



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI



**MASTER EN GENÉTICA, FÍSICA Y QUÍMICA FORENSE**

**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

**2024/2025**

**Determinación de Tetrahidrocannabinol y su  
metabolito principal en sangre mediante GC-  
MS/MS: adaptación y actualización de la  
validación 2024**

**Paula Vázquez Gándara**

**Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses**

**Tutora INTCF: Tamara Khazooz del Castillo**

**Tutora URV: Marta Calull Blanch**

Gracias a Tamara y Marta por todo lo que me habéis enseñado, por vuestra paciencia infinita y por haberme tratado siempre con tanta cercanía. A Maite, por estar ahí siempre que lo he necesitado, sin dudar ni un segundo en ofrecer su ayuda. A mis dos Claudias, por ser ese refugio en los días de caos, por escucharme, por compartir risas y tantos momentos que han hecho este camino más fácil y más bonito. A mi familia, por hacer posible que siga formándome en lo que me apasiona, por su apoyo constante y por estar siempre. También a mis amigas, que pese a la distancia, siempre tuvieron una palabra de aliento cuando más la necesitaba. Y a Pablo, que ha sido hogar, compañía y calma cuando más lo necesitaba.

## RESUMEN

El  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC) es el principal compuesto psicoactivo del cannabis, y su determinación en sangre es fundamental en contextos forenses. Este trabajo presenta la validación de un método analítico para la cuantificación simultánea de THC y de su metabolito inactivo, el ácido 11-nor-9-carboxi- $\Delta^9$ -THC (THC-COOH), en sangre, empleando extracción en fase sólida (SPE) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS).

Se verificaron curvas de calibrado elaboradas previamente con patrones certificados, y se aprovecharon ensayos anteriores junto con nuevos controles para la estimación de la incertidumbre en todo el rango de trabajo. Además, se preparó y verificó una nueva curva de calibrado, demostrando la reproducibilidad de la metodología. También se optimizó la etapa de derivatización, confirmando que el uso exclusivo de BSTFA permite una adecuada sensibilidad sin comprometer la selectividad.

El método validado mostró una buena linealidad ( $R^2 > 0,99$ ), con límites de cuantificación de 3 ng/mL para THC y 10 ng/mL para THC-COOH, y límites de detección de 1 ng/mL y 8 ng/mL, respectivamente. Las incertidumbres expandidas asociadas fueron del 28 % para el THC y del 19 % para el THC-COOH. En conjunto, estos resultados, junto con la estabilidad de las curvas de calibrado a largo plazo, confirman la robustez del método desarrollado y su idoneidad para su aplicación rutinaria en laboratorios de análisis toxicológico.

## ABSTRACT

$\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC) is the main psychoactive compound in cannabis, and its determination in blood is essential in forensic contexts. This study presents the validation of an analytical method for the simultaneous quantification of THC and its inactive metabolite, 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -THC (THC-COOH), in blood, using solid-phase extraction (SPE) followed by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS).

Calibration curves previously prepared with certified reference standards were verified, and both prior experiments and new quality controls were used to estimate measurement uncertainty across the working range. Additionally, a new calibration curve was prepared and validated, confirming the reproducibility of the procedure. The derivatization step was also optimized, showing that the exclusive use of BSTFA provides adequate sensitivity without compromising analytical selectivity.

The validated method demonstrated good linearity ( $R^2 > 0.99$ ), with quantification limits of 3 ng/mL for THC and 10 ng/mL for THC-COOH, and detection limits of 1 ng/mL and 8 ng/mL, respectively. The expanded uncertainties associated with the method were 28% for THC and 19% for THC-COOH. Overall, these results—together with the long-term stability of the calibration curves—confirm the robustness of the proposed method and its suitability for routine application in forensic toxicology laboratories.

# INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>INDICE</b> .....	<b>5</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Contexto y relevancia del análisis de THC y THCCOOH.....	1
1.2 Farmacocinética .....	2
1.3 Procedimiento analítico .....	3
1.4 Validación de un método analítico .....	5
1.5 Estudio de blancos en matrices biológicas .....	9
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
<b>3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>10</b>
3.1 Reactivos, materiales .....	10
3.2 Instrumentación analítica .....	11
3.3 Preparación de estándares y reactivos .....	11
3.4 Dopaje de las muestras de sangre .....	12
3.5 Pretratamiento de la muestra .....	12
3.6 Extracción en fase sólida (SPE).....	12
3.7 Ensayo previo de optimización del medio de derivatización .....	13
3.8 Procedimiento de derivatización seleccionado .....	14
3.9 Condiciones instrumentales de análisis por GC-MS/MS.....	14
3.10 Preparación de una nueva curva de calibrado.....	16
3.11 Estudio de blancos .....	17
<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>18</b>
4.1 Verificación de la estabilidad de las curvas de calibrado .....	18
4.2 Análisis comparativo de condiciones de derivatización.....	19
4.3 Estimación de la incertidumbre del método.....	23
4.4 Documentación para la validación.....	25
4.5 Curva de calibrado .....	25
4.6 Evaluación de los límites de detección y cuantificación .....	27
4.7 Estudio de blancos .....	29
<b>5 CONCLUSIONES</b> .....	<b>31</b>
<b>6 BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>32</b>
<b>7 ANEXOS</b> .....	<b>34</b>

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Contexto y relevancia del análisis de THC y THCCOOH

El THC (Figura 1) es el principal componente psicoactivo del cannabis, sustancia que se obtiene principalmente de la planta *Cannabis sativa*. Desde un punto de vista estructural, se trata de un compuesto carbocíclico formado por 21 átomos de carbono, de naturaleza altamente lipofílica e hidrófoba. Esta elevada lipofilia favorece su distribución a tejidos adiposos, donde puede acumularse y liberarse lentamente, prolongando su presencia en el organismo y diferenciándolo de otras sustancias psicoactivas<sup>1,2</sup>

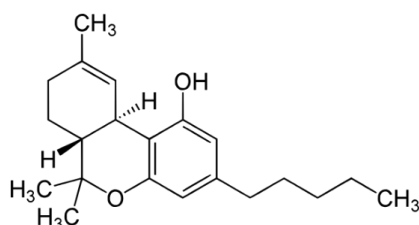


Figura 1. Estructura molecular del THC

Desde el punto de vista toxicológico y forense, el interés en el análisis de THC radica en su rápida metabolización tras su consumo. El metabolismo hepático del THC da lugar tanto a metabolitos activos como inactivos, siendo el más abundante el ácido 11-nor-9-carboxi- $\Delta^9$ -THC (THC-COOH), un derivado inactivo que aparece en concentraciones más elevadas que el THC y persiste en el organismo durante un tiempo más prolongado. A nivel interpretativo, la detección de THC en sangre se asocia con un consumo reciente debido a su corta vida media, mientras que la detección de THC-COOH indica una exposición anterior, ya que este metabolito se forma a los pocos minutos del consumo y alcanza su concentración máxima entre los 30 y 60 minutos posteriores<sup>2</sup>.

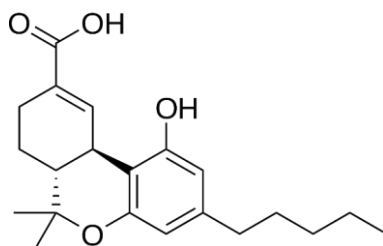


Figura 2. Estructura molecular del THC-COOH

En términos de distribución sanguínea, las concentraciones plasmáticas de THC suelen ser superiores a las halladas en sangre, debido a su baja afinidad por los glóbulos rojos y su tendencia a unirse a proteínas plasmáticas como lipoproteínas y albúmina. En consumidores crónicos, tanto el THC como sus metabolitos pueden persistir durante días, liberándose lentamente desde los depósitos acumulados en el tejido adiposo.

En el contexto legal, la detección y cuantificación de THC en sangre es de especial relevancia en casos relacionados con la seguridad vial, imputabilidad penal o decisiones sobre custodia, entre otros. La presencia de los compuestos psicoactivos en sangre (THC y 11-OH-THC) permite considerar que el sujeto se encontraba bajo los efectos de la droga, en el momento de la toma de la muestra<sup>2</sup>.

Además del THC, la planta de cannabis contiene otros cannabinoides como el cannabinoil (CBN) o el cannabidiol (CBD), con un impacto en términos psicoactivos considerablemente menor<sup>1</sup>. Algunos, como el CBD, se han incorporado al desarrollo de productos legales con fines terapéuticos, como por ejemplo el Sativex®, para el tratamiento de la espasticidad en pacientes con esclerosis múltiple. Aunque estos productos contienen bajos niveles de THC, su consumo puede generar concentraciones detectables en sangre, dificultando la interpretación toxicológica. En estos casos, la determinación del metabolito inactivo THC-COOH resulta fundamental, ya que su presencia confirma que ha tenido lugar un proceso metabólico tras la absorción del THC<sup>2,3</sup>.

## 1.2 Farmacocinética

La farmacocinética del THC, así como sus efectos psicoactivos, dependen tanto del modo de consumo como de la vía de administración empleada. La fase de absorción es especialmente relevante, ya que condiciona la rapidez con la que el compuesto alcanza el sistema nervioso central. Mediante inhalación, las concentraciones plasmáticas pueden superar los 50 ng/mL en los primeros 15 min y alcanzar hasta 200 ng/mL tras el consumo de cigarrillos con alta concentración de THC<sup>4,5</sup>.

Debido a su elevada lipofilia, el THC se distribuye con rapidez a tejidos grasos y musculares, lo que provoca un descenso acusado de su concentración en sangre. La vida

media de esta fase de distribución es inferior a 60 minutos, y concentraciones superiores a 5 ng/mL son poco comunes pasado ese tiempo<sup>4</sup>.

Tras su absorción, el THC sufre un proceso de metabolización hepática en dos etapas principales, catalizadas por enzimas del citocromo P450. En la primera, se forma 11-OH-THC, un metabolito intermedio con actividad psicoactiva; en la segunda, este se oxida a THC-COOH, un derivado inactivo que, como se ha mencionado anteriormente, puede permanecer en el organismo durante varios días<sup>6</sup>.

El THC-COOH se conjuga posteriormente con ácido glucurónico y se elimina principalmente por vía urinaria, o en menor medida por las heces. En consumidores habituales, este metabolito puede detectarse en orina hasta 17–25 días después del consumo. Aunque la vida media de eliminación terminal del THC oscila entre 3 y 13 días, sus concentraciones en sangre descienden rápidamente, situándose por debajo de 2 ng/mL pocas horas después del consumo. Por ello, la detección de niveles superiores a este umbral en sangre se considera indicativa de un consumo reciente<sup>4</sup>.

## 1.3 Procedimiento analítico

### 1.3.1 Pretratamiento de la muestra

En la etapa previa a la extracción en fase sólida (SPE), se deben añadir patrones internos deuterados, compuestos que presentan una estructura similar a la de los analitos pero con átomos de deuterio en lugar de hidrógeno, que permiten una cuantificación más precisa al corregir posibles variaciones en la inyección. Para minimizar el efecto de la matriz, en esta etapa se aplican técnicas físicas como la sonicación, que rompe las proteínas presentes en la sangre, y la centrifugación, que separa los residuos sólidos y facilita la recuperación de un sobrenadante más limpio.

### 1.3.2 Extracción en fase sólida (SPE)

La SPE es una técnica empleada para preparar y purificar muestras de forma rápida y selectiva antes del análisis cromatográfico. En este trabajo, se utilizaron cartuchos con un sorbente de modo mixto que combina una fase apolar C8 y un grupo de intercambio aniónico fuerte (SAX), lo que permite retener compuestos con propiedades tanto

apolares como aniónicas. Con el objetivo de favorecer la retención de ambos analitos, se decidió emplear un tampón a pH 6. A este pH, el THC ( $pK_a \approx 10,6$ ) se encuentra en forma neutra y apolar, lo que favorece su interacción con la fase C8, y el THC-COOH ( $pK_a \approx 4,2$ ) se encuentra en su forma ionizada (con carga negativa), permitiendo su retención en la fase SAX.

La primera etapa de la SPE es el acondicionamiento, que tiene como objetivo eliminar cualquier impureza que pueda quedar del proceso de fabricación y activa su superficie para promover la interacción del analito. Este paso se realiza en dos fases: primero, se aplica un disolvente orgánico como el metanol; luego, una disolución similar a la matriz de la muestra, generalmente el tampón del pretratamiento, para crear un entorno químico comparable al de la muestra y evitar alteraciones en el pH del entorno del sorbente.

La segunda etapa es la carga de la muestra, durante la cual los analitos quedan retenidos en el sorbente, mientras que las interferencias con propiedades químicas distintas son eliminadas.

La tercera etapa corresponde al lavado, donde se utilizan uno o varios disolventes seleccionados para eliminar selectivamente especies interferentes sin arrastrar los analitos retenidos.

Finalmente, en la etapa de elución, se emplean disolventes capaces de romper las interacciones entre los analitos y el sorbente. Para la elución del THC, se requiere una mezcla de disolventes apolares, mientras que para el THC-COOH, se necesita una mezcla de mayor polaridad y con carácter ácido, que permita debilitar las interacciones iónicas del metabolito con la fase SAX del sorbente<sup>7</sup>.

### 1.3.3 Derivatización

Dado que la cromatografía de gases implica temperaturas elevadas, existe el riesgo de que el THC-COOH se descarboxile térmicamente y se convierta en THC durante el análisis. Este fenómeno podría dar lugar a una interpretación incorrecta de los resultados. Para eliminar esta problemática, en el laboratorio se realiza previamente una derivatización química empleando reactivos de tipo trimetilsilano. Este procedimiento

transforma el compuesto original en un derivado más estable y no reactivo frente al calor, lo que permite preservar la integridad de los analitos durante la inyección y el análisis cromatográfico<sup>2</sup>.

#### 1.3.4 Cuantificación de THC y del THC-COOH mediante GC-MS/MS

Se utilizó un GC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo en modo de adquisición MRM (Multiple Reaction Monitoring). Este modo permite monitorizar transiciones específicas entre un ión precursor y uno o varios iones producto, lo que garantiza una detección altamente selectiva y sensible. Los compuestos se ionizan mediante ionización por impacto electrónico (EI) y se fragmentan para ser analizados en tres cuadrupolos consecutivos: Q1 actúa como filtro, seleccionando los iones precursores según su relación masa-carga ( $m/z$ ); Q2, o celda de colisión, induce la fragmentación de los iones mediante colisiones con un gas inerte; Q3 analiza los fragmentos generados, proporcionando una señal específica para cada compuesto<sup>8,9</sup>.

### 1.4 Validación de un método analítico

La norma ISO/IEC 17025 define la validación como la “confirmación, a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto”. Es esencial para demostrar que un procedimiento es adecuado y que proporciona resultados fiables, exactos y reproducibles.

Dado que este trabajo corresponde a la segunda fase del proceso de validación, a continuación, se describen únicamente los parámetros analíticos evaluados en esta etapa, junto con la metodología empleada para su estudio y los criterios considerados para su interpretación.

#### 1.4.1 Verificación de la curva de calibrado

Para evaluar la adecuación de una curva de calibrado, es necesario analizar materiales de referencia o patrones certificados empleando dicha curva y comprobar si los valores obtenidos son compatibles con los valores asignados. Para ello, puede emplearse el índice de compatibilidad (IC), una herramienta estadística que mide la cercanía del valor del laboratorio al valor de referencia, considerando las incertidumbres de ambos. El IC se calcula con la ecuación 1:

$$IC = \frac{|V_{lab} - V_{ref}|}{\sqrt{I_{lab}^2 + I_{ref}^2}} \quad (1)$$

donde  $V_{lab}$  es el valor experimental,  $V_{ref}$  el valor de referencia,  $I_{lab}$  la incertidumbre del método empleado y  $I_{ref}$  la incertidumbre asociada al material de referencia.

Según este criterio, se considera que los resultados son compatibles con el valor real cuando el índice de compatibilidad es menor o igual a 1 (Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, 2024)<sup>10</sup>.

### 1.4.2 Cálculo de la incertidumbre

El método de cálculo de incertidumbre empleado consiste en considerar todo el proceso como una “caja negra” en la que se introducen valores de referencia y se observa la variabilidad final de la respuesta. Como estimación de la dispersión del resultado, se emplea la incertidumbre expandida (U), que se calcula multiplicando la incertidumbre combinada ( $U_{comb}$ ) por el valor t de Student correspondiente a un nivel de significancia  $\alpha=0,05$  y un número determinado de grados de libertad (gl):

$$U = U_{comb} \cdot t_{\alpha,gl} \quad (2)$$

La incertidumbre combinada se calcula con la siguiente fórmula:

$$U_{comb} = \sqrt{U_{patrón}^2 + U_{media}^2 + U_{repro}^2 + U_{CORR}^2} \quad (3)$$

donde cada término representa las incertidumbres individuales implicadas:  $U_{patrón}$  debida al valor de referencia,  $U_{media}$  debida a la determinación del valor medio y  $U_{repro}$  debida a la reproducibilidad del método. Si el valor de IC fuera mayor que 2 (apartado 1.7.1) podemos pensar que existen diferencias estadísticamente significativas que no se corrigen entre el valor obtenido y debemos contemplar una cuarta componente en el cálculo de la incertidumbre, la incertidumbre corregida<sup>11</sup>

En la Tabla 1 se muestran las fórmulas de cada una de las incertidumbres individuales:

Tabla 1. Fórmulas de las componentes de la incertidumbre combinada

Fórmulas	Variables
$U_{patrón} = \frac{I}{k}$	I: incertidumbre del valor de referencia k: constante de multiplicación (k=2)
$U_{media} = \frac{S_{VM}}{\sqrt{n}}$	$S_{VM}$ : desviación estándar del valor medio N: número de réplicas
$U_{repro} = \frac{S_{VM}}{\sqrt{n_M}}$	$n_M$ : número de repeticiones por muestra
$U_{CORR} = \frac{V_M - V_R}{\sqrt{3}}$	$V_R$ : valor de referencia $V_M$ : valor de la media

### 1.4.3 Linealidad

La linealidad se define como la “capacidad de obtener resultados proporcionales a la concentración del analito en un intervalo determinado”<sup>12</sup>.

Para evaluar este parámetro, la curva de calibrado debe construirse con un mínimo de 3 concentraciones, siendo recomendable seis niveles que cubran el rango de trabajo a validar. La preparación de los puntos de calibración debe realizarse a partir de materiales de referencia o patrones que presenten incertidumbres o intervalos de confianza conocidos. Para estimar la linealidad, se expresará como coeficiente de linealidad (Cm)<sup>13</sup>:

$$Cm = \left(1 - \frac{S_m}{m}\right) \cdot 100 \quad (4)$$

Siendo m la pendiente y  $S_m$  su desviación estándar. Según los criterios establecidos por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (2019), para validar un método de ensayo, el coeficiente de linealidad ha de ser superior al 95% para métodos de ensayo.

Además, otro indicador de la calidad del ajuste lineal es el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Este valor se obtiene directamente al representar la curva de calibrado y calcular la regresión lineal. Un valor de  $R^2$  igual o superior a 0,99 se considera indicativo de una buena correlación entre la concentración del analito y la señal obtenida.

#### 1.4.4 Límite de cuantificación y límite de detección

El límite de detección (LD) se define como “la concentración mínima que puede distinguirse del ruido de fondo con un determinado grado de confianza”. Su estimación depende del análisis de matrices en blanco y la relación entre la señal y el ruido.

La relación señal/ruido (S/N) se refiere a la proporción entre la señal del analito en una muestra y la señal del ruido de fondo, obtenida a partir de una muestra blanca de la misma matriz, en este caso, sangre. De forma general, se acepta que para considerar una señal como detectable, debe cumplirse una relación mínima señal/ruido de 3:1<sup>14</sup>.

En cuanto al límite de cuantificación (LC), este se refiere al “valor mínimo que se puede cuantificar en una muestra con niveles aceptables de exactitud y precisión”<sup>12</sup>. A nivel instrumental, se considera que para que una señal sea cuantificable, debe alcanzar una relación señal/ruido mínima de 10:1.

#### 1.4.5 Tratamiento estadístico: comparación de métodos analíticos

En la validación y optimización de métodos analíticos, es común aplicar herramientas estadísticas que permitan comparar resultados obtenidos bajo diferentes condiciones experimentales. En este trabajo se utilizaron dos pruebas:

##### *El test de Fisher:*

Sirve para evaluar si existen diferencias significativas entre las varianzas de dos conjuntos de datos. Para ello, se plantean dos hipótesis: la hipótesis nula ( $H_0$ ) afirma que las varianzas son iguales ( $s_1^2 = s_2^2$ ) y la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) que las varianzas no son iguales ( $s_1^2 \neq s_2^2$ )<sup>15</sup>.

Para poder aceptar o rechazar la hipótesis nula, es necesario comparar el valor crítico de la distribución F de dos colas, utilizando un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$  y grados de libertad en función del número de réplicas por grupo (n-1), con el valor F calculado como el cociente entre el cuadrado de las varianzas:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (5)$$

donde  $s_1^2$  representa la varianza más grande. Para la interpretación del resultado, si el valor F calculado supera el valor crítico ( $\alpha = 0,05$ ), se rechaza la hipótesis nula.

### Test t de Student para muestras independientes

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 significativa:

$$t_{cal} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{s^2 \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (6)$$

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad (7)$$

siendo n el número de réplicas del método y  $\bar{x}$  las medias. Si el valor t calculado es menor que el valor crítico, se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ )<sup>16</sup>.

## 1.5 Estudio de blancos en matrices biológicas

El análisis de muestras en matrices biológicas, requiere un control de posibles fuentes de contaminación que puedan comprometer la validez de los resultados. Es por eso que, durante los análisis rutinarios de muestras judicializadas, se prepara un blanco el cual es sometido al mismo procedimiento analítico, actuando como control negativo.

Dado que en algunos de estos blancos se detectaron señales correspondientes a ciertas sustancias, se decidió llevar a cabo un estudio más detallado con el objetivo de determinar la frecuencia de aparición de estos contaminantes e identificarlos.

## 2 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es la validación de un método analítico para la cuantificación de THC y THCCOOH en sangre mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS). Para completar dicha validación, se procede a estimar la incertidumbre analítica del método y a elaborar la documentación correspondiente, lo que incluye la actualización del Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT) y el registro de resultados en el formulario establecido por el Departamento de Calidad del INTCF.

Como parte de los objetivos complementarios, se plantea elaborar una nueva curva de calibrado y verificar su validez mediante el análisis de materiales certificados.

Asimismo, se busca optimizar la etapa de derivatización comparando dos estrategias, con el objetivo de mejorar la respuesta analítica. También se pretende mejorar la sensibilidad del método reduciendo el límite de detección del THC-COOH y el límite de cuantificación del THC.

Finalmente, se propone realizar un estudio de blancos con el objetivo de identificar la posible presencia de contaminantes en la matriz empleada y establecer umbrales orientativos en función de las concentraciones detectadas.

### 3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Reactivos, materiales

##### 3.1.1 Reactivos

Patrones T-003 Ceriliant (-)- $\Delta^9$ -THC-D<sub>3</sub> 1000 mg/L y T-003 Ceriliant ( $\pm$ )-11-nor-carboxi- $\Delta^9$ -THC-D<sub>3</sub> 1000 mg/L (Lipomed); patrones de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC) 1000 mg/L y de 11-nor-9-carboxi- $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC-COOH) 1000 mg/L (Logical LGC); material certificado DCT-C SE (ACQ Science GmbH) y DOA-I VB high (Medichem); metanol (PanReac AppliChem); tampón acetato de sodio 0,1M (pH = 6); hexano (PanReac AppliChem); acetato de etilo (Scharlau); ácido acético glacial (PanReac AppliChem); N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida - 1% tetrametilsilano (Sigma-Aldrich).

##### 3.1.2 Materiales

Micropipetas automáticas (Rainin); material de vidrio de laboratorio (vasos de precipitados, probetas y matraces aforados); tubos de vidrio y de plástico de centrifuga de volumen 10 mL; viales; insertos de vial; cartuchos HF Elut-Certify II 200 mg (Agilent Technologies).

## 3.2 Instrumentación analítica

Equipo de extracción Manifold (Waters); baño de ultrasonidos (J.P Selecta); centrifuga (Hettich EBA 20); agitador de tubos vórtex (Fisherbrand); evaporador por corriente de nitrógeno (Pierce); Cromatógrafo GC-MS triple cuadrupolo (Agilent Technologies).

## 3.3 Preparación de estándares y reactivos

Las soluciones estándar de THC 1mg/mL y THCCOOH 1 mg/mL utilizadas para la fortificación directa de la sangre, estaban almacenadas a -23 °C.

Las soluciones de los patrones internos THC-D<sub>3</sub> 10mg/L y THCCOOH-D<sub>3</sub> 10mg/L, se prepararon de la siguiente forma: se disolvió una ampolla de 1 mL del patrón certificado (1000 mg/L en metanol) en un matraz aforado de 100 mL, enrasando con metanol, lo que dio lugar a una disolución de 10 mg/L.

El tampón acetato de sodio 0,1M (pH= 6) y la mezcla BSTFA-1% TMS empleada como derivatizante, fueron preparadas por el personal del laboratorio y almacenadas a 8 °C.

Las soluciones de los patrones internos THC-D<sub>3</sub> 10mg/L y THCCOOH-D<sub>3</sub> 10mg/L, se prepararon de la siguiente forma: se disolvió una ampolla de 1 mL del patrón certificado (1000 mg/L en metanol) en un matraz aforado de 100 mL, enrasando con metanol, lo que dio lugar a una disolución de 10 mg/L.

Las disoluciones empleadas en la etapa de elución de la SPE fueron preparadas diariamente para evitar el riesgo de concentración por evaporación o contaminación de los disolventes. Las mezclas se prepararon siguiendo los siguientes procedimientos:

- Hexano: acetato de etilo 95:5 (eluyente 1). Se midieron 95 mL de hexano y 5 mL de acetato de etilo empleando una probeta y se trasvasaron a un frasco de vidrio donde se homogeneizó antes de su utilización.
- Hexano: acetato de etilo 75:25 + 1% ácido acético glacial (eluyente 2). Se miden 75 mL de hexano y 25 mL de acetato de etilo en una probeta y se transfiere a un frasco de vidrio. Tras homogeneizar, se desecha 1mL de la mezcla y se añade 1 mL de ácido acético glacial.

### 3.4 Dopaje de las muestras de sangre

La sangre utilizada como matriz biológica ha sido proporcionada por bancos de sangre, previamente verificada como libre de THC y THCCOOH, con el fin de evitar interferencias endógenas y garantizar la validez de los resultados.

Para la preparación de las muestras dopadas empleadas en los distintos ensayos, se prepararon disoluciones intermedias con una concentración diez veces superior a la que se deseaba obtener finalmente en la muestra. De este modo, añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de la disolución intermedia a 900  $\mu\text{L}$  de sangre control, se alcanza un volumen final de 1 mL de sangre dopada con la concentración objetivo. Este procedimiento se aplicó en todos los experimentos realizados exceptuando la preparación de los patrones certificados DCT-C y DOA-I:

- DCT-C: se trata de un patrón certificado en polvo que se reconstituye en 2,5 mL de agua desionizada, con concentraciones de 50 ng/mL de THC y de 100 ng/mL de THC-COOH.
- DOA-I: patrón certificado en polvo que se reconstituye igualmente en 2,5 mL de agua desionizada y que contiene 15 ng/mL de THC y 120 ng/mL de THC-COOH.

### 3.5 Pretratamiento de la muestra

En primer lugar, se toma 1 mL de la sangre dopada en un tubo y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de las soluciones de patrón interno correspondientes a THC-D<sub>3</sub> y THCCOOH-D<sub>3</sub>. Posteriormente, se agitan en un vortex y se añaden 2 mL de tampón acetato. Tras volver a agitar, se sonica durante 10 minutos en un baño de ultrasonidos y, seguidamente, se centrifugan a 4000 rpm durante 10 minutos. Se puede observar la formación de un precipitado depositado en el fondo del tubo.

### 3.6 Extracción en fase sólida (SPE)

Primero se prepara el equipo de extracción Manifold: se colocan los tubos de recogida, las llaves y los cartuchos SPE.

Una vez hecho el montaje, se procede con el acondicionamiento de los cartuchos, dejando pasar 2 mL de metanol seguidos de 2 mL de tampón acetato sódico pH = 6.

Ambos disolventes deben pasar gota a gota a través del cartucho y sin dejar que se seque.

Tras el acondicionamiento, se procede a la carga de la muestra. Se trasvasa el contenido de las muestras de sangre dopadas al interior del cartucho. Las proteínas precipitadas quedan adheridas al fondo del tubo de vidrio, mientras que el sobrenadante atraviesa el sorbete permitiendo la retención del analito en la fase estacionaria del cartucho.

Sin dejar que el cartucho se seque tras la carga de la muestra, se realiza un lavado mediante la adición de 2 mL de tampón acetato sódico pH = 6. A continuación, se deja secar el cartucho empleando vacío durante 40 minutos. Transcurrido este tiempo, se añaden 100 µL de hexano para eliminar posibles interferencias de naturaleza apolar.

Para la etapa de elución, se sustituyen los tubos de recogida utilizados durante las etapas previas por unos tubos de vidrio limpios y se realizan dos eluciones consecutivas con disolventes de distinta composición. En primer lugar, se añaden 3 mL de una disolución de hexano: acetato de etilo 95:5 (v/v) que tiene como objetivo la elución del THC. Seguidamente, se realiza una segunda elución añadiendo 3 mL de una disolución hexano: acetato de etilo 75:25 + 1% ácido acético con la cual se consigue la elución del THCCOOH.

Una vez finalizada la SPE, los extractos obtenidos se evaporaron a sequedad mediante corriente de N<sub>2</sub>. La reconstitución del extracto seco se estudia en el Apartado 3.7.

### 3.7 Ensayo previo de optimización del medio de derivatización

Se llevó a cabo un estudio comparativo entre el uso exclusivo de 50 µL de BSTFA y la mezcla habitual de 50 µL de acetato de etilo con 50 µL de BSTFA como medio de reconstitución. Este ensayo se realizó antes de comenzar la validación formal del método, y permitió definir las condiciones finales que se aplicarían posteriormente en las muestras control y en la curva de calibrado.

Para ello, se diseñaron dos ensayos en los que se fortificó sangre blanca con diferentes concentraciones de THC y THCCOOH:

- Ensayo A: las muestras se doparon con 3 ng/mL de THC y 10 ng/mL de THCCOOH, concentraciones correspondientes al límite de cuantificación (LOQ).

- Ensayo B: se emplearon concentraciones más bajas, de 1 ng/mL de THC y 8 ng/mL de THCCOOH, que corresponden al límite de detección (LOD).

### 3.8 Procedimiento de derivatización seleccionado

A partir de los resultados obtenidos en el estudio comparativo, se estableció como condición final de derivatización el uso de 60 µL de BSTFA, sin disolvente adicional, que fue empleada en la preparación de todas las muestras control y puntos de la curva de calibrado. Se emplea un ligero exceso para asegurar la derivatización completa, especialmente en muestras con concentraciones elevadas de analito. Posteriormente se incubó a 60°C durante 90 minutos.

### 3.9 Condiciones instrumentales de análisis por GC-MS/MS

Para el análisis de las muestras, se emplea un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas triple-cuadrupolo marca Agilent Technologies.

En la Tabla 2, se detallan las condiciones cromatográficas empleadas, incluyendo las características de la columna, el programa de temperaturas del horno, el gas portador y los parámetros del inyector.

Tabla 2. Características y condiciones cromatográficas del GC-MS/MS

Parámetro	Condición				
Columna	HP-5 (5 % fenil-metilpolisiloxano), 30 m × 0,25 mm I.D. × 0,25 µm film				
Gas portador	Helio, con flujo constante de 3,3 mL/min				
Temperatura del inyector	250 °C, en modo <i>splitless</i>				
Volumen de inyección	1 µL				
Condiciones del horno		Rate (°C/min)	Tª (°C)	Hold time	Run time
	Inicial		120	1	1
	Rampa 1	40	230	2	5,75
	Rampa 2	40	300	1,5	9

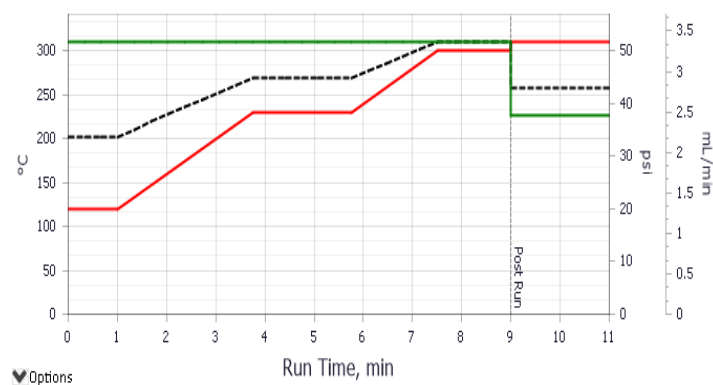


Figura 3. Programa de temperatura del horno (línea roja), flujo del gas portador (línea verde) y presión del sistema (línea negra discontinua).

Una vez establecidas las condiciones del cromatógrafo de gases, se definieron los parámetros específicos del espectrómetro de masas. El análisis se realizó en modo MRM (Multiple Reaction Monitoring), seleccionando las transiciones más representativas para cada analito y su correspondiente patrón interno deuterado.

Para cada compuesto, se seleccionaron tres transiciones: una para cuantificación (transición principal) y otras dos para identificación (transiciones secundarias).

Tabla 3. Transiciones de cada compuesto

Compuesto	Transiciones	
	Ion precursor	Ion producto
THC	386,0	371,0
	386,0	343,0
	371	289,0
THC-D <sub>3</sub>	374,0	292,0
	389,0	373,0
	389,0	346,0
THC-COOH	371,0	73,0
	473,0	355,0
	488,0	371,0
THC-COOH-D <sub>3</sub>	374,0	73,0
	476,0	358,0
	491,0	374,0

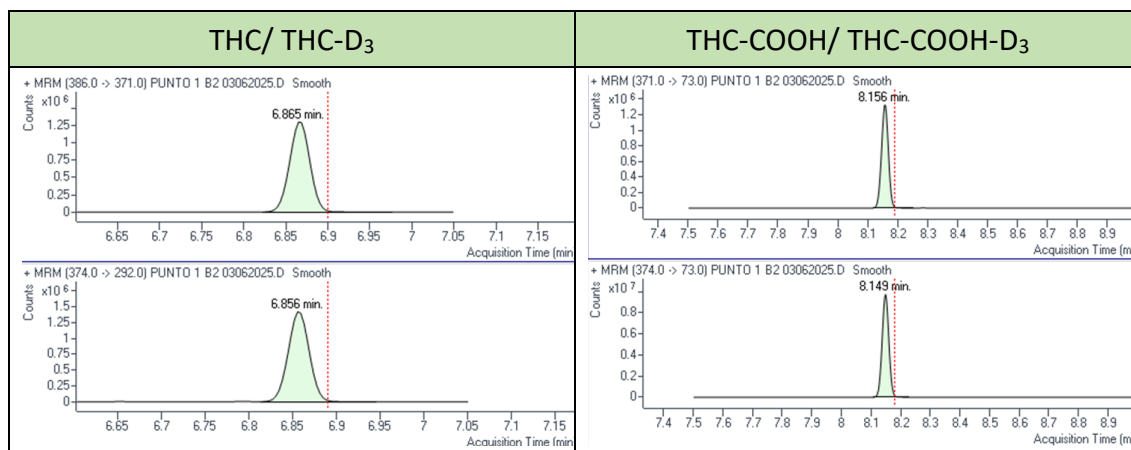


Figura 4. Cromatogramas correspondientes a THC y THC-D<sub>3</sub> (izquierda) y THC-COOH y THC-COOH-D<sub>3</sub> (derecha)

En la Figura 4 se muestra el pico cromatográfico correspondiente a la transición principal del analito (imagen superior) y del patrón interno (imagen inferior), cuyas áreas son las que se emplean para su cuantificación. Esta cuantificación se realiza mediante la relación entre el área del analito y el área del patrón interno, aplicando la ecuación de la curva de calibrado, siendo 'b' la pendiente y 'a' la ordenada al origen:

$$[THC] = \frac{Area\ THC\ (386 \rightarrow 371)}{Area\ THC - D_3\ (374 \rightarrow 292)} \times b + a \quad (8)$$

$$[THC - COOH] = \frac{Area\ THC - COOH\ (371 \rightarrow 73)}{Area\ THC - COOH - D_3\ (374 \rightarrow 73)} \times b + a \quad (9)$$

Además, se registraron los tiempos de retención correspondientes para cada analito y su patrón interno, los cuales se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Tiempos de retención de cada compuesto

Compuesto	t <sub>R</sub> (min)
THC	6,865
THC-D <sub>3</sub>	6,856
THC-COOH	8,156
THC-COOH-D <sub>3</sub>	8,149

### 3.10 Preparación de una nueva curva de calibrado

Se preparó una nueva curva debido al agotamiento de los estándares deuterados anteriores y la necesidad de utilizar nuevas soluciones patrón. Para ello, se partió de dos patrones certificados de THC y THC-COOH de 1000 mg/L. A partir de ellos, se prepararon

disoluciones intermedias individuales de 10 mg/L para cada analito. Posteriormente, se preparó una disolución hija conjunta con una concentración de 1 mg/L, a partir de la cual se elaboraron los estándares correspondientes de la curva de calibrado.

Las concentraciones de los 8 puntos de calibración fueron: 250, 125, 62,5, 31,25, 15,6, 3,9 y 1,95 ng/mL. El punto más concentrado se preparó añadiendo 500 µL de la disolución hija (1 mg/L) y 1500 µL de MeOH. El resto de los puntos se obtuvieron mediante diluciones seriadas, mezclando 1 mL de la disolución anterior con 1 mL de metanol. Los 8 estándares se prepararon por duplicado y se analizan por GC-MS dos veces por réplica.

A cada tubo se adicionaron posteriormente 100 µL de los patrones internos (THC-D<sub>3</sub> y THC-COOH-D<sub>3</sub>), se evaporó el disolvente bajo corriente de nitrógeno y se procedió a la derivatización añadiendo 60 µL de BSTFA. La reacción se llevó a 60 °C durante 90 minutos.

### 3.11 Estudio de blancos

Se analizaron 30 muestras de blancos de sangre preparadas por el equipo de Técnicos de Laboratorio del INTCF a lo largo de 2025. En una primera etapa, se reconstituyeron en 60 µL de metanol y se inyectaron en tres equipos distintos: un GC-MS de triple cuadrupolo (GC-MS/MS) y dos equipos de GC-MS de cuadrupolo simple (GC-MS). Posteriormente, las muestras se analizaron tras derivatización: se evaporaron en estufa, se reconstituyeron con 60 µL de BSTFA-TMS al 1 % y se llevaron a 60 °C durante 1 hora y 30 minutos. Estas muestras derivatizadas se inyectaron en dos equipos distintos: uno de triple cuadrupolo y otro de cuadrupolo simple.

Por motivos de confidencialidad institucional, no se pueden incluir los parámetros específicos de análisis empleados por el INTCF.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Verificación de la estabilidad de las curvas de calibrado

Antes de llevar a cabo los ensayos detallados a continuación, se inyectaron patrones certificados de THC y THC-COOH con el fin de comprobar que las curvas de calibración anteriores seguían siendo válidas<sup>17</sup>. La correcta cuantificación permitió confirmar su estabilidad a lo largo del tiempo. Este resultado sugiere que el método puede mantenerse calibrado durante largos periodos sin necesidad de generar nuevas curvas, lo cual aporta robustez al procedimiento analítico y da lugar a un menor consumo de reactivos y patrones.

Tabla 5. Valores experimentales de THC empleando material de referencia

Material de referencia	Valor real (ng/mL)	Valores experimentales (ng/mL)					Media	IC
		Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5		
DOA-I	15 ± 0,5	16,08	15,29	12,98	14,00	13,54	14,38	0,15
DCT-C	50 ± 12,8	46,13	43,88	37,23	40,18	38,85	41,25	0,53

Tabla 6. Valores experimentales de THC-COOH empleando material de referencia

Material de referencia	Valor real (ng/mL)	Valores experimentales (ng/mL)					Media	IC
		Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5		
DCT-C	100 ± 25	101,57	108,30	104,60	105,98	97,79	103,65	0,11
DOA-I	120 ± 3	127,13	135,56	130,93	132,66	122,40	129,74	0,39

Como se puede observar en las Tabla 5 y Tabla 6, el valor del índice de compatibilidad (IC) es inferior a 1. Por lo tanto, se puede concluir que no existen diferencias significativas entre los valores reales y los experimentales, lo que indica que los resultados obtenidos son estadísticamente compatibles.

## 4.2 Análisis comparativo de condiciones de derivatización

Con el objetivo de simplificar el procedimiento y mejorar la eficiencia de la derivatización, se llevó a cabo un estudio comparativo entre dos condiciones distintas de derivatización: por un lado, la combinación de 50 µL de BSTFA con 50 µL de acetato de etilo, y por otro, la derivatización empleando únicamente 50 µL de BSTFA.

Para ello, se realizaron extracciones en sangre trabajando con las concentraciones correspondientes al límite de cuantificación (ensayo A) y al límite de detección (ensayo B) del método. Estos valores han sido establecidos en ensayos realizados en fases anteriores de la validación (Anexos).

### 4.2.1 Ensayo A

En el caso del límite de cuantificación, se prepararon muestras de sangre dopadas con 3 ng/mL de THC y 10 ng/mL de THC-COOH, a partir de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 7. Valores de concentración de THC 3 ng/mL utilizando BSTFA y la mezcla de BSTFA y acetato de etilo como medio de reconstitución.

	[THC] (ng/mL) MEZCLA	A <sub>THC</sub> MEZCLA	[THC] (ng/mL) BSTFA	A <sub>THC</sub> BSTFA
A-1	3,60	7725	3,81	14007
A-2	3,51	7838	4,19	11436
A-3	3,79	11217	3,53	20249
A-4	3,39	7620	3,70	10874
A-5	3,70	7431	4,49	14138
A-6	4,05	7641	3,47	10804
A-7	4,49	6481	4,29	15692
A-8	4,75	8821	4,15	16206
A-9	3,64	3324	4,27	17078
A-10	4,68	8325	4,02	13060
Media	3,96 ± 0,50		3,99 ± 0,35	

Tabla 8. Resultados del análisis estadístico comparando BSTFA vs. mezcla BSTFA/acetato de etilo (THC 3 ng/mL)

Comparación	Test estadístico	Valor calculado	Valor tabulado	Interpretación
Varianzas	Test de Fisher (F)	F = 2,108	F = 3,179	No hay diferencias significativas
Medias	Test t (independiente)	t = 0,171	t = 2,101	No hay diferencias significativas

Tabla 9. Valores de concentración de THC-COOH 10 ng/mL utilizando BSTFA y la mezcla de BSTFA y acetato de etilo como medio de reconstitución

	[THC-COOH] (ng/mL) MEZCLA	A <sub>THC-COOH</sub> MEZCLA	[THC-COOH] (ng/mL) BSTFA	A <sub>THC-COOH</sub> BSTFA
A-1	8,5	37474	8,8	79979
A-2	9,0	46601	8,5	65658
A-3	8,8	59992	10,2	114700
A-4	10,3	48836	9,6	65445
A-5	10,9	43336	8,7	73367
A-6	11,2	44715	11,2	60556
A-7	10,8	29383	11,0	76036
A-8	11,7	40153	10,1	72522
A-9	11,2	18021	10,8	78922
A-10	11,2	39079	11,4	65788
Media	10,4 ± 1,2		10,0 ± 1,1	

Tabla 10. Resultados del análisis estadístico comparando BSTFA vs. mezcla BSTFA/acetato de etilo (THC-COOH 10 ng/mL)

Comparación	Test estadístico	Valor calculado	Valor tabulado	Interpretación
Varianzas	Test de Fisher (F)	F = 1,117	F = 3,179	No hay diferencias significativas
Medias	Test t (independiente)	t = 0,669	t = 2,101	No hay diferencias significativas

Como se recoge en las Tabla 8 y Tabla 10, los resultados obtenidos para el THC y el THC-COOH mediante ambos métodos de derivatización no mostraron diferencias

estadísticamente significativas. En ambos casos, tanto el valor de F calculado como el valor de t resultaron inferiores a sus respectivos valores críticos para un nivel de significancia del 5 %. Esto indica que no existen diferencias significativas entre los métodos evaluados, por lo que pueden emplearse indistintamente para la cuantificación de ambos analitos en este rango de concentración. Además, como se observa en las Tablas 7 y 9, el uso exclusivo de BSTFA proporciona una mayor respuesta analítica.

#### 4.2.2 Ensayo B

En el caso del límite de detección, se trabajó con muestras de sangre fortificadas con 1 ng/mL de THC y 8 ng/mL de THCCOOH.

Dado que en este rango se opera por debajo del límite de cuantificación, no resulta adecuado utilizar concentraciones como parámetro de comparación, donde el método no garantiza precisión ni exactitud en los valores obtenidos. Por ello, se ha optado por comparar las áreas del analito respecto al patrón interno (área del analito / área del patrón interno), tal como se muestra en la Tabla 11 y en la Tabla 13.

*Tabla 11. Valores de concentración de THC 1 ng/mL utilizando BSTFA y la mezcla de BSTFA y acetato de etilo como medio de reconstitución.*

	MEZCLA (A THC/ A PI)	BSTFA (A THC/ A PI)
<b>B-1</b>	0,067	0,072
<b>B-2</b>	0,066	0,065
<b>B-3</b>	0,066	0,059
<b>B-4</b>	0,055	0,057
<b>B-5</b>	0,072	0,062
<b>B-6</b>	0,060	0,058
<b>B-7</b>	0,065	0,079
<b>B-8</b>	0,072	0,062
<b>B-9</b>	0,100	0,067
<b>B-10</b>	0,077	0,057
<b>Media</b>	0,070 ± 0,012	0,064 ± 0,007

Tabla 12. Resultados del análisis estadístico comparando BSTFA vs. mezcla BSTFA/acetato de etilo (THC 1 ng/mL)

Comparación	Test estadístico	Valor calculado	Valor tabulado	Interpretación
Varianzas	Test de Fisher (F)	F = 2,771	F = 3,179	No hay diferencias significativas
Medias	Test t (independiente)	t = 1,354	t = 2,101	No hay diferencias significativas

Tabla 13. Valores de THC-COOH 8 ng/mL utilizando BSTFA y la mezcla de BSTFA y acetato de etilo como medio de reconstitución.

	MEZCLA (A THC-COOH/ A PI)	BSTFA (A THC-COOH/ A PI)
B-1	0,0058	0,0064
B-2	0,0052	0,0053
B-3	0,0051	0,0058
B-4	0,0049	0,0053
B-5	0,0048	0,0054
B-6	0,0045	0,0051
B-7	0,0051	0,0052
B-8	0,0055	0,0058
B-9	0,0059	0,0055
B-10	0,0058	0,0053
Media	0,0053 ± 0,0005	0,0055 ± 0,0004

Tabla 14. Resultados del análisis estadístico comparando BSTFA vs. mezcla BSTFA/acetato de etilo (THC-COOH 8 ng/mL)

Comparación	Test estadístico	Valor calculado	Valor tabulado	Interpretación
Varianzas	Test de Fisher (F)	F = 1,409	F = 3,179	No hay diferencias significativas
Medias	Test t (independiente)	t = 1,235	t = 2,101	No hay diferencias significativas

Como se muestra en las Tabla 12 y Tabla 14, los valores tabulados tanto del test de Fisher como del test t resultaron superiores a los valores experimentales obtenidos. Por tanto, se concluye que no existen diferencias significativas entre ambos en el límite de detección del THC y del THC-COOH, por lo que se pueden utilizar indistintamente.

### 4.3 Estimación de la incertidumbre del método

La validación del método se llevó a cabo siguiendo las directrices establecidas por el PNT del INTCF correspondiente. En estudios previos al presente trabajo, ya se habían evaluado diversos parámetros fundamentales, como la selectividad, la linealidad, el límite de detección (LOD), el límite de cuantificación (LOQ), la precisión y la exactitud, a partir del análisis de curvas de calibrado. En esta etapa final, la validación se centró en la estimación de la incertidumbre en distintos rangos de concentración. Para ello, se combinaron los datos generados en este trabajo con los ya disponibles de la validación anterior, lo que permitió calcular la incertidumbre tanto en las proximidades del LOQ como en el rango superior del intervalo de trabajo<sup>17</sup>.

Para definir la incertidumbre en el rango superior, y en colaboración con los facultativos del INTCF, se revisaron datos de casos forenses reales. Se observó que el THC-COOH podía alcanzar hasta 170 ng/mL, mientras que el THC raramente superaba los 50 ng/mL. Para asegurar un margen amplio, se decidió evaluar ambos compuestos a una concentración de 180 ng/mL.

Tabla 15. Valores experimentales de THC 180 ng/mL para las cinco curvas de calibrado

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5
1	207	197	167	180	174
2	207	197	167	180	174
3	201	191	162	175	169
4	207	196	167	180	174
5	204	194	165	178	178
6	196	186	158	170	165
7	202	192	163	176	170
8	193	183	155	168	162
9	200	190	161	174	168
10	217	206	173	189	183
11	206	195	175	179	173
12	214	203	166	186	180
<b>Media: 183 ± 16 ng/mL</b>		<b>Incertidumbre expandida: 18 %</b>			

Tabla 16. Valores experimentales de THC-COOH 180 ng/mL para las cinco curvas de calibrado

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5
1	191	203	196	199	183
2	190	202	195	198	183
3	189	201	194	197	182
4	185	197	190	193	178
5	183	195	187	191	176
6	191	204	197	199	184
7	182	194	187	190	175
8	185	197	191	193	178
9	181	193	187	190	174
10	193	205	198	201	186
11	201	214	207	210	193
12	194	207	200	203	187
<b>Media: 193 ± 9 ng/mL</b>		<b>Incertidumbre expandida: 12 %</b>			

Con los resultados obtenidos para el punto de control a 180 ng/mL recogidos en las Tabla 15 y

Tabla 16, y con los valores experimentales correspondientes a rangos de concentración inferiores recogidos en ensayos y trabajos anteriores, se elaboró la estimación de la incertidumbre para todo el intervalo de trabajo. Esta integración de datos permite una evaluación más completa y coherente del rendimiento del método a lo largo de su rango operativo.

Tabla 17. Incertidumbres expandidas del THC y el THC-COOH a distintos niveles de concentración

THC			
10 ng/mL	15 ng/mL	70 ng/mL	180 ng/mL
30 %	36 %	29 %	18 %
<b>Incertidumbre media: 28 %</b>			
THC-COOH			
10 ng/mL	70 ng/mL	120 ng/mL	180 ng/mL
20 %	16 %	28 %	12 %

**Incertidumbre media: 19 %**

Como se puede observar en la Tabla 17, las incertidumbres obtenidas para los distintos niveles de concentración no presentan una tendencia definida en función del rango. Por este motivo, se ha considerado adecuado calcular una incertidumbre a partir de la media de todas las incertidumbres individuales, la cual se utilizará como valor representativo de la incertidumbre general del procedimiento analítico.

#### 4.4 Documentación para la validación

Como parte del cierre de la validación del método, se procedió a completar la documentación requerida. Se actualizó el PNT asociado al método, reflejando los cambios implementados durante esta etapa de validación. Asimismo, se completaron los formularios correspondientes a la validación (Anexos), recogiendo los datos de cada parámetro evaluado según los criterios establecidos y proporcionados por el Departamento de Calidad del INTCF.

#### 4.5 Curva de calibrado

Se preparó una curva de ocho puntos tanto para el THC como para el THC-COOH cuyas concentraciones son 250, 125, 62,5, 31,25, 15,6, 3,9 y 1,95 ng/mL. Para cada uno de los puntos se prepararon dos réplicas, y cada una de ellas fue inyectada por duplicado, obteniéndose cuatro medidas por punto (A1, A2, B1 y B2), que fueron analizadas mediante GC-MS/MS (Tabla 18 y 19).

*Tabla 18. Relación de áreas para cada patrón de la curva de calibrado de THC*

	Concentración teórica (ng/mL)	Área THC / Área patrón interno			
		A1	A2	B1	B2
<b>THC</b>	1,95	0,0080	0,0059	0,0089	0,0085
	3,9	0,0155	0,0152	0,0165	0,0170
	7,8	0,0301	0,0294	0,0327	0,0325
	15,6	0,0613	0,0625	0,0673	0,0654
	31,25	0,1164	0,1191	0,1276	0,1308
	62,5	0,2381	0,2443	0,2653	0,2554
	125	0,4895	0,4795	0,4953	0,5204
	250	0,9010	0,8930	0,9271	0,9183

Tabla 19. Relación de áreas para cada patrón de la curva de calibrado de THC-COOH

	Concentración teórica (ng/mL)	Área THC-COOH / Área patrón interno			
		A1	A2	B1	B2
<b>THC-COOH</b>	1,95	0,0021	0,0021	0,0022	0,0021
	3,9	0,0033	0,0033	0,0034	0,0035
	7,8	0,0058	0,0058	0,0056	0,0056
	15,6	0,0111	0,0106	0,0110	0,0111
	31,25	0,0196	0,0198	0,0200	0,0197
	62,5	0,0383	0,0394	0,0399	0,0405
	125	0,0783	0,0798	0,0762	0,0771
	250	0,1390	0,1362	0,1379	0,1374

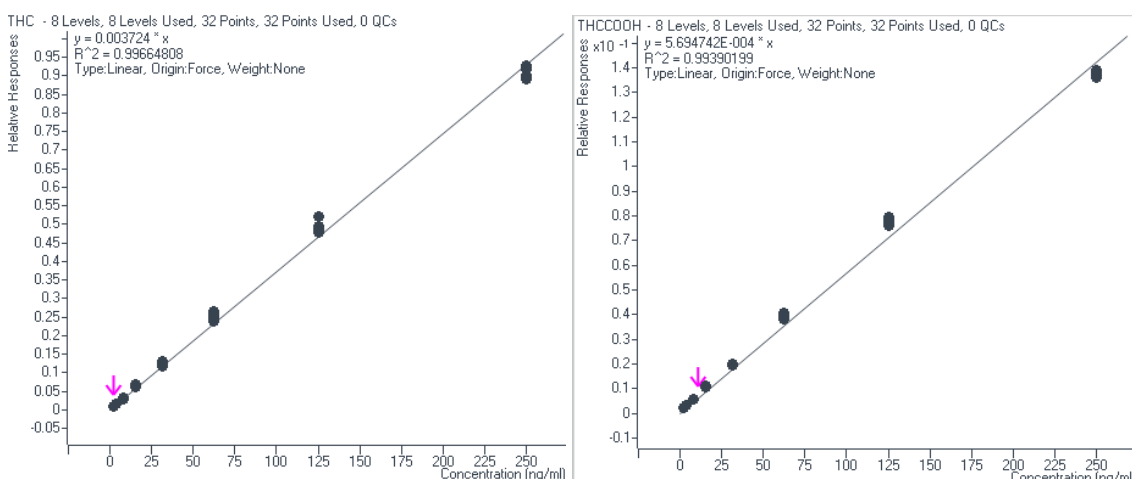


Figura 5. Curvas de calibrado correspondientes al THC y al THC-COOH respectivamente

Tabla 20. Coeficiente de determinación y valor de la linealidad (%) para las curvas de THC y THC-COOH

	THC	THC-COOH
<b>Coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>)</b>	0,996	0,994
<b>Linealidad (%)</b>	98,2	97,6

Tanto el coeficiente de correlación como el valor de linealidad obtenidos en las curvas de calibración cumplen con los criterios establecidos para la validación del método: el coeficiente de determinación fue superior a 0,99 y el valor de linealidad calculado superó el 95 %, tal como se recoge en la Tabla 20. Estos resultados confirman la existencia de

una relación proporcional y constante entre la concentración del analito en la muestra y la respuesta instrumental y respaldan la fiabilidad del método.

Para verificar que la curva de calibración era adecuada para su aplicación, se analizaron materiales certificados y controles con concentraciones conocidas. Estos se utilizaron como referencia para evaluar si existen diferencias significativas entre los valores obtenidos experimentalmente y los teóricos. Para ello, se calculó el índice de compatibilidad, considerando tanto la incertidumbre asociada a los patrones certificados como la incertidumbre del método previamente calculada (Tabla 21).

*Tabla 21. Valores experimentales de THC y THC-COOH obtenidos para cada réplica, la media y el índice de compatibilidad (IC) calculado para cada nivel de concentración*

	Concentración real (ng/mL)	Valores experimentales (ng/mL)				IC
		Replica 1	Réplica 2	Réplica 3	Media	
<b>THC</b>	3	4,02	3,24	3,58	3,61	0,73
	50	43,06	43,06	-	43,06	0,38
	180	169,10	176,56	175,94	173,87	0,12
<b>THC-COOH</b>	10	10,73	10,65	10,04	10,47	0,25
	100	112,98	115,28	-	114,13	0,45
	180	161,48	164,72	165,45	163,88	0,47

La obtención de valores del índice inferiores a 1 confirmó la idoneidad de las curvas de calibración de ambos analitos.

#### 4.6 Evaluación de los límites de detección y cuantificación

Uno de los objetivos del trabajo fue evaluar el límite de detección del THC-COOH a 5 ng/mL y el límite de cuantificación del THC a 2 ng/mL. En el caso del THC-COOH, este objetivo se estableció tras comprobar, en experimentos previos, que a pesar de haberse calculado un LD teórico de  $3 \pm 1$  ng/mL, las señales obtenidas a concentraciones inferiores (3 y 4 ng/mL) no eran suficientemente distinguibles del ruido de fondo<sup>17</sup>.

En cuanto al THC, se eligió como concentración de estudio 2 ng/mL por su relevancia interpretativa, ya que este valor puede considerarse indicativo de consumo reciente.

Para evaluar simultáneamente ambos límites, se prepararon muestras de sangre dopadas con 5 ng/mL de THC-COOH y 2 ng/mL de THC.

#### 4.6.1 Disminución del límite de detección del THC-COOH

Una vez analizadas las 15 muestras, se procedió al cálculo de dos relaciones de áreas: la relación entre el área del analito y la del patrón interno en las muestras, y la relación entre el área del ruido de fondo y la del patrón interno, obtenida a partir del blanco procesado en la misma tanda de análisis.

Para considerar que el analito es detectable la relación de áreas analito/PI debe ser, como mínimo, tres veces superior a la relación ruido/PI. Esta condición garantiza una diferenciación clara entre la señal del analito y el ruido de fondo.

Dado que las muestras se analizaron en dos días diferente, se empleó, en cada caso, el valor del ruido correspondiente al blanco procesado el mismo día que la tanda de muestras respectivas.

Tabla 22. Relación de áreas de THC-COOH y su patrón interno a 5 ng/mL

Día 1		Día 2	
Área THC-COOH/Área PI		Área THC-COOH/Área PI	
1	0,0043	9	0,0040
2	0,0043	10	0,0062
3	0,0039	11	0,0061
4	0,0043	12	0,0044
5	0,0041	13	0,0048
6	0,0040	14	0,0045
7	0,0039	15	0,0037
8	0,0037		
3*Área ruido/Área PI	0,0050	3* Área ruido/Área PI	0,0042

Como se puede ver en la Tabla 22, 13 de las 15 muestras analizadas, la relación área THC-COOH/área PI fue inferior a tres veces la relación área ruido/área PI. Esto se traduce en que el método no garantiza una diferenciación clara entre la señal del

analito y el ruido de fondo y, por lo tanto, no se puede detectar a concentraciones de 5 ng/mL.

#### 4.6.2 Disminución del límite de cuantificación del THC

Para comprobar si la cuantificación del THC a 2 ng/mL es adecuada, se procedió al cálculo del índice de compatibilidad, teniendo en cuenta las incertidumbres asociadas.

Tabla 23. Valores experimentales de THC a 2 ng/mL

THC = 2 ng/mL			
1	2,99	9	2,29
2	2,62	10	2,17
3	3,05	11	2,05
4	2,61	12	2,37
5	2,75	13	3,06
6	2,77	14	2,41
7	2,78	15	2,32
8	2,53	Media	2,30
IC: 1,2			

El valor del índice de compatibilidad es superior a 1, lo que indica que hay diferencias significativas entre el valor experimental y el valor teórico. Por lo tanto, se concluye que el método no cuantifica adecuadamente a dicha concentración de THC.

Tras la realización de estos estudios, y considerando tanto los valores experimentales obtenidos en los ensayos A y B como los valores establecidos en la etapa anterior de validación, se fijaron como límites de detección (LD): 1 ng/mL para THC y 8 ng/mL para THC-COOH; y como límites de cuantificación (LC): 3 ng/mL para THC y 10 ng/mL para THC-COOH.

#### 4.7 Estudio de blancos

Se consideró oportuno realizar un estudio de blancos para establecer la posible presencia de analitos residuales y fijar una concentración umbral por debajo de la cual se pudiera confirmar una contaminación relevante en muestras reales. Para ello se

analizaron 30 muestras de blancos extraídos, primero sin derivatizar (reconstituídas en metanol) y posteriormente tras ser derivatizadas en BSTFA.

#### 4.7.1 Blancos sin derivatizar

Como se puede observar en la Figura 6, la mayoría de las muestras analizadas mostraron presencia de cocaína, en algunos casos junto con ecgonina metil éster (EME), uno de sus metabolitos principales<sup>18</sup>. En los casos en los que se detectó cocaína, la concentración media fue de  $0,053 \pm 0,028$  mg/L. Por otro lado, EME se detecta en un número reducido de muestras, de la cual desconocemos su concentración ya que su análisis se realiza de forma cualitativa.

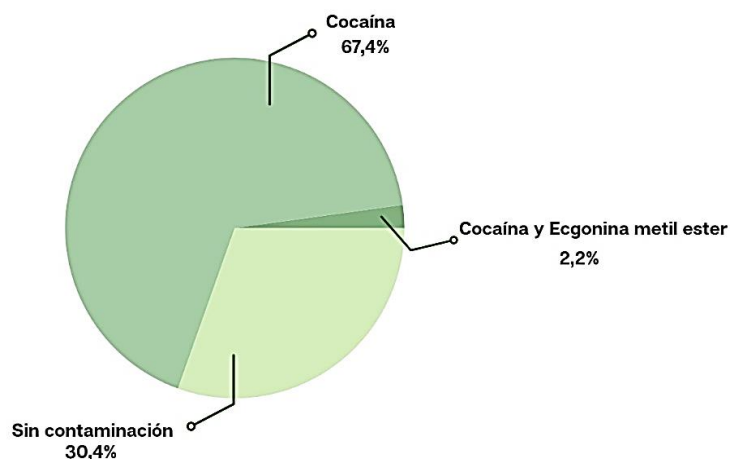


Figura 6. Frecuencia de detección de contaminantes en sangre blanca en muestras sin derivatizar

#### 4.7.2 Blancos derivatizados

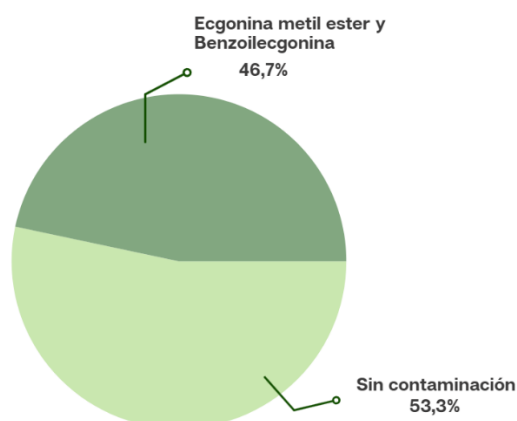


Figura 7. Frecuencia de detección de contaminantes en sangre blanca en muestras derivatizadas

Tal como se muestra en la Figura 7, más de la mitad de las muestras analizadas (53,3 %) no presentaron ningún tipo de contaminación detectable. No obstante, en el 46,7 %

restante de los blancos se detectaron tanto EME como benzoilecgonina (BE), ambos metabolitos principales de la cocaína. Mientras que el análisis de EME fue de carácter cualitativo, el de BE permitió su cuantificación, con una concentración media de  $0,0069 \pm 0,0021$  mg/L. 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 hidrólisis química o enzimática bajo condiciones específicas in vitro. 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<sup>18</sup>.

A pesar de que en los estudios de blancos se detectaron trazas de algunas sustancias, estas no suponen una interferencia en la determinación de THC y THCCOOH mediante GC-MS/MS. Esto se debe a que el método empleado se basa en la monitorización de transiciones MRM específicas correspondientes a las moléculas derivatizadas de cada analito, lo que proporciona una elevada selectividad.

## 5 CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo se ha validado un método analítico mediante extracción en fase sólida (SPE) y análisis por GC-MS/MS para la cuantificación de THC y THC-COOH en sangre.

Se confirmó que el uso exclusivo del reactivo derivatizante proporcionaba una mejor respuesta sin comprometer la cuantificación.

Aunque no fue posible establecer un límite de cuantificación de 2 ng/mL para el THC, el método validado permite cuantificar con fiabilidad a partir de 3 ng/mL, umbral que también indica un consumo reciente. Asimismo, el análisis de blancos de matriz permitió identificar posibles contaminaciones residuales y establecer concentraciones umbral para evitar falsos positivos.

Se comprobó que las curvas de calibrado obtenidas son estables durante más de un año, manteniéndose dentro de los criterios de linealidad y exactitud establecidos, lo que aporta robustez al método. La creación de una nueva curva permitió confirmar la reproducibilidad del procedimiento analítico.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Plan Nacional sobre Drogas. Monografía Sobre Cannabis. *Adicciones* **2000**, 12 (Suppl. 2).
- (2) Centre d'Estudis Jurídics i Formació Especialitzada. *Drogas de Abuso En Toxicología Forense: Recomendaciones e Interpretación de Utilidad Médico-Legal*; Generalitat de Catalunya, D. de J., Ed.; 2012.
- (3) Grotenhermen, F. Pharmacology of Cannabinoids. *Neuroendocrinology Letters Nos.1* **2004**, 25 (1–2), 14–23.
- (4) H Drummer, O. Postmortem Toxicology of Drugs of Abuse. *Forensic Sci Int* **2004**, 142 (2–3), 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.02.013>.
- (5) A. Huestis, M.; E. Henningfield, J.; J. Cone, E. Blood Cannabinoids. I. Absorption of THC and Formation of 11-OH-THC and THCCOOH During and After Smoking Marijuana. *J Anal Toxicol* **1992**, 16 (5), 276–282.
- (6) J Lucas, C.; Galettis, P.; Schneider, J. The Pharmacokinetics and the Pharmacodynamics of Cannabinoids. *Br J Clin Pharmacol* **2018**, 84 (11), 2477–2482. <https://doi.org/10.1111/bcp.13710>.
- (7) *Understanding and Improving Solid-Phase Extraction*. LCGC North America. <https://www.chromatographyonline.com/view/understanding-and-improving-solid-phase-extraction-0> (accessed 2025-06-06).
- (8) Brajovic, F. *Cromatógrafo de gases con espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (GC-MS/MS)*. Cromtek. <https://www.cromtek.cl/2024/11/21/cromatografo-de-gases-con-espectrometro-de-masas-de-triple-cuadrupolo-gc-ms-ms/> (accessed 2025-06-10).
- (9) García Valverde, M. *Aplicación de Nuevas Técnicas de Espectrometría de Masas Para La de Plaguicidas En Muestras Vegetales y Ambientales*, Universidad de Almería, Almería, 2023.

- (10) Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. *Evaluación de La Calidad de Los Ensayos*; Barcelona, 2024.
- (11) Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. *Estimación de La Incertidumbre*; Barcelona, 2024.
- (12) Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). INIA Por Dentro Setiembre 2021-Revista INIA. September 2021.
- (13) Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. *Validación de Métodos de Ensayo*; Barcelona, 2019.
- (14) Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC). *Fotografías: Fototeca de la UNODC*. Naciones Unidas.
- (15) H, M. *F-Test: Simple Definition, Step by Step Examples*. Statistics How To. <https://www.statisticshowto.com/probability-and-statistics/hypothesis-testing/f-test/> (accessed 2025-06-13).
- (16) Stephanie, G. *T Test (Student's T-Test): Definition and Examples*. Statistics How To. <https://www.statisticshowto.com/probability-and-statistics/t-test/> (accessed 2025-06-10).
- (17) Pau Alcalá-Santaella, V.; Soroa Jorba, M. Validación Del Análisis Cualitativo/ Cuantitativo de Cannabinoides En Muestras de Sangre, Universitat Rovira i Virgili, Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, Barcelona, 2024.
- (18) Roque Bravo, R.; Faria, A. C.; Brito-da-Costa, A. M.; Carmo, H.; Mladěnka, P.; Dias da Silva, D.; Remião, F. Cocaine: An Updated Overview on Chemistry, Detection, Biokinetics, and Pharmacotoxicological Aspects Including Abuse Pattern. *Toxins (Basel)* **2022**, *14* (4), 278. <https://doi.org/10.3390/toxins14040278>.

## 7 ANEXOS

### Formulario para la validación

En la Tabla 24 se muestra un resumen de los parámetros evaluados durante la validación del método, recogidos tanto en el presente trabajo como en estudios previos. Estos datos están incluidos en la “Ficha de validación de un método de ensayo”.

Tabla 24. Resumen de los parámetros evaluados para la validación del método de THC en sangre

PARÁMETRO	VALOR ESPERADO	OBSERVACIONES
INTERVALO DE TRABAJO	1.95 – 250 ng/mL	
FUNCIÓN DE RESPUESTA (R <sup>2</sup> )	0,99	r = 0,99 Coeficiente de correlación aceptable para la mayoría de las calibraciones cromatográficas
LINEALIDAD (Cm)	>95%	
SELECTIVIDAD / ESPECIFICIDAD	Consultar	Capacidad de determinar específic. el analito en presencia de otros compuestos y de la matriz y diferenciarlo del resto
LÍMITE DE DETECCIÓN La menor concentración o cantidad de analito detectable con razonable certeza	THC: 1 ng/mL THC-COOH: 8 ng/mL	
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Concentración mínima que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión	THC: 3 ng/mL THC-COOH: 10 ng/mL	
REPETIBILIDAD	5%	
PRECISIÓN INTERMEDIA / REPRODUCIBILIDAD	15%	
EXACTITUD	THC: 17 % THC-COOH: 8%	
INCERTIDUMBRE	THC: 28.0% THC-COOH: 19,0 %	