

TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



*Pilar Gómez Ramírez
Toxicología*

1

TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



**Conjunto de procesos analíticos encaminados
a poner de manifiesto la presencia de una
sustancia tóxica en una muestra**

2

ANÁLISIS QUÍMICO -TOXICOLÓGICO

RETOS:

- Diversidad de sustancias/ bajos niveles

- Creciente número de muestras

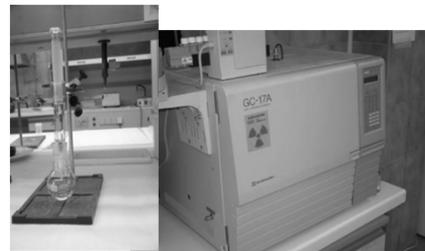
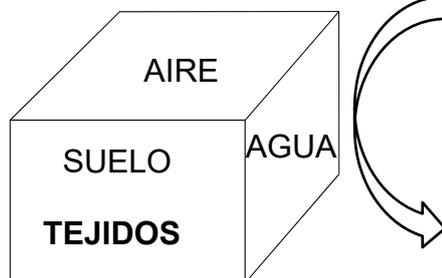


- Técnicas más sensibles, rápidas, económicas

3

ANÁLISIS QUÍMICO -TOXICOLÓGICO

MATRIZ



XENOBIÓTICOS
METABOLITOS

4

ANÁLISIS QUÍMICO -TOXICOLÓGICO

○ OBJETIVOS:

- Identificación y cuantificación del xenobiótico sospechoso de ocasionar daño tóxico
- Caracterización de las formas químicas bajo las que se encuentra la estructura del xenobiótico
- Identificar metabolitos producidos en la biotransformación
- Detectar la presencia de tóxicos ignorados
- Evaluar la eficacia de tto intoxicaciones

5

ANÁLISIS QUÍMICO- TOXICOLÓGICO

- Clínico
- Forense
 - Postmortem
 - Drogas de abuso
 - Dopaje
 - T. Alimentaria
 - T. Laboral
 - T. Ambiental

- Urgencia
- Información previa
- Tipo de muestras
- Concentraciones
- Determinación cuantitativa/cualitativa

6

ETAPAS DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

1. Toma y preparación de la muestra
2. Elección de la técnica analítica
3. Separación y purificación del analito problema
4. Detección de compuestos
5. Interpretación de resultados

7

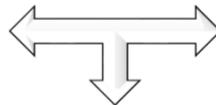
1. TOMA Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- o Representativa
- o Homogénea

MUESTRA



**Resultados
reproducibles**



**TÉCNICA
ANALÍTICA**

TÓXICO



8

1. TOMA Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- Muestras limpias
- Conservación
- Recipientes
- Etiquetado
- Muestras para histopatología



9

CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS



Muestras hemáticas

Sangre entera

Plasma/Suero



Orina



Contenido gástrico, líquido de lavado gástrico o vómitos



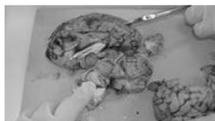
*Aire espirado
Saliva*

10

CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Tejidos

Hígado > Riñón > Encéfalo



Pelo



11

MUESTRAS A REMITIR EN CASO DE SOSPECHA DE INTOXICACIÓN

- Consultar al laboratorio
- Sangre
- Suero
- Orina
- Contenido gástrico-vómitos
- Alimento

12

MUESTRAS CON CARÁCTER JUDICIAL

○TRIPLICADO

- Análisis inicial
- Análisis contradictorio
- Análisis dirimente

Cadena de custodia



13

INFORMACIÓN QUE DEBE ACOMPañAR A LAS MUESTRAS

- Historia clínica
- Signos clínicos
- Hallazgos de autopsia

14

2. ELECCIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA

- Sensible
- Específica
- Exacta
- Precisa
- Repetible y reproducible
- Económica
- Segura
- Rápida

ANAMNESIS

MUESTRAS

15

ELECCIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA

SISTEMÁTICA ANALÍTICA GENERAL

INFORMACIÓN

ANÁLISIS ESPECÍFICO

16

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

- Extracción (separación del tóxico de la matriz)
- Fraccionamiento del extracto
- Purificación
- **RETO:**
 - Procesos de extracción automatizados

- Máximo esfuerzo en el aislamiento y purificación
- Los procesos de purificación pueden conllevar peores rendimientos

17

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

- Muestras biológicas:
 - Muestras complejas con muchos componentes que pueden alterar la respuesta



- Evitar interferencias
- Aumentar la selectividad, sensibilidad y precisión

18

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

- Muestras biológicas
 - Sangre, suero, plasma: Desproteinizar
 - Digestión ácida
 - Digestión enzimática
 - Ultrasonidos + centrifugación

- Orina: eliminar conjugados
 - Hidrólisis química: alt. Compuestos termolábiles
 - Hidrólisis enzimática



19

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

- Muestras biológicas
 - Tejidos: Desproteinizar
 - Digestión ácida
 - Digestión enzimática

- Pelos:
 - Hidrólisis química: alt. Compuestos termolábiles
 - Hidrólisis enzimática:



20

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

- Extracción líquido-líquido
 - Cambios de pH
 - Solvente: baja lipofilia, bajo pto. ebullición, baja polaridad

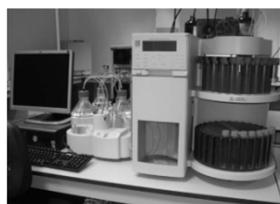


Disolvente	P. ebullición(°C)	Polaridad	Solub. en agua (%)
n-Hexano	69	0	<0'001
Tetracloruro de carbono	77	1'7	0'08
Ciclohexano	81	0	0'01
Cloroformo	61	4'4	0'82
Diclorometano	40	3'4	1'30
1,1-Dicloroetano	57	-	5'03
Eter dietílico	35	-	6'04
Acetato de etilo	77	4'3	8'08

21

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

- EXTRACCIÓN ACELERADA (ASE)
 - Técnica preparativa que disminuye los tiempo de extracción.
 - Combina un aumento de la temperatura y la presión: incrementa la eficiencia en el proceso de extracción (mayor rapidez y significativa reducción del volumen de disolvente)
 - Todo tipo de disolventes (incluido el agua)
 - Plaguicidas, herbicidas, aditivos en polímeros



22

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

Extracción sólido-líquido o en fase sólida (SPE)



SOXHLET



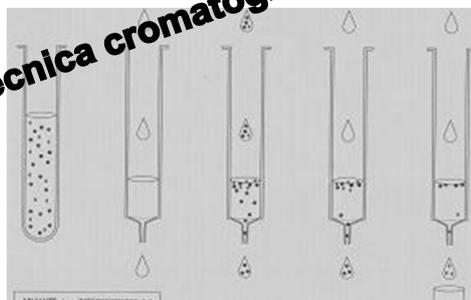
SOXTHERM

23

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

- Extracción sólido-líquido o en fase sólida (SPE)
- GPC

Técnica cromatográfica



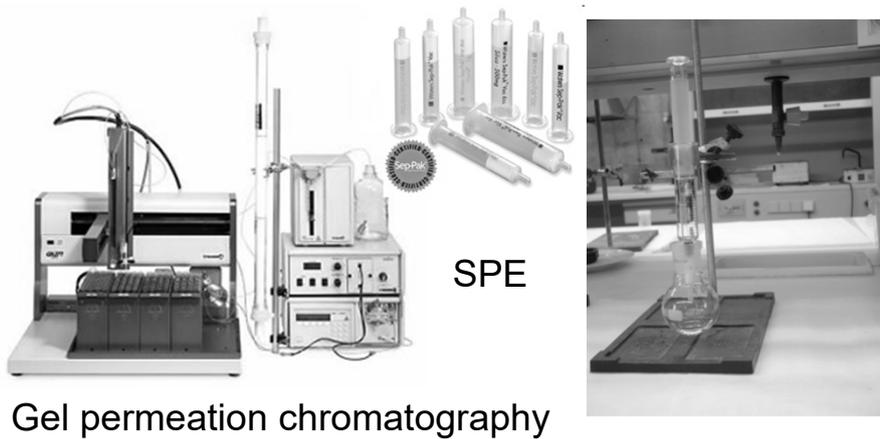
COLUMNAS

- Selección del mecanismo de adsorción y adsorbente.
- Pretratamiento de la muestra
- Acondicionamiento de la columna
- Estabilización de la columna
- Aplicación de la muestra
- Elución de las interferencias
- Elución del analito

24

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

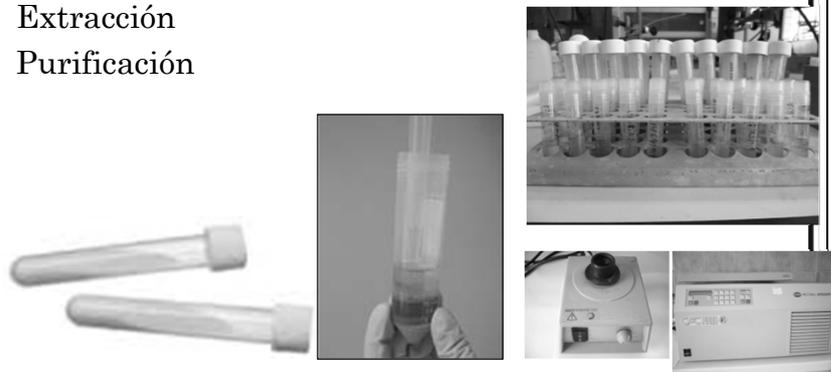
- o SPE, GPC



25

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

- o QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)
 - Extracción en fase sólida dispersiva
 - Extracción
 - Purificación

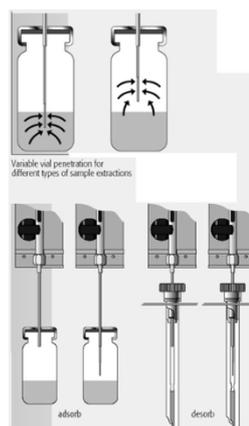


26

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

○ Extracción por espacio de cabeza

- Compuestos volátiles
- Puede ser automatizado

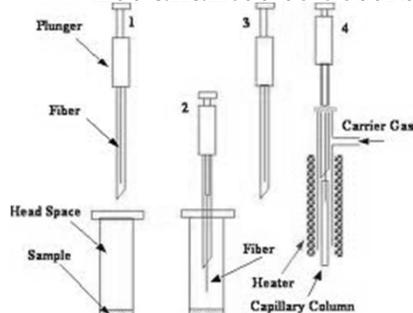


27

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

○ Microextracción en fase sólida

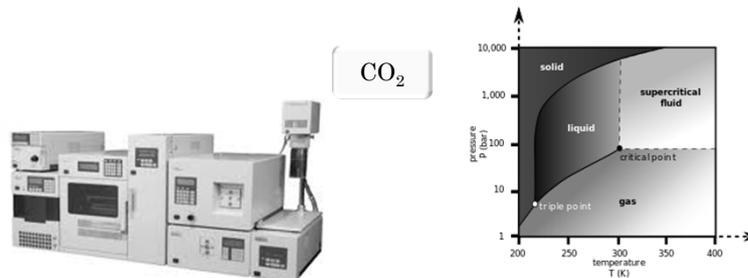
- Automatizado
- Adsorción de analitos en una fibra de sílice incluida en la jeringa
- Los analitos se desorben en el bloque de inyección



28

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

- Extracción con fluidos supercríticos

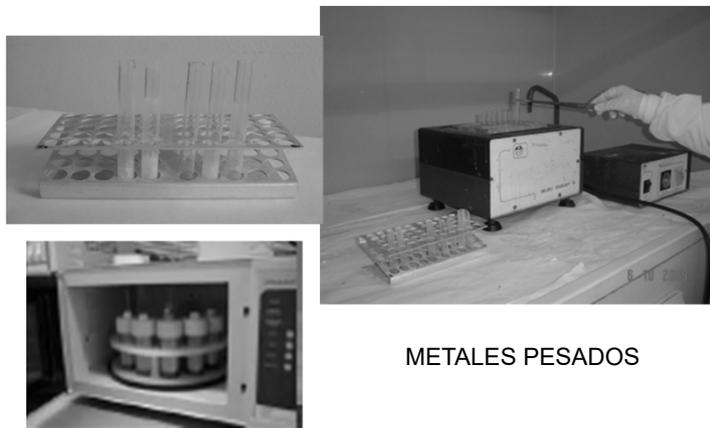


- Opiáceos, cannabinoides, benzodiazepinas

29

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

- DIGESTIÓN HÚMEDA



30

DETECCIÓN

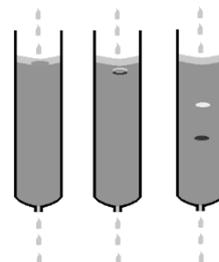
- Cromatografía
- Espectrometría y espectrofotometría
- Inmunoensayos
- Otros métodos



31

CROMATOGRAFÍA

- Fase estacionaria:
 - Retienen la sustancia por afinidad
- Fase móvil
 - Empuja la sustancia a través de la fase estacionaria



32

CROMATOGRAFÍA

○ CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

- Factor de retardo (FR) = $d \text{ soluto} / d \text{ solvente} \times 100$

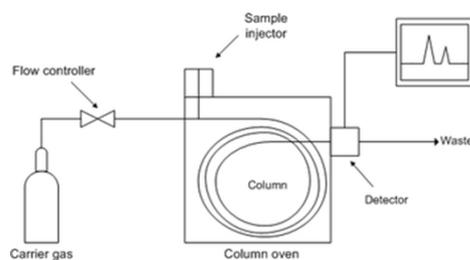


33

CROMATOGRAFÍA

○ CROMATOGRAFÍA DE GASES

- Cuando los componentes de la mezcla problema son volátiles o semivolátiles y térmicamente estables a temperaturas de hasta 350-400° C.
- La fase móvil es gas
- Fase estacionaria: Columnas específicas

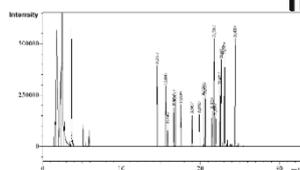


34

CROMATOGRAFÍA DE GASES

o VENTAJAS

- Separación eficaz y versátil
- Sensibilidad de detección: ng/mL, pg/mL
- Identificación: Rt
- Cuantificación
- Amplio rango de aplicaciones



o INCONVENIENTES

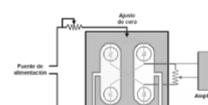
- No detección de termolábiles, alto peso molecular y polares → Derivatizar o HPLC
- Coincidencias en Rt

35

CROMATOGRAFÍA DE GASES

o DETECTORES:

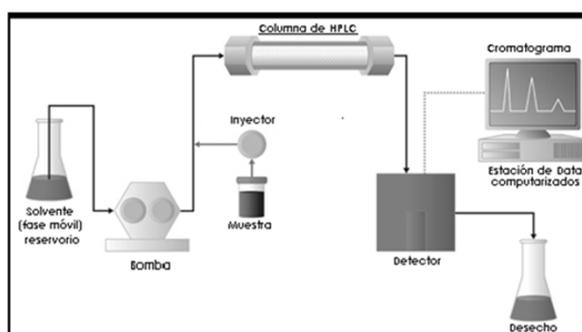
- Detector de ionización de llama (FID)
- Detector de conductividad térmica (TCD)
- Detector de captura de electrones (ECD)
- Detector de microcaptura de electrones (μ ECD)
- Detector de nitrógeno- fósforo (NPD)
- Detector de fotoionización (PID)
- Detector de espectrometría de masas



36

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

- La fase móvil es un líquido
- Cuando los compuestos a analizar son poco volátiles y/o termolábiles



37

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

o VENTAJAS

- Compuestos térmicamente inestables, poco volátiles, alto peso molecular y/o amplios rangos de polaridad
- Muestras acuosas
- Determinaciones cualitativas pero especialmente interesantes las cuantitativas.
- Gran aplicabilidad a sustancias de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ingeniería: pigmentos, antioxidantes, oligosacáridos, triglicéridos, vitaminas, fármacos, muestras medioambientales, etc.

o INCONVENIENTES

- Baja especificidad
- Baja reproducibilidad

38

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

o Cromatografía de adsorción

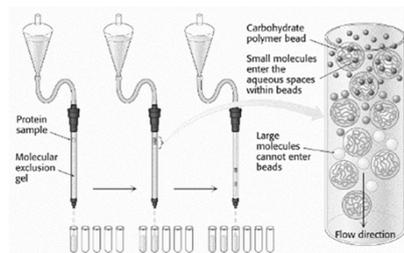
- C. de fase normal
 - o F. estacionaria: polar
 - o F. móvil: apolar
 - o A > polaridad, > tiempo de retención
 - o En desuso
- C. de fase reversa
 - o F estacionaria: apolar
 - o F móvil: moderadamente polar

39

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

o C. de exclusión molecular

- Separación en función de tamaño
- Para purificar extractos

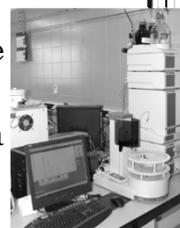
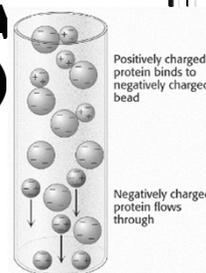


40

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

○ C. de intercambio iónico

- Atracción electrostática
- Se retienen iones de diferente carga
- Aplicable a casi cualquier tipo de molécula cargada, incluyendo ácidos orgánicos y azúcares.
- Para análisis de agua, extractos acuosos de cualquier tipo (vegetales y minerales)
- Utilidad medioambiental e industria agroalimentaria.



41

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

○ DETECTORES

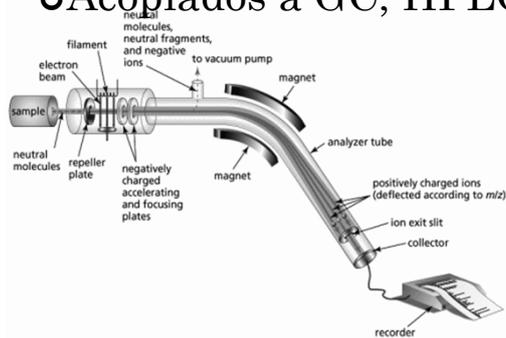
- D UV fijo
- D fotodiodo: UV, de barrido (Rt)
- D fluorescencia
- D electroquímico
- Espectrómetro de masas
 - Ionización a presión atmosférica
 - Ionización electrospray
 - Ionización química



42

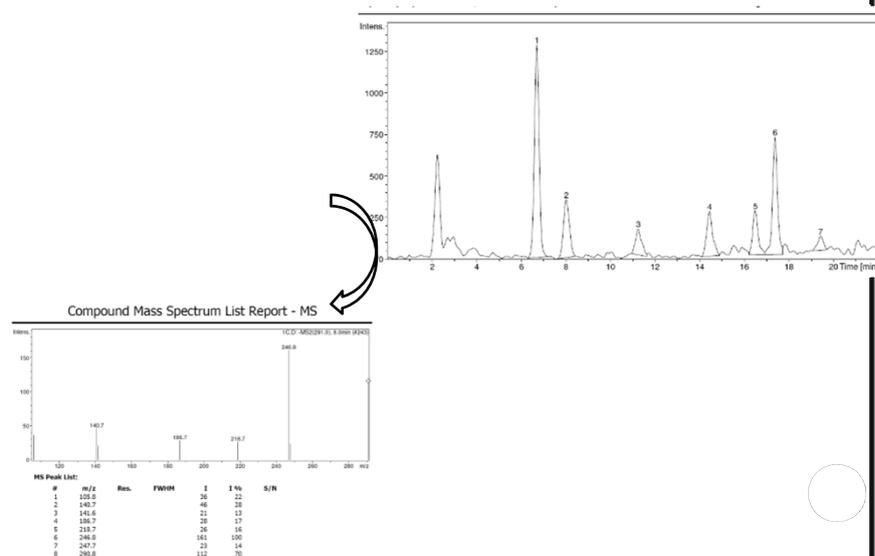
ESPECTROMETRÍA DE MASAS

- Identificación de sustancias por determinación de pesos moleculares
 - Obtención de iones
 - Separación por masa/carga
- Acoplados a GC, HPLC



43

ESPECTROMETRÍA DE MASAS



44

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

○ Métodos de ionización

- Impacto electrónico (EI):
 - transferencia de e que fragmenta iones
- Ionización química (CI):
 - mezcla con gas reactivo que origina nuevos iones
- Ionización química negativa (CIN):
 - aumenta la sensibilidad (20x > que en EI en c. electronegativos)

45

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

○ Modo de detección

- Full scan: barrido entre 40 y 650 masa/carga
- SIM: para detectar 1 o varios iones más abundantes o relación m/q significativa en el espectro de masas de interés. Requiere conocer los iones
- MS-MS o MS-MS-MS: aumenta ss y selectividad

TOXICOLOGÍA: EI + FULL SCAN

46

ESPECTROMETRÍA MASAS TOF

- Los iones generados son acelerados por un pulso de potencial
- Se basa en la medición del tiempo que tardan los iones en alcanzar el detector
- Detección de compuestos por masa exacta
- VENTAJAS:
 - Gran precisión y exactitud
 - Extensas librerías



47

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

- Es una espectroscopía
- Medición de la absorción de la radiación electromagnética (núcleos)
 - Muy rápida
 - Poco sensible
- Salicilatos, naproxeno, ibuprofeno, dietilcarbamazepina, cloroquina, eritromicina, etanol o paraquat

48

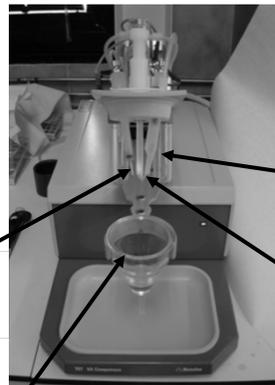
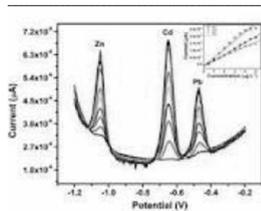
POLAROGRAFÍA

- 1) Potencial de oxidación
- 2) Potencial de reducción

Metales



Intensidad de corriente



Reference electrode
(Ag/AgCl;
KCl, 3
mol/l)

Auxiliary electrode
(platinum)

working electrode
(hanging
mercury
drop)

50 µl HCl (electrolyte support) +
10 ml Milli-Q water

49

ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Metales



- Medición de e absorbida que provoca estado excitado en electrón externo
- Longitud de onda específica
 - De llama: altas concentraciones
 - De cámara de grafito o electrotérmica: más sensible
 - De vapor frío: para obtener Hg atómico
 - Sistema de hidruros volátiles: para volatilizar algunos metales en forma de hidruros (As, Se, Sb, Ti, etc.)

50

PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO (ICP-MS)

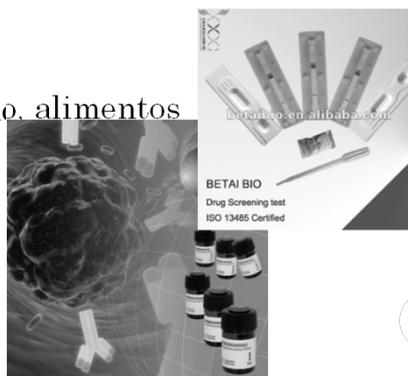
Metales

- Plasma = mezcla gaseosa conductora de la electricidad con una concentración significativa de electrones y cationes
 - Gas plasmógeno (Ar) + campo electromagnético → Plasma
 - Plasma + muestra → Iones medidos por MS
- alta precisión
- bajos límites de detección
- bajo coste económico
- Análisis de mayoría de los elementos e isótopos de la tabla periódica de manera simultánea en minutos

51

INMUNOENSAYOS

- Screening drogas de abuso/fármacos en orina
- Determinaciones *in situ*
- Determinaciones farmacocinéticas en sangre/suero
- Alcohol en sangre
- Plaguicidas en agua, suelo, alimentos
- Parámetros bioquímicos:
 - Creatinina
 - Urea
 - Colesterol
 - Triglicéridos
 - AChE



52

INMUNOENSAYOS

- Radioinmunoensayos
 - Sensibilidad: metabolitos de morfina en orina (codeína, morfina glucurónido y morfina)
 - Riesgo para la salud

- Enzimoimmunoensayos:
 - ELISA:
 - sangre y suero
 - Drogas de abuso: barbitúricos, benzodiazepinas, anfetamina, metanfetamina, morfina, opiáceos, metabolitos de la cocaína, fenciclidina y LSD

53

INMUNOENSAYOS

- Enzimoimmunoensayos:
 - EMIT (Enzyme multiplied immunoassay technique)
 - Unión competitiva a proteínas,
 - Mayor aplicación
 - Sin tratamiento inicial de la muestra
 - en orina: opiáceos, cocaína, benzodiazepinas, anfetaminas, dextropropoxifeno, fenciclidina, metadona, metacualona, barbitúricos, cannabis y LSD
 - En suero: etanol, antidepresivos tricíclicos y paracetamol.

54

INMUNOENSAYOS

o Enzimoinmunoensayos:

- FPIA (fluorescence polarization immunoassay)
 - o suero, sangre, orina
 - o tobramicina, gentamicina, propranolol, morfina, digoxina, digitoxina, fenitoína, procainamida, anfetaminas, benzodiazepinas, barbitúricos, metadona, antidepresivos tricíclicos y cocaína.

55

SISTEMÁTICAS ANALÍTICAS TOXICOLÓGICAS

1. PARA GASES Y VAPORES

Espacio de cabeza

Microextracción

2. PARA TÓXICOS INORGÁNICOS

1. Digestión de la muestra

- Seca: Incineración
- Húmeda: A sobrepresión, presión atmosférica

2. Analítica

ICP-MS, AAS, Voltamperometría

3. PARA TÓXICOS

ORGÁNICOS

1. Extracción, Purificación, Fraccionamiento del extracto

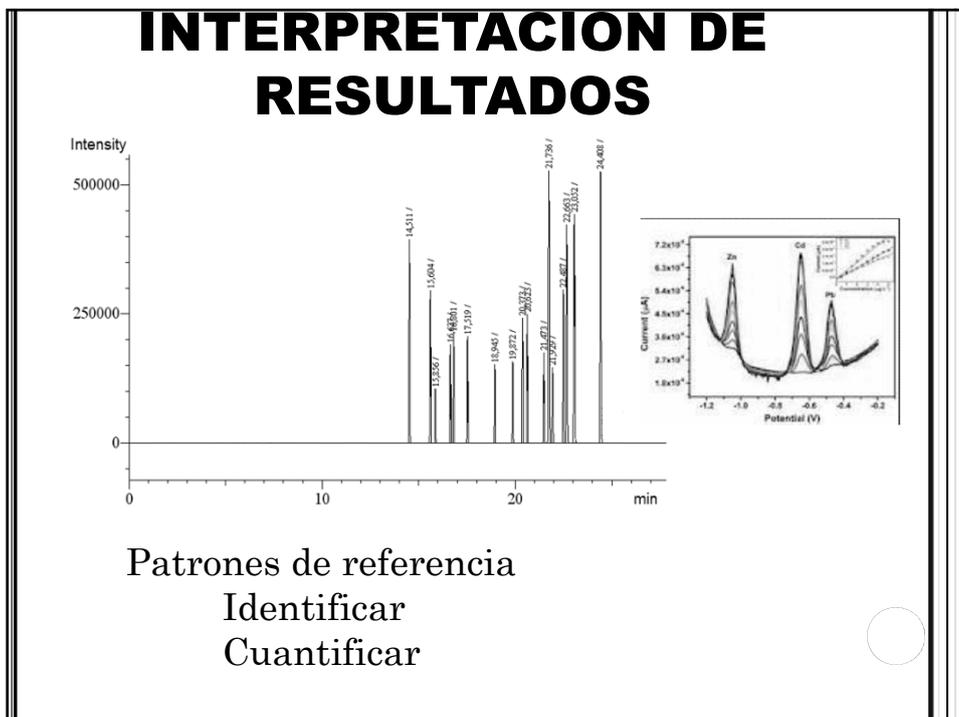
2. Analítica

GS-MS, HPLC-MS, HPLC-TOF, RMN

56



57



58

INTERPRETACION DE RESULTADOS

Librerías de espectro de masas
Identificar

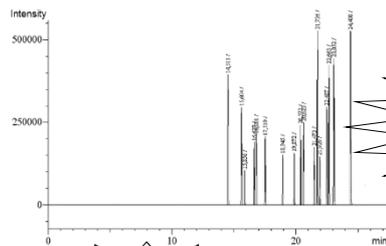
Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)	Hits (DB)
Cpd 3: Taurine	0.194	125.0148	Taurine	C2 H7 N O3 S	-1.41	1
Cpd 9: Ricinolic acid	0.206	298.2505	Ricinolic acid	C18 H34 O3	0.94	2
Cpd 12: Diaveridin	0.208	260.1271	Diaveridin	C13 H16 N4 O2	0.93	1
Cpd 21: Fumecycloz	0.211	251.152	Fumecycloz	C14 H21 N O3	0.76	2
Cpd 22: Fluorofentanyl, p-	0.211	354.2112	Fluorofentanyl, p-	C22 H27 N2 O F	-1.31	1
Cpd 23: Fluzoperine	0.212	278.1427	Fluzoperine	C15 H19 N2 O2 F	1.43	5
Cpd 27: Doxibetasol	0.215	376.2059	Doxibetasol	C22 H29 O4 F	-2.4	4
Cpd 32: Violaxanthin	0.22	600.4186	Violaxanthin	C40 H56 O4	-1.2	1

-- End Of Report --

59

INTERPRETACION DE RESULTADOS



INTERPRETACION DE RESULTADOS



BASES DE DATOS TOXICOLÓGICOS

- Datos en la misma especie o especies similares
- DL50, NOAEC, LOAEC
- Vía de administración
- Edad
- Estado fisiológico
- Toxicidad aguda/crónica

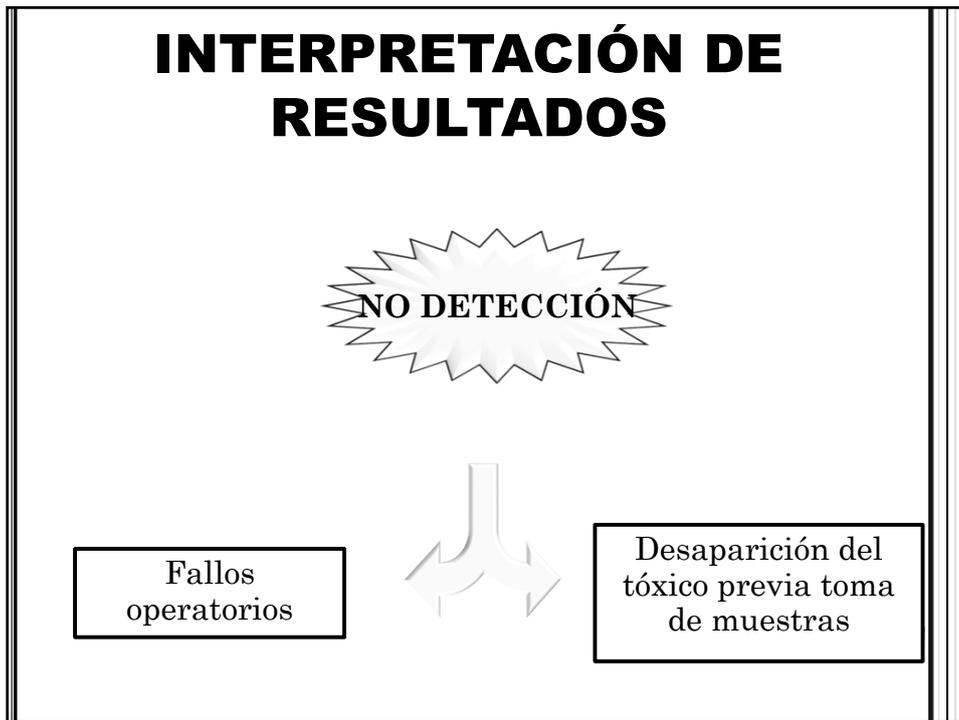
61

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

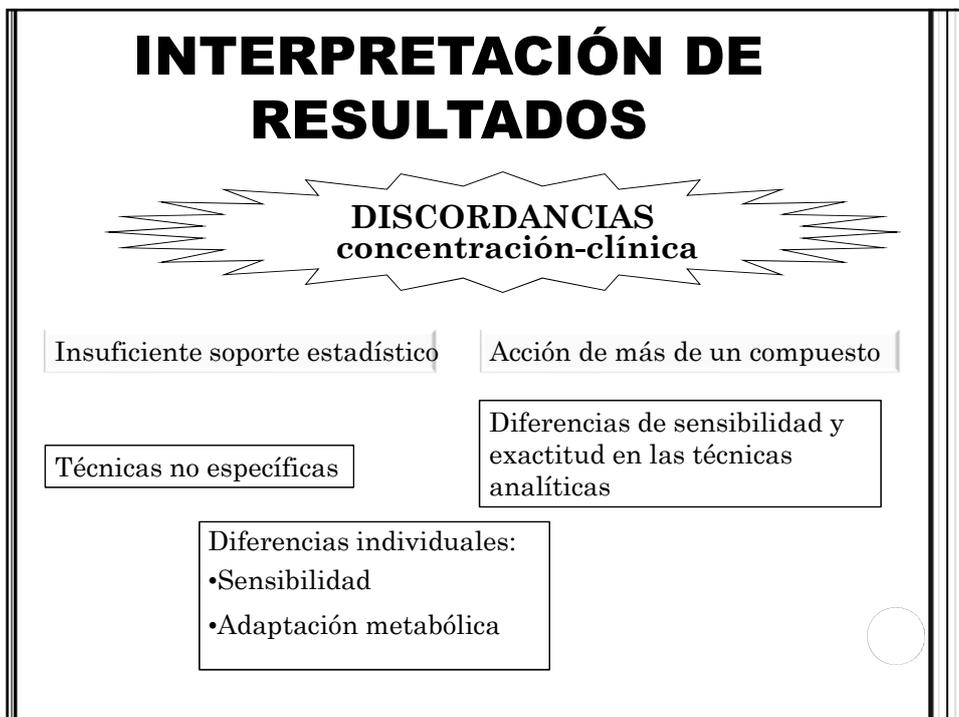
VARIABLES QUE INFLUYEN EN LOS RESULTADOS ANALÍTICOS

- **MOMENTO DE LA TOMA DE MUESTRA:**
 - Compuestos vida corta
 - Redistribución
 - Exposición crónica
 - Fase absorción
- **ESTABILIDAD DEL COMPUESTO EN LA MUESTRA**
 - Condiciones de conservación de la muestra
- **MÉTODO ANALÍTICO:**
 - Amplitud y reproducibilidad
 - Sensibilidad
 - Especificidad

62



63



64

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS



**DISCORDANCIAS
concentración-clínica**

Ciclos circadianos,
época del año

Errores de interpretación
sangre total
suero
Plasma
orina

Confusión de tóxicos relacionados químicamente pero diferente metabolismo/ excreción.

65

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS



**DISCORDANCIAS
concentración-clínica**

**MUESTRAS
ALTERADAS**

Orina

DILUCIÓN
SUSTITUCIÓN
ADULTERACIÓN

}

DROGAS DE ABUSO



66

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

**DISCORDANCIAS
concentración-
clínica**

MUESTRAS
ALTERADAS

Agentes adulterantes de orina

En vivo:
Ibuprofeno, AAS

In vitro
amoníaco, lejía, alcohol etílico, etilenglicol,
gasolina, keroseno, jabón líquido, agua oxigenada,
bicarbonato sódico, vinagre, tabletas de sal

67

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

**DISCORDANCIAS
concentración-
clínica**

MUESTRAS
ALTERADAS

Orina

DILUCIÓN SUSTITUCIÓN ADULTERACIÓN		Densidad pH Temperatura Detección de agentes adulterantes
---	--	--

68

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

DETECCIÓN DE MUESTRAS ALTERADAS

o Muestras sustituidas

- Orina: Creatinina y densidad relativa
- Saliva: inmunoglobulina G (IgG)

o Muestras diluidas

- Orina: creatinina y densidad relativa

o Muestras adulteradas

- Orina: pH, nitritos, sustancias exógenas (Cromo [VI], lejía, yoduros o fluoruros, glutaraldehído , piridina o clorocromato de piridinio , surfactantes...),
- Cabellos, Saliva y Sudor: Sustancias exógenas