentes con iones del Ácido Crotónico SIM

Método que incorpora los iones del Ácido Crotónico en el detector de masas. Se emplea la rampa de temperatura del *Método 2* y se mantienen los mismos tiempos de retención.

- Iones:
 - Para el GHB-D6: 48;60;92
 - Para el GHB: 42;56;86
 - Para el Ácido Crotónico: 86;68;41

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Fase 1 del estudio: *Optimización cromatográfica y caracterización de compuestos interferentes en orina*

Esta fase se realizó con el objetivo específico de desarrollar un nuevo método para analizar GHB mediante GC-MS que sea capaz de separar y caracterizar el interferente. Se revisaron 806 muestras analizadas entre enero de 2023 y marzo de 2025. Esta revisión confirmó que el 11,54% de muestras presentaba dicha interferencia.

A continuación, en la *Figura 6*, se presenta un ejemplo representativo de una muestra interferida, en la que se observa un pico en el mismo tiempo de retención que el GHB. Por contraste, en la *Figura 7* se muestra el espectro de masas característico de una muestra con GHB puro.

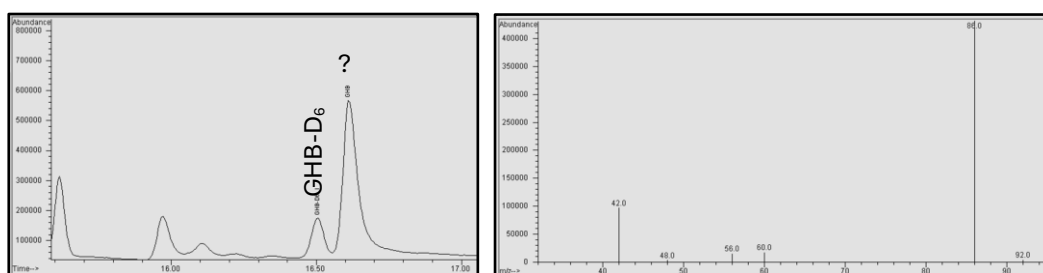


Figura 6. Ejemplo de muestra interferida y espectro de masas atípico al habitual encontrado en el GHB

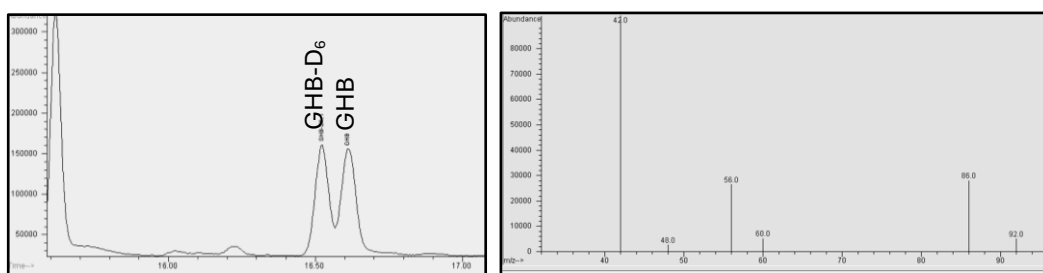


Figura 7. Ejemplo de muestra interferida y espectro de masas atípico al habitual encontrado en el GHB

La presencia de este compuesto interferente, a parte de suponer un problema para la correcta determinación de GHB en la muestra, dificulta enormemente su cuantificación.

4.1.1 Desarrollo de un nuevo método optimizado

La primera necesidad que se debe abordar en el desarrollo metodológico es la correcta separación del pico de GHB del compuesto que interfiere en su análisis.

En el análisis mediante GC-MS, uno de los parámetros más relevantes para ajustar los tiempos de retención de los analitos es la temperatura del horno. La programación de temperatura influye directamente en la volatilización de los compuestos y en su interacción con la fase estacionaria, lo que permite modificar la separación entre picos que presentan tiempos de retención similares³⁷.

Inicialmente, se prueban dos rampas de temperatura identificadas en la revisión bibliográfica de estudios que lograron separar el GHB de sus isómeros (Chagas et al., 2019²¹; Paul et al., 2006¹²). Sin embargo, la expectativa es limitada, dado que la columna y otras condiciones inmodificables en el INTCF difieren de las utilizadas en dichos estudios. Las condiciones detalladas de los estudios mencionados se pueden encontrar en el Anexo II. Como resultado de estas pruebas, no se obtuvo la separación deseada y, en ambos casos, el pico correspondiente al GHB coincidió con el del solvente, impidiendo una identificación fiable del analito.

Se sabe que una rampa de temperatura más lenta puede favorecer una mejor resolución entre compuestos con propiedades fisicoquímicas similares³⁷. Por ello se prueba a modificar la rampa de temperatura del *Método 1*, el método clásico que se emplea en el análisis de orinas en el INTCF mediante GC-MS en modo adquisición SIM. Se crea un nuevo método, el *Método 2*, con el fin de aumentar el tiempo de retención de los analitos en la columna mediante una rampa de temperatura más progresiva.

Se analizan muestras con presencia del interferente utilizando tanto el método clásico (*Método 1*) como el nuevo método (*Método 2*). A continuación, se presentan los cromatogramas representativos de los análisis realizados; el listado completo de muestras analizadas está disponible en el ANEXO III.

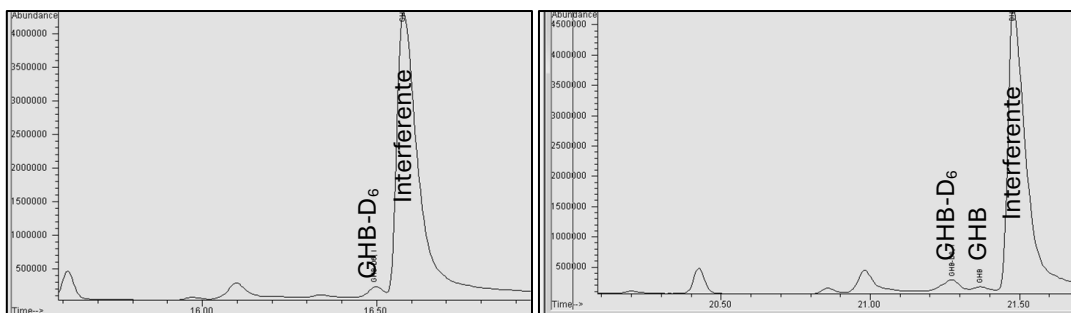


Figura 8. Muestra analizada con el Método 1 (izquierda) y Método 2 (derecha)

Como se puede observar en la *Figura 8*, en el cromatograma de la izquierda no es posible discernir el pico de GHB de forma correcta. En cambio, en el de la derecha el GHB eluye sin solapamiento con otras señales, lo que indica una resolución cromatográfica adecuada. Con los nuevos tiempos de retención obtenidos (21,305 minutos para el GHB-D6, 21,395 minutos para el GHB y 21,550 minutos para el compuesto interferente) se confirma una separación suficiente entre los picos.

Adicionalmente, dado que el método utiliza la espectrometría de masas como sistema de detección, los cocientes iónicos obtenidos para el GHB (42:56:86, de ion mayoritario a minoritario) cumplen con los criterios de conformidad establecidos para su correcta identificación.

4.1.2 Identificación de interferente

Una vez logrado separar correctamente el pico correspondiente al compuesto interferente, se procede a su caracterización.

La revisión de las muestras con interferencia registradas desde 2023 no solo permite cuantificar cuántas presentaban señales contaminantes, sino que también revela un patrón común en todas ellas: la presencia de acetona en el análisis por cromatografía de gases con detección por ionización de llama (GC-FID) realizado como parte del control de alcoholemia en las mismas muestras. A partir de esta observación, se lleva a cabo una revisión bibliográfica con el objetivo de explorar posibles correlaciones entre la presencia de acetona y la aparición de la señal interferente en el cromatograma. Como hipótesis inicial, se plantea que los compuestos potencialmente responsables de dichas interferencias podrían ser:

Acetona

En estudios previos se ha demostrado que la acetona no presenta interferencias en el análisis de GHB en matriz orina¹⁸. Sin embargo, la sospecha actual de que la interferencia sea acetona se fundamenta únicamente en la aparición de ésta en los análisis de alcoholemia mediante GC-FID.

AHB y BHB

La acetona se encuentra metabólicamente relacionada con el ácido β -hidroxibutírico (BHB), un isómero posicional del GHB. Esto se debe a que ambos compuestos, tanto el BHB como la acetona, aparecen durante el proceso de cetogénesis. Ésta se da en personas con diabetes, personas en estado de malnutrición o bien por la ingesta excesiva de alcohol^{40,41,42}.

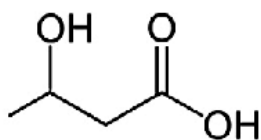


Figura 10. Isómero β (BHB) del GHB

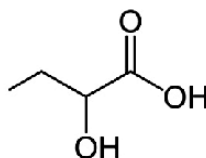


Figura 9. Isómero α (AHB) del GHB

Otro compuesto que debe ser considerado en el análisis es el AHB, otro análogo estructural del GHB, cuyas concentraciones se han reportado elevadas en individuos con diabetes tipo 2³⁰. Las estructuras de ambos isómeros se muestran en las Figuras 9 y 10.

En individuos sanos, ambos compuestos se pueden encontrar de forma endógena en concentraciones relativamente bajas mientras que en personas en estado cetoacidótico estas concentraciones se ven hasta 10 veces por encima^{16,40}.

En las muestras analizadas en el presente estudio, varias víctimas reportaron una ingesta elevada de alcohol en el momento de los hechos, lo que sugiere la posibilidad de un estado de cetoacidosis alcohólica. En este contexto, si bien tanto el AHB como el BHB pueden encontrarse aumentados, es altamente probable que el principal compuesto responsable de las interferencias observadas haya sido el BHB, dada su elevada producción bajo estas condiciones metabólicas.

4.1.2.1 Test de los presuntos interferentes

Se inicia el ensayo contaminando distintas muestras de orina con una concentración de 0,39 g/L de acetona, valor seleccionado por estar próximo al promedio de las

concentraciones observadas en las muestras revisadas. También se contaminan con acetona muestras dopadas con GHB para ver si su cuantificación se ve afectada. Estas muestras se analizan utilizando el *Método 1*, el procedimiento validado y en uso desde hace tiempo en el INTCF, con el fin de evaluar si los resultados obtenidos presentan la misma interferencia que se detecta históricamente con este método.

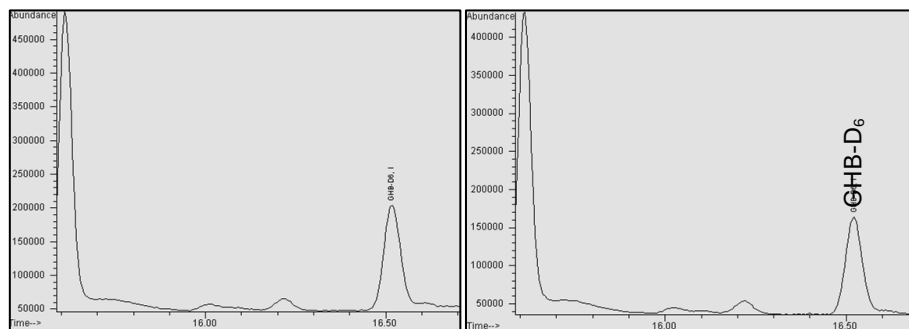


Figura 11. Control negativo del proceso de extracción (izquierda) y muestra contaminada con acetona (derecha)

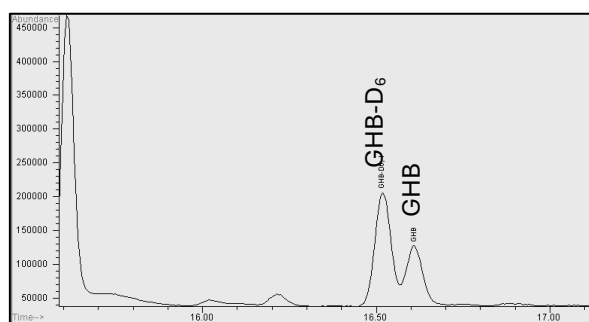


Figura 12. Control GHB 5 ppm contaminado con acetona

Los resultados obtenidos coinciden con los estudios previos revisados¹⁸ y permiten concluir que el interferente de las muestras analizadas no es la acetona. Esta afirmación se sustenta en varias observaciones:

En primer lugar, tanto el control negativo como los controles contaminados intencionalmente con acetona muestran cromatogramas idénticos, como se observa en la *Figura 11*. En segundo lugar, el control positivo contaminado con 5 ppm de GHB y acetona, representado en la *Figura 12*, se cuantifica sin inconvenientes, obteniéndose un valor de 4,54 ppm. Adicionalmente, se verifica que se cumplen los ratios iónicos establecidos.

Habiendo confirmado que la especie interferente no se trata de la acetona, se realizan ensayos para verificar si se trata de los isómeros posicionales del GHB: el AHB y el BHB.

Se analiza una muestra preparada a partir de un comprimido dietético cuya etiqueta indica un contenido de 400mg de hidroxibutiratos. Esta muestra se analiza utilizando el *Método 2*, el cual es capaz de separar los compuestos interferentes del GHB.

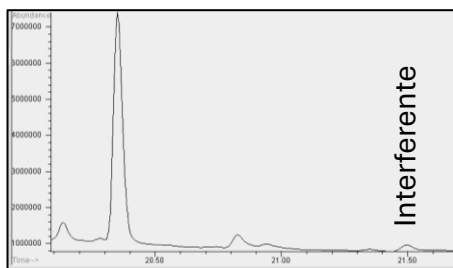


Figura 13. Comprimido dietético analizado con el Método 2

El cromatograma obtenido, representado en la *Figura 13*, confirma que uno de los compuestos detectado en el análisis del comprimido presenta un tiempo de retención que coincide con el del interferente observado en las muestras de orina. Debido a la baja intensidad de la señal, no se obtienen cocientes iónicos consistentes que permitan confirmar que el pico observado corresponde al interferente endógeno presente en las muestras de orina.

Adicionalmente, se analizan muestras de orina recogidas a distintas horas tras el consumo del suplemento dietético. Todas las muestras se analizan mediante el *Método 2*.

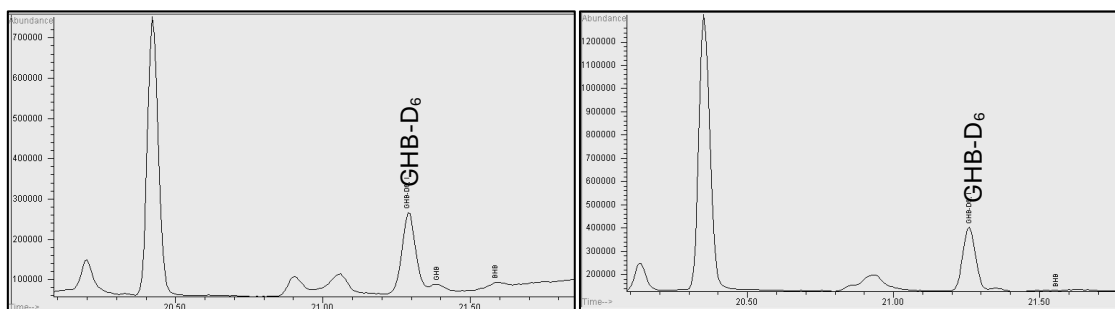


Figura 14. Muestra de orina extraída recogida 2h (izquierda) y 6h (derecha) tras el consumo del comprimido dietético con hidroxibutirato

Como se observa en la *Figura 14*, no hay presencia un pico bien definido al tiempo de elución del interferente en los cromatogramas obtenidos. Esto puede deberse a que el tracto gastrointestinal posee una alta capacidad para metabolizar cuerpos cetónicos como el BHB o el AHB⁴⁵, lo que significa que estos compuestos podrían degradarse por completo durante la digestión y no llegar a excretarse intactos en orina.

Como los resultados de analizar estos compuestos como posibles interferentes no son totalmente satisfactorios, se considera necesario explorar otras estrategias para identificar con mayor precisión el compuesto responsable de la interferencia.

4.1.2.2 Búsqueda del interferente en bases de datos

Se razona que una forma más adecuada de caracterizar el compuesto interferente es realizar un análisis en modo adquisición full-SCAN, ya que esto permitiría obtener un espectro más completo y facilitar su identificación. Por ello, se modifica el modo de adquisición del *Método 2* (elegido en lugar del *Método 1* porque permite separar el pico del interferente, asegurando que el espectro obtenido corresponda únicamente a dicho compuesto) pasando de SIM a full-SCAN. Esta modificación da origen al *Método 3*, cuyo objetivo es capturar el espectro completo del pico interferente. Una vez obtenido el espectro completo de un compuesto se puede comparar con los incluidos en la base de datos de referencia NIST, utilizando para ello el software *MS Search v.2.3*.

A continuación, en la *Figura 15*, se muestran los espectros representativos de los análisis realizados, mientras que el listado completo de las muestras analizadas se encuentra disponible en el ANEXO IV.

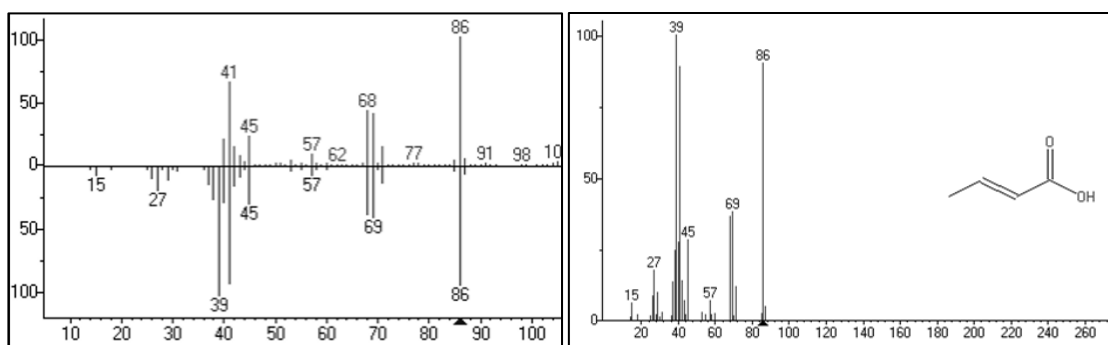


Figura 15. Solapamiento del espectro de masas del analito que eluye al mismo tiempo de retención que la especie interferente con el espectro del ácido crotónico, procesado con el programa *MS Search v.2.3* y Espectro de masas obtenido para el pico interferente

Tras comparar el espectro de masas obtenido con los espectros que contiene la base de datos NIST, se identifica como coincidencia principal el ácido crotónico.

La presencia de ácido crotónico en las muestras no es casual ni atribuible a una contaminación externa, sino que se plantea que éste se genera a partir de la

deshidratación de los ácidos AHB y BHB durante la fase de extracción previa al análisis instrumental y debido a las altas temperaturas del inyector y equipo GC-MS. La estructura del ácido crotónico puede explicarse por una reacción de deshidratación a partir de las estructuras hidroxiladas. En condiciones de calor o en presencia de agentes deshidratantes (como puede ocurrir en ciertas etapas del tratamiento con disolventes orgánicos), los grupos hidroxilo presentes en AHB o BHB pueden perder una molécula de agua, generando un doble enlace y dando lugar a un ácido insaturado como el ácido crotónico^{16,40,41}.

Como se ha comentado anteriormente, es relevante considerar que el BHB y el AHB son ácidos orgánicos que pueden estar presentes en concentraciones elevadas en ciertas condiciones fisiopatológicas. En pacientes que han experimentado episodios de cetoacidosis alcohólica, es plausible que las concentraciones elevadas de BHB en la orina contribuyan a la formación de ácido crotónico durante el tratamiento de las muestras^{16,40,41}.

Tras identificar el compuesto interferente y con el objetivo de desarrollar un método que permita identificar de manera sensible el ácido crotónico se modifica el *Método 2*, el cual ya es capaz de separar dicho interferente, incorporando en él los iones característicos del ácido crotónico, dando así origen al *Método 4*.

Se repite el análisis de todas las orinas empleando el *Método 4*. El listado completo de las muestras analizadas se encuentra disponible en el ANEXO V.

Con los resultados obtenidos tras repetir el análisis, se elaboran la *Tabla 3* y la *Figura 16*, los cuales muestran la relación entre la concentración de acetona y la respuesta del ácido crotónico.

Tabla 3. Relación Área interferente/Área estándar interno con la concentración de acetona en las distintas muestras

	Respuesta Interferente	Acetona (g/L)
1	11,783	0,96
2	5,254	0,30
3	5,828	1,42
4	1,123	0,22
5	0,679	0,21
6	13,803	1,86

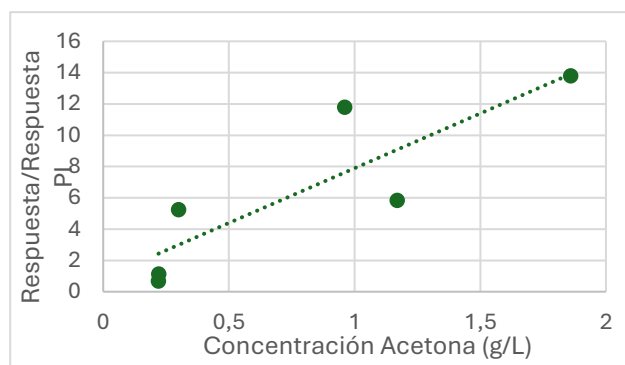


Figura 16. Relación Área Interferente/Área estándar interno con la concentración de acetona en las distintas muestras

A primera vista, los datos experimentales reflejan una tendencia general positiva entre ambas variables: conforme aumenta la concentración de acetona en las muestras, también lo hace la respuesta relativa del ácido crotónico. Este comportamiento sugiere que podría existir una relación directa o indirecta entre la presencia de ácido crotónico y la generación de acetona, lo cual apoya la hipótesis de una posible transformación o producción conjunta.

Se decide que el *Método 4* sea el procedimiento de elección en aquellos casos en el que el análisis de GHB en orinas presente interferencias tras su análisis rutinario en el INTCF empleando el *Método 1*.

Por ello, se considera necesario verificar su capacidad para cuantificar adecuadamente el GHB. Se llevan a cabo una serie de ensayos a distintas concentraciones, concretamente a 5 ppm (correspondiente al límite de cuantificación) y 10 ppm (valor establecido como *cut-off*). Los valores obtenidos se reflejan en la *Tabla 4*.

Tabla 4. Cuantificación de muestras positivas en GHB [5 ppm] con los Métodos 1 y 4

	GHB [5 ppm]		GHB [10 ppm]	
	Método 1	Método 4	Método 1	Método 4
11/04/2025	4,45	4,45	8,25	7,80
14/04/2025	4,67	4,71	11,54	8,00
15/04/2025	4,09	3,96	8,73	8,03
16/04/2025	4,05	4,08	7,94	7,23
23/04/2025	4,49	4,48	7,65	7,46
24/04/2025	4,20	4,31	8,02	7,24
25/04/2025	4,13	4,09	7,77	7,31
02/05/2025	4,31	4,45	7,97	8,28
02/05/2025	4,31	4,26	8,23	7,94
02/05/2025	3,99	3,95	8,13	7,78

Antes de proceder con el análisis estadístico de los resultados, es relevante comentar el caso observado en el control de 10 ppm del 14 de abril. Esta muestra, analizada mediante el *Método 1* (incapaz de separar interferentes endógenos), arroja una cuantificación de 11,54 ppm, mientras que, al ser analizada con el *Método 4* (capaz de discernir el GHB de sus isómeros posicionales), el resultado fue de 8 ppm. Se considera que esta discrepancia podría deberse a la presencia de hidroxibutiratos de origen endógeno en la orina blanca utilizada ese día. Esta hipótesis se ve respaldada al revisar los cocientes iónicos del pico correspondiente a los 11,54 ppm, los cuales no cumplen con los ratios establecidos para una identificación válida de GHB, lo que indica que en dicho pico existe la presencia de un interferente.

Los test estadísticos y las fórmulas aplicadas en esta sección se encuentran desarrollados en el Anexo VI.

El test de Grubbs confirma que no existen valores atípicos en ninguno de los conjuntos de datos analizados para ambas concentraciones. Por otro lado, se aplica una prueba t de Student para dos muestras con el objetivo de comparar las medias de las concentraciones obtenidas empleando ambos métodos, tanto en los controles de GHB a 5 ppm como a 10 ppm. En ambos casos, el valor del estadístico t calculado es inferior al valor crítico tabulado ($t_{\text{calculado}} = -0,047$ y $-1,896$; $t_{\text{tabulado}} = 2,101$). En consecuencia, no se rechaza la hipótesis nula (H_0), lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la cuantificación obtenida con un método o el otro

4.1.2.3 Curvas de calibrado

Tras los estudios realizados se han seleccionado los métodos 1 y 4 para el análisis de las muestras de ahora en adelante. Para ello, ambos deben tener curvas de calibración actualizadas que cumplan con todos los requisitos especificados en los PNT, fijados tras la validación del método en 2023. Tras procesar los datos de las curvas metanólicas cruzadas no extraídas realizadas, se obtiene la *Figura 17*:

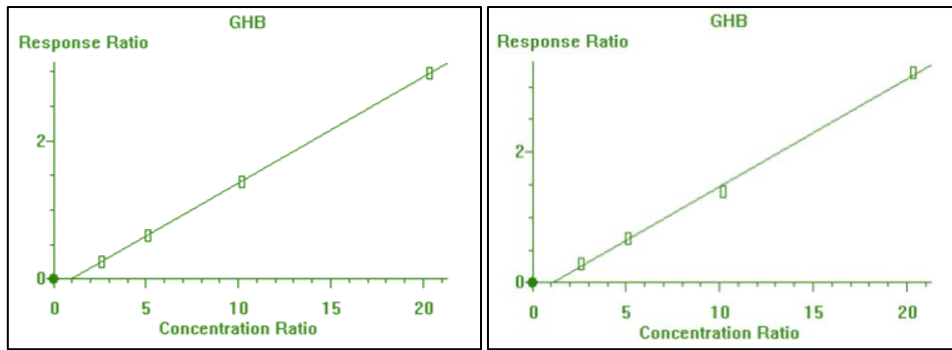


Figura 17. Curva de calibrado realizada con el Método 1 (izquierda) y con el Método 4 (derecha)

Ambas curvas, como refleja la *Tabla 5*, cumplen con los criterios establecidos para validar la curva de calibración: presentan un coeficiente de linealidad superior al 95 %, un coeficiente de correlación mayor a 0,99 y un límite de cuantificación igual o inferior a 5 ppm.

Tabla 5. Criterios para la aceptación de las curvas para el Método 1 y Método 4

	Método 1	Método 4
Coeficiente de linealidad	99,36%	96,24%
Coeficiente de correlación	0,999918	0,997185
Límite de cuantificación	≤ 5 ppm	≤ 5 ppm

Por último, se analizan por ambos métodos los Materiales de Referencia Químicos (MRQ), considerando un rango de aceptabilidad del $\pm 25\%$ respecto al valor nominal. El primer material de referencia presenta un valor teórico de 7,244 ppm, mientras que el segundo corresponde a 12,204 ppm. Ambos son analizados por duplicado utilizando el *Método 1* y el *Método 4*, y los resultados se presentan en la *Tabla 6*.

Tabla 6. Materiales MRQ cuantificados con ambos métodos

	MRQ (-25%)		MRQ (+25%)	
	Método 1	Método 4	Método 1	Método 4
08/05/2025	7,200 ppm	7,120 ppm	10,720 ppm	10,360 ppm
16/05/2025	7,211 ppm	7,078 ppm	11,100 ppm	10,267 ppm

Todos los valores obtenidos se encuentran dentro del rango de aceptabilidad definido por la incertidumbre del 25%, lo cual confirma la adecuada precisión de ambos métodos para la cuantificación de los MRQ. En particular, para el MRQ -25% (7,244 ppm), el rango aceptable va de 5,433 a 9,055 ppm, y para el segundo MRQ +25% (12,204 ppm), de 9,153 a 15,255 ppm. Los resultados de ambos métodos en los dos ensayos se mantienen dentro de dichos márgenes.

Habiendo cumplido todos los criterios establecidos según lo que marcan los PNT del INTCF ambas curvas se consideran válidas para dar resultados fiables de GHB.

4.2 Fase 2 del estudio: *Evaluación del impacto de la concentración del estándar interno en la cuantificación de GHB*

Esta fase tiene como objetivo evaluar, mediante análisis estadístico, el efecto de la reducción de la concentración del estándar interno (GHB-D₆) sobre la cuantificación de GHB en orina en respuesta a problemas de suministro.

En esta sección se presentan los resultados, agrupados en la *Tabla 7*, obtenidos al comparar la cuantificación de GHB en muestras de orina mediante GC-MS, utilizando dos concentraciones diferentes del estándar interno: la establecida durante la validación del método y una reducida a la mitad.

Tabla 7. Áreas, Relación de áreas y cuantificación de muestras empleando concentraciones de 5 ppm y 10 ppm de estándar interno para muestras positivas en GHB con una concentración de 5 ppm (izquierda) y 10 ppm (derecha)

Control de GHB [5 ppm]		Control de GHB [10 ppm]	
PI: 5 ppm	PI: 10 ppm	PI: 5 ppm	PI: 10 ppm
4,65	4,64	8,50	8,30
4,28	4,57	7,97	8,04
4,34	4,40	7,98	7,87
4,43	4,36	7,26	8,08
4,35	4,49	8,17	8,20
4,48	4,57	8,20	8,45
4,70	4,79	7,88	7,79
4,72	4,48	8,14	8,29
4,52	4,68	7,69	8,11
4,71	4,67	7,60	7,98

Los test estadísticos y las fórmulas aplicadas en esta sección se encuentran desarrollados en el Anexo VI.

El test de Grubbs confirma que no existen valores atípicos en ninguno de los conjuntos de datos analizados para ambas concentraciones.

Por otro lado, se aplica una prueba t de Student de dos muestras con el objetivo de comparar las medias obtenidas al emplear dos niveles diferentes de concentración del estándar interno (5 ppm y 10 ppm), tanto en los controles de GHB a 5 ppm como a 10 ppm. En ambos casos, el valor del estadístico t calculado es inferior al valor crítico

tabulado ($t_{\text{calculado}} = -0,691$ y $-1,334$; $t_{\text{tabulado}} = 2,101$). En consecuencia, no se rechaza la hipótesis nula (H_0), lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias obtenidas con las diferentes concentraciones del estándar interno.

Por tanto, ambos enfoques pueden considerarse equivalentes desde el punto de vista estadístico.

4.3 Fase 3 del estudio: *Desarrollo del proceso de extracción de GHB en sangre*

Esta fase se centra en el desarrollo de un procedimiento de extracción de GHB en sangre que sea más eficiente y rápido, abordando las dificultades derivadas de la alta concentración de hematíes y la ausencia de anticoagulante en muestras de sangre blanca, mediante la comparación sistemática de distintos métodos de extracción.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos durante la evaluación de los distintos protocolos de extracción ensayados.

Se observa que los métodos B y D no proporcionan extractos completamente limpios, a diferencia de los métodos A, C y E. Al analizar los extractos en el equipo mediante GC-MS, se detecta que los viales correspondientes a los métodos B, D y E no cuantifican correctamente una muestra de sangre dopada con GHB a una concentración de 10 ppm. En contraste, los viales correspondientes a los métodos A y C muestran una cuantificación adecuada.

Además, se evalúa la influencia del EDTA, empleado como anticoagulante, concluyéndose que su presencia no afecta la cuantificación del GHB. Por lo tanto, con el fin de optimizar el procedimiento y reducir pasos innecesarios, se selecciona el método de extracción C como el más adecuado para la determinación de GHB en muestras de sangre.

Una vez seleccionado el protocolo de extracción más eficiente, se aplica a un total de 20 muestras de sangre dopadas: 10 con una concentración de 10 ppm de GHB y 10 con 20 ppm. En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos para cada grupo, con

el objetivo de evaluar si los extractos permiten cuantificar adecuadamente la cantidad de GHB añadida.

Tabla 8. Resultados de la cuantificación, tras la extracción en sangre según el protocolo C, de distintas muestras dopadas con GHB

Control [10 ppm]	Control [20 ppm]
10,95	18,81
10,31	18,56
10,53	18,43
10,83	19,99
10,85	19,10
10,81	18,69
10,16	19,83
10,41	19,83
10,85	19,91
10,60	17,89

Los test estadísticos y las fórmulas aplicadas en esta sección se encuentran desarrollados en el Anexo VI.

El test de Grubbs confirmó que no existen valores atípicos en ninguno de los conjuntos de datos analizados para ambas concentraciones.

Para el control de 10 ppm, se obtuvo una media de 10,63 ppm ($\pm 0,27$), y para el de 20 ppm, una media de 19,10 ppm ($\pm 0,74$). En ambos casos, los valores se encuentran dentro del intervalo de aceptación considerando una incertidumbre, según lo establecido durante la validación, del 23 % ([7,70–12,30] para 10 ppm y [15,40–24,60] para 20 ppm). Por lo tanto, se considera que el procedimiento de extracción aplicado permite obtener un extracto adecuadamente cuantificable.

4.4 Fase 4 del estudio: *Determinación de valores umbral para la interpretación de resultados en muestras blanco de sangre*

Con el fin de cumplir el objetivo adicional de determinar valores umbral (por debajo de la cual se podría confirmar como contaminación) para sustancias que aparecen en blancos en sangre, se han procesado los resultados de 30 muestras de sangre blanca analizadas con dos equipos GC-MS de simple cuadrupolo y un equipo triple cuadrupolo.

Los datos iniciales, obtenidos a partir de muestras sin derivatizar, permitieron construir el diagrama que se presenta a continuación.

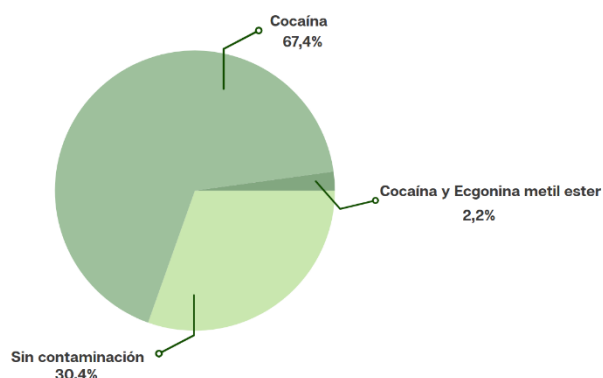


Figura 18. Frecuencia de detección de contaminantes en sangre blanca en muestras sin derivatizar

El diagrama de la *Figura 18* indica que el 67,4% de los blancos contenían únicamente cocaína, mientras que un 2,2% presentaron también ecgonina metil éster, uno de sus metabolitos principales⁴⁶. Por otro lado, el 30,4% de las muestras no mostraron señales de contaminación. En los casos positivos para cocaína, la concentración media fue $0,053 \pm 0,028$ ppm, mientras que la detección de ecgonina metil éster fue cualitativa.

Tras derivatizar las muestra, se analizan mediante un equipo GC-MS de simple cuadrupolo y uno de triple cuadrupolo. Con los resultados se construye el diagrama de la *Figura 19*.

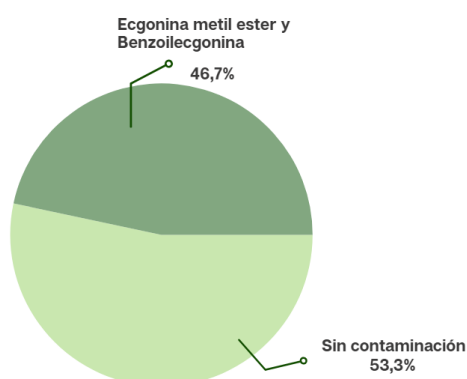


Figura 19. Frecuencia de detección de contaminantes en sangre blanca en muestras derivatizadas

El procesamiento de los datos revela que un 53,3% de las muestras analizadas no presentó contaminación detectable. En el 46,7% restante contenía ecgonina metil éster (EME) y benzoilecgonina (BE), otro de los metabolitos de la cocaína⁴⁶. Mientras que el

análisis de EME fue de carácter cualitativo, el de benzoilecgonina (BE) permitió su cuantificación, con una concentración media de $0,0069 \pm 0,0021$ ppm. Si bien la formación de EME puede atribuirse a la degradación de la muestra, la detección de BE es inusual, dado que su formación se produce principalmente in vivo o bien por una reacción de hidrólisis⁴⁶. La detección de los metabolitos de la cocaína representa un desafío, ya que constituye uno de los parámetros fundamentales para emitir un resultado positivo en el análisis toxicológico.

5. CONCLUSIONES

El presente trabajo ha permitido optimizar significativamente el procedimiento analítico empleado en el INTCF para la detección y cuantificación de GHB en matrices biológicas.

Se ha demostrado que el principal compuesto interferente en el análisis de GHB mediante GC-MS es el ácido crotónico, generado por la deshidratación térmica de los isómeros BHB y AHB. La creación de un nuevo método cromatográfico (*Método 4*), que incluye los iones característicos del ácido crotónico, ha permitido separar y detectar correctamente esta interferencia, mejorando la especificidad del análisis.

El análisis estadístico ha evidenciado que no existen diferencias significativas en los resultados obtenidos al emplear la mitad de la concentración del estándar interno respecto la establecida durante la validación. Esta conclusión permite optimizar el uso del reactivo y mitigar los efectos de posibles problemas de suministro sin comprometer la fiabilidad del método.

Se ha desarrollado un protocolo eficiente y reproducible para la extracción de GHB en sangre blanca, superando las limitaciones del método anterior. El método fue seleccionado por su simplicidad, limpieza del extracto y capacidad de cuantificación adecuada. El análisis estadístico ha evidenciado que los resultados de cuantificación de GHB en las muestras dopadas analizadas entra dentro del rango de aceptación.

El análisis de muestras blanco ha permitido establecer concentraciones de referencia para descartar contaminaciones exógenas, fortaleciendo la validez de los resultados en contextos judiciales.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Tedeschi, L., Carai, M. A., Frison, G., Favretto, D., Colombo, G., Ferrara, S. D., & Gessa, G. L. (2003). Endogenous gamma-hydroxybutyric acid is in the rat, mouse and human gastrointestinal tract. *Life sciences*, 72(22), 2481–2488. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00143-7](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00143-7)
- ² Mamelak, M., Scharf, M. B., & Woods, M. (1986). Treatment of narcolepsy with gamma-hydroxybutyrate. A review of clinical and sleep laboratory findings. *Sleep*, 9(1 Pt 2), 285–289. <https://doi.org/10.1093/sleep/9.1.285>
- ³ White C. M. (2017). Pharmacologic, Pharmacokinetic, and Clinical Assessment of Illicitly Used γ -Hydroxybutyrate. *Journal of clinical pharmacology*, 57(1), 33–39. <https://doi.org/10.1002/jcph.767>
- ⁴ Schep, L. J., Knudsen, K., Slaughter, R. J., Vale, J. A., & Mégarbane, B. (2012). The clinical toxicology of gamma-hydroxybutyrate, gamma-butyrolactone and 1,4-butanediol. *Clinical Toxicology*, 50(6), 458–470. <https://doi.org/10.3109/15563650.2012.702218>
- ⁵ Felmlee, M. A., Morse, B. L., & Morris, M. E. (2021). γ -Hydroxybutyric Acid: Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Toxicology. *The AAPS journal*, 23(1), 22. <https://doi.org/10.1208/s12248-020-00543-z>
- ⁶ International Narcotics Control Board. (s.f.). *Green List: List of psychotropic substances under international control*. United Nations. <https://www.incb.org/incb/en/psychotropics/green-list.html>
- ⁷ Trombley, T. A., Capstick, R. A., & Lindsley, C. W. (2020). DARK Classics in Chemical Neuroscience: Gamma-Hydroxybutyrate (GHB). *ACS chemical neuroscience*, 11(23), 3850–3859. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.9b00336>
- ⁸ Busardò, F. P., & Jones, A. W. (2015). GHB pharmacology and toxicology: acute intoxication, concentrations in blood and urine in forensic cases and treatment of the withdrawal syndrome. *Current neuropharmacology*, 13(1), 47–70. <https://doi.org/10.2174/1570159X13666141210215423>
- ⁹ Carter, L. P., Chen, W., Wu, H., Mehta, A. K., Hernandez, R. J., Ticku, M. K., Coop, A., Koek, W., & France, C. P. (2005). Comparison of the behavioral effects of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and its 4-methyl-substituted analog, gamma-hydroxyvaleric acid (GHV). *Drug and alcohol dependence*, 78(1), 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2004.10.002>
- ¹⁰ Dufayet, L., Bargel, S., Bonnet, A., Boukerma, A. K., Chevallier, C., Evrard, M., Guillotin, S., Loeuillet, E., Paradis, C., Pouget, A. M., Reynoard, J., & Vaucel, J. A. (2023). Gamma-hydroxybutyrate (GHB), 1,4-butanediol (1,4BD), and gamma-butyrolactone (GBL)

intoxication: A state-of-the-art review. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 142, 105435. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2023.105435>

¹¹ Dziadosz, Marek. (2016). Isomer detection on the basis of analyte adduct formation with the components of the mobile phase and tandem mass spectrometry. *Arabian Journal of Chemistry*. 12. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.06.005>

¹² Paul, R., Tsanaclis, L., Kingston, R., Berry, A., & Guwy, A. (2006). GC-MS-MS determination of gamma-hydroxybutyrate in blood and urine. *Journal of analytical toxicology*, 30(6), 375–379. <https://doi.org/10.1093/jat/30.6.375>

¹³ Steuer, A. E., Raeber, J., Simbuerger, F., Dornbierer, D. A., Bosch, O. G., Quednow, B. B., Seifritz, E., & Kraemer, T. (2021). Towards Extending the Detection Window of Gamma-Hydroxybutyric Acid-An Untargeted Metabolomics Study in Serum and Urine Following Controlled Administration in Healthy Men. *Metabolites*, 11(3), 166. <https://doi.org/10.3390/metabo11030166>

¹⁴ Blanco-Ces, M., de-Castro-Rios, A., Lopez-Rabuñal, A., Cobo-Golpe, M., Cruz, A., & Lendoiro, E. (2025). Rapid Analytical Method for Quantification of Gamma-Hydroxybutyrate (GHB) in Hair by UPLC-MS/MS. *Drug testing and analysis*, 17(6), 903–914. <https://doi.org/10.1002/dta.3798>

¹⁵ Steuer, A. E., Sutter, L., Steuer, C., & Kraemer, T. (2023). New gamma-hydroxybutyric acid (GHB) biomarkers: Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of GHB amino acid, carnitine, and fatty acid conjugates in urine. *Drug testing and analysis*, 15(4), 426–443. <https://doi.org/10.1002/dta.3430>

¹⁶ Shima, N., Miki, A., Kamata, T., Katagi, M., & Tsuchihashi, H. (2005). Urinary endogenous concentrations of GHB and its isomers in healthy humans and diabetics. *Forensic science international*, 149(2-3), 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.05.017>

¹⁷ Saudan, C., Augsburger, M., Kintz, P., Saugy, M., & Mangin, P. (2005). Detection of exogenous GHB in blood by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry: Implications in postmortem toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, 29(8), 777–781. <https://doi.org/10.1093/jat/29.8.777>

¹⁸ Mercer, J., Shakleya, D., & Bell, S. (2006). Applications of ion mobility spectrometry (IMS) to the analysis of gamma-hydroxybutyrate and gamma-hydroxyvalerate in toxicological matrices. *Journal of analytical toxicology*, 30(8), 539–544. <https://doi.org/10.1093/jat/30.8.539>

¹⁹ Busardò, F. P., Bertol, E., Vaiano, F., Baglio, G., Montana, A., Barbera, N., Zaami, S., & Romano, G. (2014). Post mortem concentrations of endogenous gamma hydroxybutyric

acid (GHB) and in vitro formation in stored blood and urine samples. *Forensic science international*, 243, 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.07.019>

²¹ Chagas, A. G. d. R., Simas, D. L. R., Gomes, M. B., Ribeiro, J. M. M., Cassella, R. J., & Monteiro, M. (2019). Determination of γ -hydroxybutyric acid and its positional isomers in beverages using GC-MS and a new sample preparation approach based on aqueous two-phase systems. *Talanta*, 194, 576–584. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.050>

²⁴ Bertol, E., Argo, A., Procaccianti, P., Vaiano, F., Di Milia, M. G., Furlanetto, S., & Mari, F. (2012). Detection of gamma-hydroxybutyrate in hair: validation of GC-MS and LC-MS/MS methods and application to a real case. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 70, 518–522. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.07.009>

²⁵ Dahl, S. R., Olsen, K. M., & Strand, D. H. (2012). Determination of γ -hydroxybutyrate (GHB), β -hydroxybutyrate (BHB), pregabalin, 1,4-butane-diol (1,4BD) and γ -butyrolactone (GBL) in whole blood and urine samples by UPLC-MSMS. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 885-886, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.12.009>

²⁶ Bertol, E., Mari, F., Vaiano, F., Romano, G., Zaami, S., Baglìo, G., & Busardò, F. P. (2015). Determination of GHB in human hair by HPLC-MS/MS: Development and validation of a method and application to a study group and three possible single exposure cases. *Drug testing and analysis*, 7(5), 376–384. <https://doi.org/10.1002/dta.1679>

²⁷ Blair, S., Song, M., Hall, B., & Brodbelt, J. (2001). Determination of gamma-hydroxybutyrate in water and human urine by solid phase microextraction-gas chromatography/quadrupole ion trap spectrometry. *Journal of forensic sciences*, 46(3), 688–693

²⁸ *Xyrem (sodium oxybate) prescribing information*. (2015). Jazz Pharmaceuticals. Palo Alto, CA.

²⁹ Andresen, H., Aydin, B.E., Mueller, A., Iwersen-Bergmann, S., 2011. An overview of gamma-hydroxybutyric acid: pharmacodynamics, pharmacokinetics, toxic effects, addiction, analytical methods, and interpretation of results. *Drug Test. Anal.* 3, 560–568. <https://doi.org/10.1002/dta.254>

³⁰ Nicholson, K.L., Balster, R.L., 2001. GHB: a new and novel drug of abuse. *Drug Alcohol Depend.* 63, 1–22. [https://doi.org/10.1016/S0376-8716\(00\)00191-5](https://doi.org/10.1016/S0376-8716(00)00191-5)

³¹ Waszkielewicz, A., Bojarski, J., 2004. Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and its chemical modifications: a review of the GHBergic system. *Pol. J. Pharmacol.* 56, 43–49.

³² Okun, M. S., Boothby, L. A., Bartfield, R. B., & Doering, P. L. (2001). GHB: an important pharmacologic and clinical update. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: a*

publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, *Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*, 4(2), 167–175.

³³ Borgen, L. A., Okerholm, R., Morrison, D., & Lai, A. (2003). The influence of gender and food on the pharmacokinetics of sodium oxybate oral solution in healthy subjects. *Journal of clinical pharmacology*, 43(1), 59–65. <https://doi.org/10.1177/0091270002239707>

³⁵ Busardò, F. P., & Jones, A. W. (2019). Interpreting γ -hydroxybutyrate concentrations for clinical and forensic purposes. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 57(3), 149–163. <https://doi.org/10.1080/15563650.2018.1519194>

³⁶ Zörntlein, S. W., Kopp, A., Becker, J., Kaufmann, T. J., Röhrich, J., & Urban, R. (2012). In vitro production of GHB in blood and serum samples under various storage conditions. *Forensic science international*, 214(1-3), 113–117. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.07.030>

³⁷ McMaster, M. C. (2007). *GC/MS: A practical user's guide*. Wiley-Interscience.

⁴⁰ Katherine Cashen, Tara Petersen; Diabetic Ketoacidosis. *Pediatr Rev* August 2019; 40 (8): 412–420. <https://doi.org/10.1542/pir.2018-0231>

⁴¹ Bashir, B., Fahmy, A. A., Raza, F., & Banerjee, M. (2021). Non-diabetic ketoacidosis: a case series and literature review. *Postgraduate medical journal*, 97(1152), 667–671. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-138513>

⁴² Midtlyng, L., Høiseth, G., Luytkis, H., Kristoffersen, L., Le Nygaard, I., Strand, M. C., Arnestad, M., & Vevelstad, M. (2021). Relationship between betahydroxybutyrate (BHB) and acetone concentrations in postmortem blood and cause of death. *Forensic science international*, 321, 110726. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110726>

⁴⁵ Hanson, P. J., & Carrington, J. M. (1981). Activity of 3-oxo acid CoA-transferase, D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase, hexokinase and carnitine palmitoyltransferase in the stomach and small and large intestine of the rat. *The Biochemical journal*, 200(2), 349–355. <https://doi.org/10.1042/bj2000349>

⁴⁶ Roque Bravo, R., Faria, A. C., Brito-da-Costa, A. M., Carmo, H., Mladěnka, P., Dias da Silva, D., Remião, F., & On Behalf Of The Oeonom Researchers (2022). Cocaine: An Updated Overview on Chemistry, Detection, Biokinetics, and Pharmacotoxicological Aspects including Abuse Pattern. *Toxins*, 14(4), 278. <https://doi.org/10.3390/toxins14040278>

⁴⁷ Learn Statistics Easily. (2020). Obtenido de Qué es: la prueba de Grubbs: <https://es.statisticseasily.com/glosario/%C2%BFQu%C3%A9-es-la-prueba-deGrubbs%3F/>

⁴⁸ Statistics How To. (2025). Obtenido de T Test (Student's T-Test): Definition and Examples.

ANEXOS

ANEXO I

Referencia	Técnica	Matriz	Derivatización	Extracción
12	GC-MS-MS	Sangre y orina	BSTFA	LLE
24	GC-MS / LC-MS/MS	Pelo	TMS	LLE
25	UPLC-MS-MS	Sangre y orina	No	No
26	HPLC-MS/MS	Pelo	No	LLE
27	GC-MS	Agua y orina	Hexil Cloroformiato	SPME
17	GC-C-IRMS	Sangre y orina	TMS	LLE
11	GC-MS-MS / LC-MS	Sin especificar	Sin especificar	Sin especificar
13	LC-MS	Suero y orina	TMS	No especificado
14	UPLC-MS/MS	Pelo	No	LLE
15	LC-MS/MS	Orina	Sin especificar	Sin especificar

ANEXO II

Condiciones cromatográficas utilizadas en los estudios que sirvieron de base para las primeras rampas de temperatura ensayadas con el objetivo de separar la interferencia del GHB. Ambos estudios están referenciados en la bibliografía del presente trabajo.

Chagas et al., 2019

Columna capilar VF-17 ms (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) y helio como gas portador a un flujo constante de 1 mL/min, inyección en modo *splitless* (1 µL, a 280 °C) y un programa de temperatura de horno que comienza en 40 °C (1 min), seguido de rampas sucesivas a 60 °C (10 °C/min, 1 min), 100 °C (4 °C/min) y finalmente 300 °C (40 °C/min, 1 min), con una temperatura de interfaz de 300 °C. La detección se lleva a cabo mediante ionización por impacto electrónico a 70 eV en modo *full-SCAN* (m/z 50–300), para luego aplicar modo SIM sobre los iones más representativos.

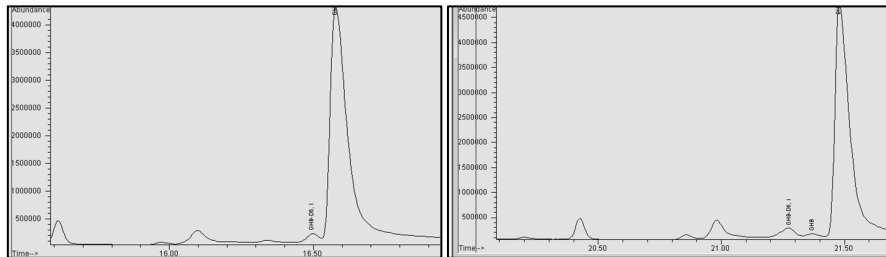
Richard et al., 2006

Columna Varian Factor IV (15 m × 0,25 mm, 0,25 µm), utilizando helio como gas portador y una estrategia de derivatización con BSTFA. Las condiciones cromatográficas incluyen inyección en modo *splitless* a 280 °C, y un programa de temperatura de columna que

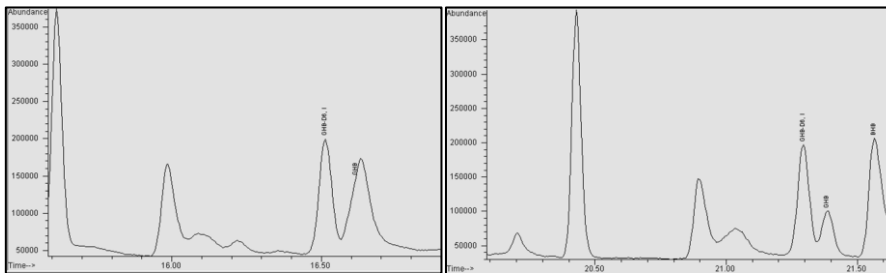
comienza en 60 °C durante 2 minutos, se incrementa a 180 °C a una velocidad de 20 °C/min y luego a 250 °C a 50 °C/min, con un tiempo total de análisis de 9,4 minutos.

ANEXO III

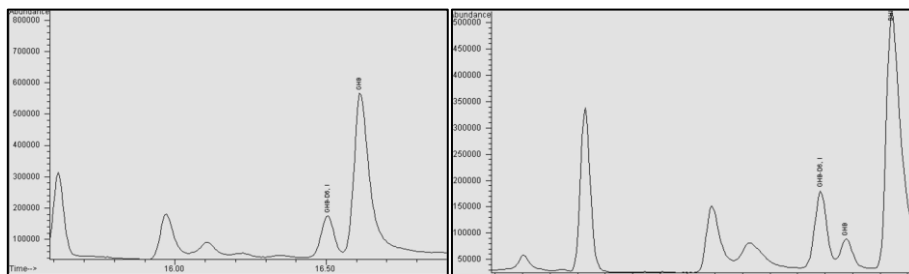
Muestra 1



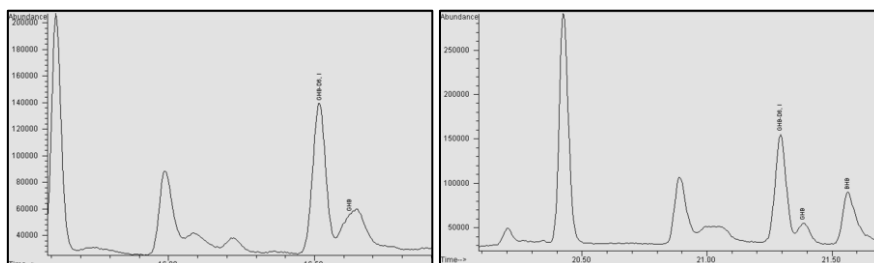
Muestra 2



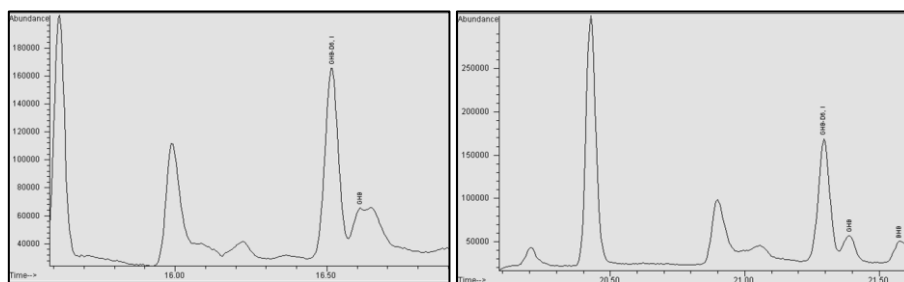
Muestra 3



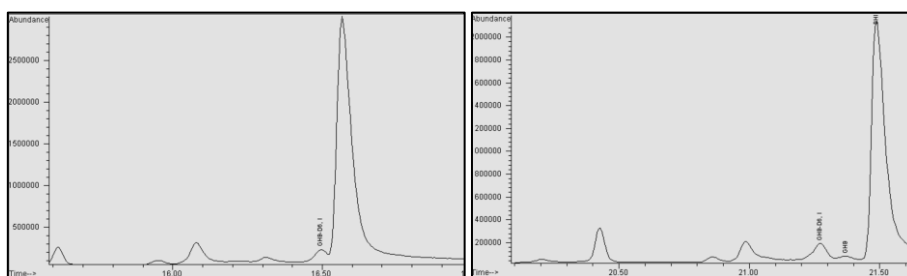
Muestra 4



Muestra 5

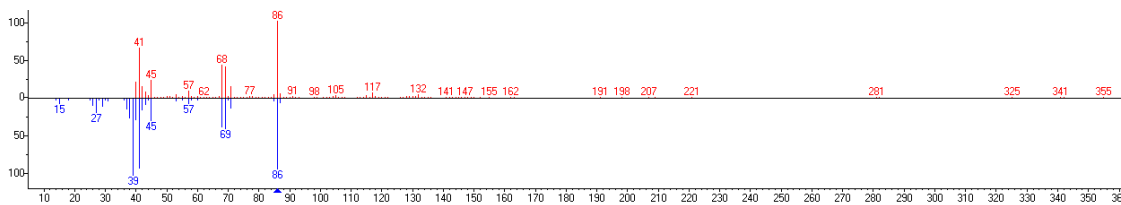


Muestra 6

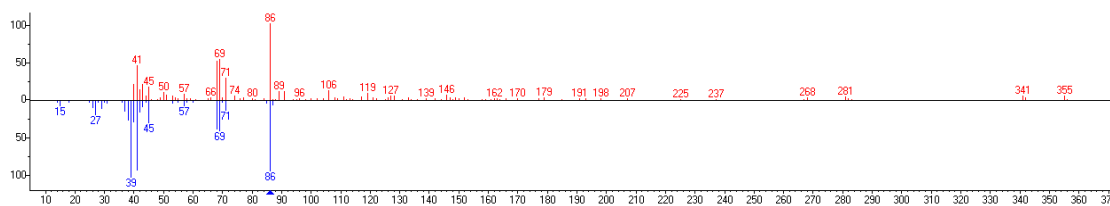


ANEXO IV

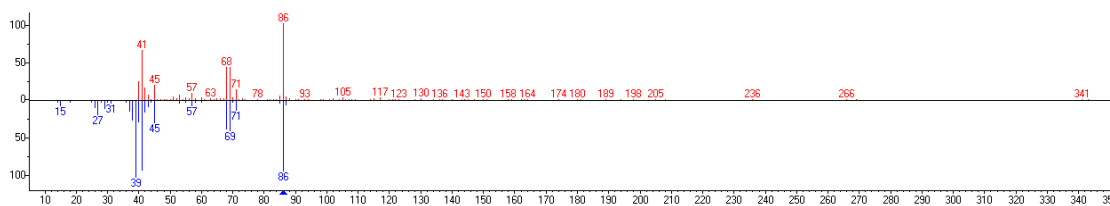
Muestra 1



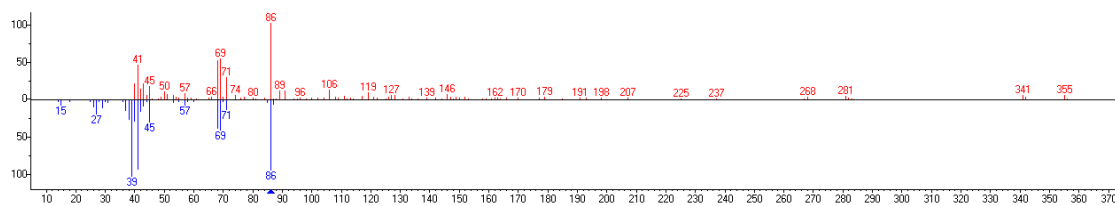
Muestra 2



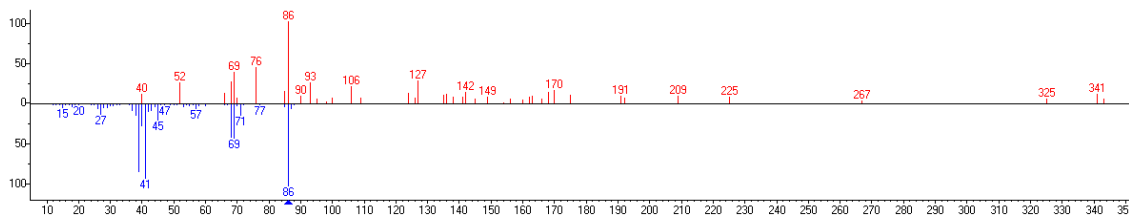
Muestra 3



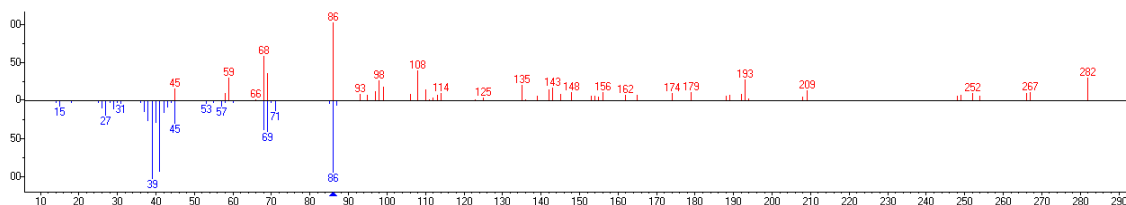
Muestra 4



Muestra 5

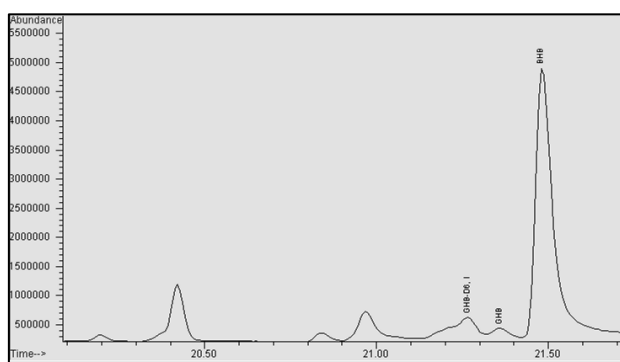


Muestra 6

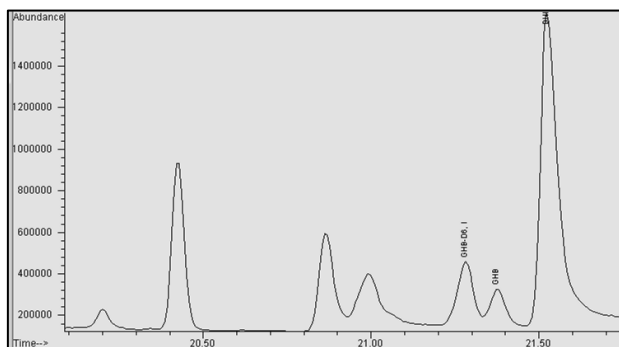


ANEXO V

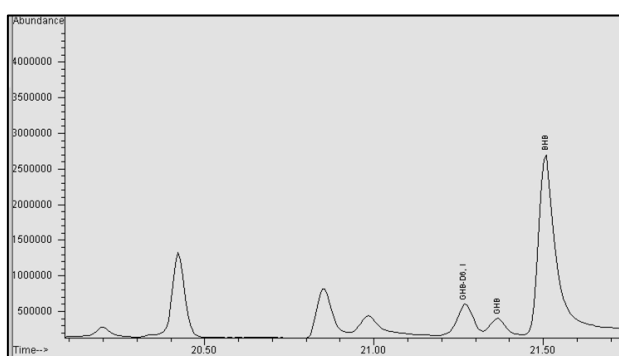
Muestra 1



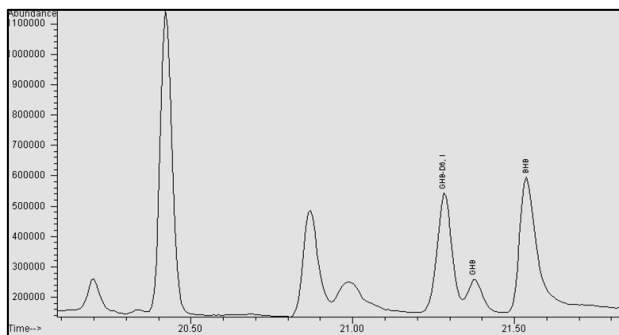
Muestra 2



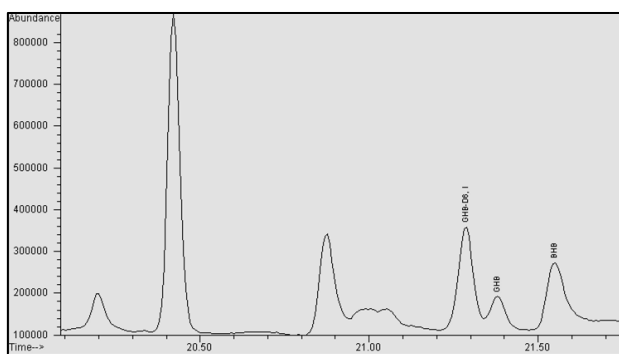
Muestra 3



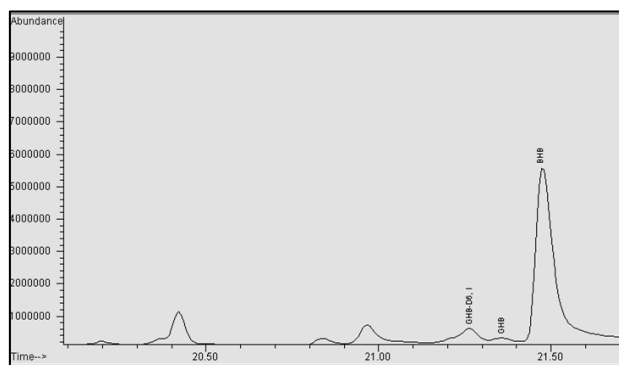
Muestra 4



Muestra 5



Muestra 6



ANEXO VI

Test de Grubbs

Esta prueba es un método estadístico utilizado para detectar valores atípicos, entendiendo estos como datos que se desvían significativamente del resto del conjunto de datos. Para poder realizar esta prueba los datos deben tener una distribución normal y ser datos univariados⁴⁷.

Para el valor más alto de la distribución se emplea G_{max} de la Ecuación 1 mientras que para el menor se emplea la G_{min} .

$$G_{max} = \frac{|X_{max} - \bar{X}|}{s} \quad G_{min} = \frac{|X_{min} - \bar{X}|}{s}$$

Ecuación 1. Test de Grubbs para discernir valores aberrantes

Leyenda de la Ecuación 1:

- X_{max} → valor máximo del conjunto de datos
- X_{min} → valor mínimo del conjunto de datos
- \bar{X} → media muestral

Si G_{max} o G_{min} exceden el valor del valor tabulado de la tabla de distribución de Grubbs para un determinado nivel de significancia, X_{max} o X_{min} se consideran valores aberrantes o *outliers* y son descartados del conjunto⁴⁷.

Test T de Student de dos muestras

Este método estadístico se emplea para diferenciar las medias de dos grupos y permite evaluar si existen diferencias significativas entre las medias de dos métodos. Se asume

como H_0 que las medias son iguales y se compara el valor t con el valor crítico (distribución t de dos colas, $\alpha = 0,05$) para decidir si hay diferencia significativa⁴⁸:

$$t_{cal} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Ecuación 2. Estadístico t para la comparación de medias de dos muestras independientes con varianzas iguales y desviación estándar agrupada para dos muestras independientes

Siendo n el número de réplicas del método y \bar{x} las medias. Si el valor t calculado es menor que el valor crítico o tabulado, no se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se concluye que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias. Por el contrario, si el valor absoluto de t calculado es mayor que el valor crítico, se rechaza H_0 y se concluye que sí existen diferencias significativas⁴⁸.