TESE DE DOUTORAMENTO

TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN DESARROLLADAS PARA EL CONTROL DE PSICOFÁRMACOS Y DROGAS DE ABUSO EMERGENTES EN MATRICES DE INTERÉS TOXICOLÓGICO

Ana María Ares Fuentes

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN CIENCIA E TECNOLOXÍA QUÍMICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2021

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN DESARROLLADAS PARA EL CONTROL DE PSICOFÁRMACOS Y DROGAS DE ABUSO EMERGENTES EN MATRICES DE INTERÉS TOXICOLÓGICO

Dna. Ana María Ares Fuentes

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

En Santiago de Compostela, 04 de xuño de 2021

Asdo. Ana María Ares Fuentes

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN DESARROLLADAS PARA EL CONTROL DE PSICOFÁRMACOS Y DROGAS DE ABUSO EMERGENTES EN MATRICES DE INTERÉS TOXICOLÓGICO

Dna. Antonia María Carro Díaz
Dna. Rosa Antonia Lorenzo Ferreira

INFORMAN:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por Dna. Ana María Ares Fuentes, baixo a nosa dirección, e autorizamos a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como directoras desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

De acordo co indicado no Regulamento de Estudos de Doutoramento, declaramos tamén que a presente tese de doutoramento é idónea para ser defendida en base á modalidade de Monográfica con reproducción de publicacións, nos que a participación da doutoranda foi decisiva para a súa elaboración e as publicacións se axustan ao Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 04 de xuño de 2021

Asdo. Antonia M. Carro Díaz

Asdo. Rosa A. Lorenzo Ferreira

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

Sería imposible terminar esta memoria sin dedicar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, con su apoyo y ayuda, han hecho capaz que pueda llegar hasta aquí.

Primeramente, quisiera dar las gracias a mis directoras de tesis, Antonia María Carro Díaz y Rosa Antonia Lorenzo Ferreira, y a mi directora de tesis "extraoficial" Purificación Fernández Gómez. Gracias por permitir realizarme como investigadora en vuestro grupo durante todos estos años, por vuestra inestimable ayuda y vuestros sabios consejos, que no sólo me han servido en esta etapa profesional, sino a nivel personal.

Quisiera darle también las gracias a Carmen Álvarez Lorenzo y a Ángel Concheiro Nine por permitirme colaborar con su grupo de investigación y aportarme una nueva perspectiva de la Ciencia. Gracias por acogerme como una integrante más y como no, por brindarme toda vuestra ayuda y colaboración en la realización de esta Tesis.

Gostaria de agradecer à Professora María de Lourdes Bastos e ao seu grupo de Toxicologia por me terem dado a oportunidade de fazer uma estadia no seu laboratório da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Agradeço à Professora Paula Guedes pela sua supervisão durante minha estadia. Agradeço também a Ana Margida e a Dra. Carolina por compartilharem parte de seu tempo me ensinando, pela ajuda e por "me apresentar" ao mundo das células. Não quero esquecer a Ana Filipa, a María Enea, a Filipa, a Daniela, o Rui e outros membros do laboratório, bem como às técnicas Cátia e Margarida, por me permitirem juntar-me ao seu grupo como mais uma, por todo o tempo investido e por sua ajuda.

Quero fazer uma menção especial à Diana e ao João, pela calorosa recepção e por me deixaren ficar com eles. Obrigada por fazer parte da minha família portuguesa (sem esquecer o Charlie e o Ragnar ;D).

Gracias a todos mis compañeros en los diferentes laboratorios.

En el laboratorio de Toxicología, gracias a Ana Bermejo por permitirme realizar aquellas prácticas de verano que me enseñaron por primera vez el mundo de la Toxicología. A Iván, quien me enseñó el "CSI" del laboratorio y por todos estos años de consejos y ayuda brindada. A María, quien me ayudó a entrar en este mundo de la Toxicología Analítica y dedicar su tiempo en enseñarme y aconsejarme. A Chus, Ángelines y Pamela, la hora del café se hicieron más amenas con vosotras.

En el laboratorio de Farmacia, gracias a todos los que, desde el primer día en vuestro laboratorio, me habéis acogido como una más y me habéis hecho sentir parte de vuestro grupo. A Alejandro, por su ayuda y colaboración con los "papeles". A María, por ser mi guía en el laboratorio (qué habría hecho yo sin ti, jajaja), por toda la ayuda brindada y por sus divertidos momentos. A Ángela, Andrea, Xián y Fernando, así como a los técnicos Mariano y Patricia, que en un momento u otro siempre me han ofrecido su ayuda. Al resto de integrantes del grupo de investigación, que de una forma u otra habéis participado en mi experiencia en la Química Farmacéutica.

En el laboratorio de Química, a mi compañero y amigo Jorge, por las inumerables aventuras juntos en el "día real de un laboratorio". Porque juntos nos hemos convertidos en químicos, técnicos, conferenciantes, "profesores" y "manitas".

En el laboratorio del CIMUS, gracias a la profesora María Isabel Loza, por permitirme realizar parte de esta investigación en su laboratorio, y a José Manuel Ramos, por su interminable ayuda con el equipo.

Darle las gracias a la Dra. Ana M. Fernández, de la Unidad Asistencial de Drogodependencias (Monforte de Lemos) por proporcionarnos las muestras que han ayudado a completar esta tesis.

A la Xunta de Galicia por su beca de movilidad del Programa IACOBUS. Al Ministerio del Interior-DGT y fondos (FEDER) por la financiación recibida en los proyectos que me dieron la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado.

A mis amigos.

A mis "*Químicos polo mundo*" Borja, Renata y Nuria. Por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos, tanto en la facultad como fuera. Por hacer que las clases fuesen mucho más amenas y por lo mucho que he aprendido con vosotros. La etapa universitaria no hubiese sido tan divertida sin vosotros.

A mis increíbles amazonas, Lourdes y Salo. A ti, Lourdes, por enseñarme que el doctorado no es un *sprint*, sino una carrera de fondo. Por todos esos sabios consejos que me han ayudado a finalizar esta etapa. Por todas esas lecciones sobre el mundo de los caballos y por ser un referente a seguir. Como no, no puedo dejar de darte las gracias por dejarme disfrutar de los momentos de relax con Caramelo (*"o noso pitufiño"*). A Salo, que eres una persona extraordinaria. Gracias por todos tus consejos, tus anécdotas y tu ayuda en todos los momentos que la he necesitado. Gracias a ti y a Julio por todos esos buenos momentos y ese buen humor que transmitís.

A mi núcleo sólido, Anitxu, Mary, Je y Dani. Gracias por todos esos momentos de risas y diversión, por vuestro apoyo, sabiduría y ayuda. Se dice que la familia no se escoge, pero definitivamente, vosotros formáis parte de la mía.

Por último, un agradecimiento muy especial a las personas que han hecho posible que me convierta en la persona que soy. Mi familia. A mis padres y mi hermana. Gracias por el cariño, apoyo y esfuerzo que habéis realizado por mí. Por todos vuestros consejos, por aguantarme en mis malos momentos y por animarme siempre a conseguir lo que me proponía. Y a mi abuela, porque, aunque ya no esté con nosotros, esta Tesis también es suya.

Gracias a todos.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

RESUMEN xv
RESUMO xvi
ABSTRACT xvii
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS xix
JUSTIFICACIÓN 1
OBJETIVOS 4
INTRODUCCIÓN 7
1. COMPUESTOS DE INTERÉS 9
1.1. ANTIDEPRESIVOS (ATD) 9
1.1.1. ASPECTOS GENERALES 9
1.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS ATD 9
1.1.3. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LOS ATD 11
1.1.4. TOXICIDAD 12
1.2. BENZODIACEPINAS (BZD) 13
1.2.1. ASPECTOS GENERALES 13
1.2.2. CLASIFICACIÓN DE LAS BZD 13
1.2.3. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LAS BZD 14
1.2.4. TOXICIDAD 18
1.3. DROGAS DE ABUSO 19
1.3.1. ASPECTOS GENERALES, ESTRUCTURA Y PROPIEDADES 19
1.3.2. CLASIFICACIÓN DE LAS DROGAS DE ABUSO 25
1.3.3. TOXICIDAD 27
1.4. FENTANILOS 28
1.4.1. ASPECTOS GENERALES 28
1.4.2. CLASIFICACIÓN DE LOS FENTANILOS 28
1.4.3. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LOS FENTANILOS 28
1.4.4. TOXICIDAD 31
1.5. CIPROFLOXACINO Y DICLOFENACO 32
1.5.1. ASPECTOS GENERALES Y CLASIFICACIÓN 32
1.5.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES 34
1.5.3. TOXICIDAD 34
2. MATRICES BIOLÓGICAS 35
2.1. ORINA 35
2.2. PLASMA 36

2.3. FLUIDO ORAL 36
2.4. HUMOR VÍTREO 37
3. TÉCNICAS ANALÍTICAS 40
3.1. TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA 40
3.1.1. MICROEXTRACCIÓN CON ADSORBENTES EMPAQUETADOS (*MICROEXTRACTION BY PACKED SORBENT*, MEPS) 40
3.1.2. MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (*DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION*, DLLME) 45
3.1.3. *FABRIC PHASE SORPTIVE EXTRACTION* (FPSE) 51
3.1.4. DESARROLLO DE NUEVAS FASES DE EXTRACCIÓN FUNCIONALIZADAS 56
3.2. TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN 59
3.2.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA 59
3.2.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES 60
4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 62
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 81
CAPÍTULO I. DETERMINACIÓN DE ANTIDEPRESIVOS 83
A. DETERMINACIÓN DE ANTIDEPRESIVOS EN ORINA. 85
CAPÍTULO II. DETERMINACIÓN DE BENZODIACEPINAS 105
B. DETERMINACIÓN DE BENZODIACEPINAS EN PLASMA 107
C. DETERMINACIÓN DE NUEVAS BENZODIACEPINAS E HIPNÓTICOS *Z* EN PLASMA 129
CAPÍTULO III. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO 151
D. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN HUMOR VÍTREO. 153
E. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN FLUIDO ORAL. 173
CAPÍTULO IV. DETERMINACIÓN DE FENTANILOS 199
F. DETERMINACIÓN DE FENTANILOS EN FLUIDO ORAL. 201
CAPÍTULO V. PREPARACIÓN DE NUEVAS FASES DE EXTRACCIÓN 229
G. PREPARACIÓN DE NUEVAS FASES DE EXTRACCIÓN. 231
CHAPTER VI. CYTOTOXIC TESTING OF CATHINONES 257
H. CYTOTOXIC TESTING OF CATHINONES IN A HUMAN KIDNEY MODEL 259
CONCLUSIONES 271
CONCLUSIONES 273
CONCLUSIÓNS 277
CONCLUSIONS 281
ANEXOS 285

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS

4-ANPP	4-aminofenil-1-fenetilpiperidina.
4-FIBF	4-fluoroisobutirilfentanilo.
4-FMC	4-fluorometcatinona, flefedrona.
5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina.
6-MAM	6-monoacetilmorfina.
AALLME	Microextracción líquido-líquido asistida por aire.
ACN	Acetonitrilo.
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos.
AF	Acrilfentanilo.
AINE(s)	Antiinflamatorio(s) no esteroideo(s).
ANOVA	Análisis de varianza.
APCI	Ionización química a presión atmosférica.
API	Ionización a presión atmosférica.
APPI	Fotoionización a presión atmosférica.
ARC	Calculadora de recuperación absoluta.
ATC	Antidepresivos tricíclicos.
ATD	Antidepresivos.
ATR-FTIR	Espectrofotómetro de infrarrojo con reflectancia total atenuada.
BEG	Benzoilecgonina.
BIN	Aguja de inserción con cartucho
BSTFA	*N*,*O*-bistrifluoroacetamida.
BUP	Buprenorfina.
BUT	Butilona.
BZD	Benzodiacepinas.
C_{18}	Octadecil sobre sílice.
C_2	Dimetil sobre sílice.
C_2Cl_4	Tetracloetileno.
$C_2H_2Cl_4$	Tetracloroetano.

C_6H_5Cl	Clorobenceno.
C_7H_8	Tolueno.
C_8	Octil sobre sílice.
CCD	Diseño central compuesto.
CCl_4	Tetracloruro de carbono.
CD(s)	Ciclodextrina(s).
CE	Electroforesis capilar.
CH_2Br	Dibromometano.
CH_2Cl_2	Diclorometano.
CH_3Cl	Cloroformo.
CH_3COCH_3	Acetona.
$CH_3COOCH_2CH_3$	Acetato de etilo.
CH_3COOH	Ácido acético.
CH_3COONH_4	Acetato amónico.
$CHCl_3$	Cloroformo.
CI	Intervalo de confianza.
COC	Cocaína.
COCET	Cocaetileno.
CPF	Ciclopropilfentanilo.
CV	Voltaje de cono.
CW 20M	Carbowax 20M.
D-µSPE	Microextracción en fase sólida dispersiva.
DA	Dopamina.
DAD	Detector de red de diodos.
DART	Análisis directo en tiempo real.
DAT	Transportador de dopamina.
DBZD	Benzodiacepinas de diseño.
DCM	Diclorometano.
DEA	Administración de Control de Drogas de los Estados Unidos.
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
DoE	Diseño de experimentos.

DVB	Divinilbenzeno.
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales.
EDDP	2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina.
EF	Factor de enriquecimiento.
EI	Impacto electrónico.
EM	Efecto matriz.
EMA	Agencia Europea de Medicamentos.
EMCDDA	*European Monitoring Centre for Drugs Addiction*.
EMDP	2-etil-5-metil-3,3-difenilpirrolidina.
EME	Ecgonina metil éster.
ESI	Ionización por electro-*spray*.
ETCAT	Etilcatinona.
ETCATEP	Etilcatinona efedrina metabolito.
ETH	Etilona.
EtOAC	Acetato de etilo.
EtOH	Etanol.
EWS	Sistema de Alerta Temprana.
F1	Papel funcionalizado.
FASI-CZE	*Field-amplified simple injection-capillary zone electrophoresis.*
FASS-CE	*Field-amplified sample stacking-capillary electrophoresis*.
FBS	Suero bovino fetal.
FDA	Administración Americana de Alimentos y Medicamentos.
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Sulfato de hierro (II) heptahidratado.
FF	Furanilfentanilo.
FL	Fluorescencia.
FLE	Flefedrona.
FPSE	*Fabric phase sorptive extraction*.
GABA	Ácido γ-aminobutírico.

GC	Cromatografía de gases.
H_2O	Agua.
HCl	Ácido clorhídrico.
HCOOH	Ácido fórmico.
HF-LPME	Microextracción en fase líquida de fibra hueca.
Hk-2	Línea celular renal humana.
HOOH, H_2O_2	Peróxido de hidrógeno.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia.
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución.
HV	Humor vítreo.
ICH	Conferencia Internacional de Armonización para Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano.
IMAO	Inhibidor de la monoaminooxidasa.
IMS	Espectrometría de movilidad iónica.
iPrOH/IPA	Isopropanol, 2-propanol.
IRNS	Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y noradrenalina.
IS	Patrón interno.
ISRN	Inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina.
ISRS	Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina.
IT	Trampa de iones.
KH_2PO_4	Fosfato de potasio monobásico.
LC	Cromatografía líquida.
LLE	Extracción líquido-líquido.
LOD	Límite de detección.
LOQ	Límite de cuantificación.
LSD	Ácido lisérgico.

MAE	Extracción asistida con microondas.
MAF	Metoxiacetilfentanilo.
MAO	Monoaminooxidasa.
MDMA	3,4-metilendioxi-*N*-metil-anfetamina, éxtasis.
MDPV	3,4-metilendioxipirovalerona.
MECK	Cromatografía electrocinética micelar.
MeOH	Metanol.
MEP	Mefedrona.
MEPS	Microextracción con adsorbentes empaquetados.
MET	Metilona.
METEP	Metilefedrina metabolito.
METHA	Metadona.
MiAMi	Extracción micropulverizada-acetilación acuosa-microextracción con adsorbentes empaquetados.
MIPs	Polímeros de impronta molecular.
MOR	Morfina.
MRM	Monitorización de reacción múltiple.
MS	Espectrometría de masas.
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem.
MSTFA	*N*-metil-*N*-(trimetisilil)trifluoroacetamida.
MTBSTFA	*N*-tert-butildimetilsilil-*N*-metiltrifluoroacetamida.
MTMS	Metiltrimetoxisilano.
MTT	*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide.*
NaCl	Cloruro sódico.
NAL	Naloxona.
NaOH	Hidróxido sódico.
NE	Norepinefrina.
NF	Papel no funcionalizado/ papel control.
NH_3	Amoníaco.
NH_4OH	Hidróxido de amonio.
NMA	*N*-(hidroximetil)-acrilamida.
NMR	Resonancia Magnética Nuclear.

NPP	4-anilino-N-fenetil-4-piperidina.
NPS	*New psychoactive substances.*
NSP	Nuevas sustancias psicoactivas.
NSSA	Antagonistas de receptores de serotonina y noradrenalina.
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico.
OEDT	Observatorio Europeo de las drogas y las Toxicomanías.
OF	Fluido oral.
OMS	Organización mundial de la salud.
ONU	Organización de las Naciones Unidas.
OVAT	*One-variable-at-a-time.*
PALME	Extracción de membrana líquida artificial paralela.
PCL-PDMS-PCL	Poli(caprolactona-dimetilsiloxano-caprolactona).
PCP	Fenilciclohexil piperidina.
PDA	Detector de red de diodos.
PDMDPS	Poli(dimetrildifenilsiloxano).
PE	Proceso de eficacia.
PEG	Poli(etilenglicol).
PEG-PPG-PEG	Poli(etilenglicol)-poli(propilenglycol)-poli(etilenglicol).
PENT	Pentedrona.
***p*-FF**	*para*-fuorofentanilo.
PFP	Pentafluorofenilo.
PLE	Extracción con líquidos presurizados.
PRM	Monitorización de reacciones paralelas.
PS-DVB	Poliestireno-divinilbenzeno.
PTFE	Politetrafluoroetileno.
PTHF	Poli(tetrahidrofurano).
PYR	Pirovalerona.
Q	Cuadrupolo.

QC	Muestra control.
QQQ	Triple cuadrupolo.
QuEChERS	*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged & Safe*.
RCE	Energía de colisión relativa.
RF	Radiofrecuencia.
RR	Recuperación relativa.
RSD	Desviación estándar relativa.
RSM	Metodología de superficie de respuesta.
SCAN	Modo de escaneo total.
SCO	Escopolamina.
SCX	Intercambio catiónico.
SD	Desviación estándar.
SEM	Error estándar de la media.
SEM	Microscopio electrónico de barrido.
SIL	Sílice sin modificar.
SIM	Monitorización selectiva de iones.
SNC	Sistema nervioso central.
SPE	Extracción en fase sólida.
SPME	Microextracción en fase sólida.
SWGTOX	Grupo de Trabajo Científico de Toxicología Forense.
TDM	Monitorización terapéutica de fármacos.
TFA	Ácido trifluoroacético.
THC	Tetrahidrocannabinol.
THFF	Tetrahidrofuranilfetanilo.
TMS	Trimetilsilano.
TOF	Tiempo de vuelo.
tR	Tiempo de retención.
TTAB	Bromuro de tetradecil tremetil amonio.
UAE, UA	Extracción asistida de ultrasonidos.

UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución.
ULOQ	Límite superior de cuantificación.
UPLC	Cromatrografía líquida de ultra alto rendimiento.
UV	Detector ultravioleta.
UV-Vis	Detector ultravioleta-visible.
VF	Valerilfentanilo.
Z-drugs	Hipnóticos no benzodiacepínicos, hipnóticos *Z*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Consumo de antidepresivos durante los años 2000 y 2017 (o año más cercano).

Figura 2. Lista de los 20 principales compuestos involucrados (número de informes) en las presentaciones de Euro-Den Plus, 2014-2017.

Figura 3. Estructura de los ATD estudiados en esta tesis.

Figura 4. Sitios de unión funcional en el receptor $GABA_A$.

Figura 5. Estructura general de las BZD y DBZD.

Figura 6. Estructura de las *Z-drugs*.

Figura 7. Metabolismo de heroína.

Figura 8. Metabolismo de metadona.

Figura 9. Estructura de buprenorfina y naloxona.

Figura 10. Principales metabolitos de cocaína.

Figura 11. Estructuras químicas de escopolamina y atropina.

Figura 12. Estructura química de fenetilamina (A) y de catinonas (B).

Figura 13. Estructuras de los precursores (NPP y 4-ANPP) en la síntesis de fentanilo.

Figura 14. Modificaciones sobre la estructura de fentanilo.

Figura 15. Estructura general de las quinolonas.

Figura 16. Estructuras químicas de ciprofloxacino (A) y diclofenaco (B).

Figura 17. Formación de la orina.

Figura 18. Componentes de la sangre.

Figura 19. Glándulas salivales mayores: glándulas parótidas, glándulas submandibulares y glándulas sublinguales.

Figura 20. Esquema de un ojo humano.

Figura 21. Esquema de la MEPS y sus etapas.

Figura 22. Esquema de la DLLME.

Figura 23. Esquema de la FPSE.

Figura 24. Estructura de la celulosa.

Figura 25. Posiciones de la cadena celulósica que pueden sufrir oxidación.

Figura 26. Estructuras químicas de las ciclodextrinas naturales: (A) α-ciclodextrina, (B) β-ciclodextrina y (C) γ-ciclodextrina.

Figura 27. Esquema de la orientación promedio de los átomos y grupos OH más importantes en el anillo de glucopiranósido y en la CD.

Figura 1.1. Representación esquemática de los pasos involucrados en el procedimiento MEPS.

Figura 1.2. Disolventes de elución en la extracción de ATD en muestras de orina (n=3).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 1.3. Disolventes de lavado en la extracción de ATD en muestras de orina (n=3).

Figura 1.4. Gráficos de Pesos Delta (a) y Efectos Totales (b) para fluvoxamina.

Figura 1.5. Superficie de respuesta para venlafaxina (A) y sertralina (B). Gráfico 3D de deseabilidad para muestras de orina (C).

Figura 1.6. Estudio de las condiciones óptimas en los dos máximos obtenidos de las funciones de deseabilidad.

Figura 1.7. Cromatogramas MEPS-UPLC-PDA obtenidos de un blanco de orina (*línea punteada*) y orina adicionada con los antidepresivos a un nivel de concentración de 2 µg/mL.

Figura 1.8. Cromatograma de una muestra de orina conteniendo 0.405 ± 0.06 µg/mL de venlafaxina (n=2).

Figura 2.1. Estudio del disolvente de elución para las BZD en plasma (n=3).

Figura 2.2. Gráficos Pesos Delta (A) y Efectos Totales (B) para bromazepam.

Figura 2.3. Gráficos de superficie de respuesta para bromazepam (A), alprazolam (B) y tetrazepam (C), basadas en funciones de deseabilidad 2D (D) y 3D (E).

Figura 2.4. Cromatogramas de una muestra de plasma adicionada (1 µg/mL) (A) y una muestra de plasma blanco (B).

Figura 2.5. Porcentaje de casos positivos a BZD, detectadas en muestras reales de plasma.

Figura 3.1. Estudio del disolvente de elución (n=3).

Figura 3.2. Gráficos Pesos Delta (A) y Efectos Totales (B) para descloroetizolam.

Figura 3.3. Cromatogramas de una muestra de plasma blanco (*blank*) y una muestra de plasma adicionada a una concentración de 250 ng/mL (50 ng/mL del IS) de los compuestos (*addition*).

Figura 4.1. Estudio de las distintas fases móviles (n=3).

Figura 4.2. Estudio de los disolventes dispersantes en DLLME (n=3).

Figura 4.3. Estudio de los diferentes disolventes de extracción (n=3).

Figura 4.4. Gráficos Pesos Delta (*izquierda*) y Efectos Totales (*derecha*) para metilona.

Figura 4.5. Gráficos de superficie de respuesta para metilona (A), buprenorfina (B) y función de deseabilidad en 3D (C).

Figura 4.6. Estudio del pH en las condiciones óptimas (n=3).

Figura 4.7. Cromatogramas de una muestra de humor vítreo blanco (*rojo*) y una muestra de humor vítreo adicionado a 1 µg/mL de concentración de cada compuesto (*negro*) a 285 nm.

Figura 4.8. Distribución de las drogas detectadas en las 11 muestras de HV analizadas.

Figura 5.1. Cromatograma UPLC-MS/MS de una muestra de OF adicionada a un nivel de concentración de 100 µg/mL con los analitos.

Figura 5.2. Optimización del disolvente de elución. Las respuestas están expresadas como la media ± desviación estándar (n=3).

Figura 5.3. Influencia de los diferentes disolventes de lavado sobre la respuesta. Las respuestas están expresadas como la media ± desviación estándar (n=3).

Figura 5.4. Gráficos de Pesos Delta para escopolamina (A) y morfina (B). Gráficos de Efectos Totales par escopolamina (C) y morfina (D).

Figura 5.5. Respuestas estimadas de superficie para etilcatinona (A), butilona (B), naloxona (C), cocaína (D) y escopolamina (E). Función de deseabilidad global para todos los compuestos seleccionados (F).

Figura 5.6. Cromatograma UPLC-MS/MS en modo MRM de dos compuestos detectados (naloxona y buprenorfina) en la muestra real 4 de la Tabla 5.6.

Figura 6.1. Estructuras de los fentanilos estudiados en este trabajo.

Figura 6.2. Estudio experimental del tipo de fase FPSE para los fentanilos seleccionados (n=3).

Figura 6.3. Estudio del disolvente de desorción para los fentanilos estudiados (n=3).

Figura 6.4. Gráficos Pesos Delta (A) y Efectos Totales (B) para carfentanil.

Figura 6.5. Cromatogramas de una muestra de OF blanco (*rojo*) y una muestra de OF enriquecida con 1 µg/mL con los fentanilos de interés (*azul*).

Figura 6.6. Estudio de estabilidad de ciclos de congelación (-20 °C) y descongelación (Tª ambiente) para los 11 fentanilos estudiados en muestras de fluido oral (n=3).

Figura 6.7. Estudio de estabilidad en el automuestreador (20 °C ± 2) para los 11 fentanilos estudiados en muestras de fluido oral (n=3).

Figura 7.1. Esquema simplificado de preparación de β-CD-NMA y posterior injerto en papel de celulosa usando la reacción de Fenton.

Figura 7.2. Espectros FTIR de β-CD (*línea negra*) y β-CD-NMA (*línea roja*). Las líneas rojas discontinuas muestras los principales cambios máximos en 1709, 1662 y 1547 cm^{-1}.

Figura 7.3. Espectros FTIR de papel control no funcionalizado (NF) (*línea azul*) y papel funcionalizado en CD (*línea roja*) que muestran un pico adicional a 1735 cm^{-1}.

Figura 7.4. Imágenes SEM de la estructura del papel control no funcionalizado (*NF; primera fila*) y papel funcionalizado con C (*F1; segunda fila*) grabado a 1000x (*barra de escala 20 µm*) y 50000x (*barra de escala 200 nm arriba, 300 nm abajo*). El inseto en la imagen F1 se registró a 100000x (*barra de escala 200 nm*).

Figura 7.5. Adsorción de ciprofloxacino por papel control no funcionalizado (NF) y papel funcionalizado por CD (F1) de una disolución de agua (20 µg/mL).

Figura 7.6. Adsorción de ciprofloxacino por papel control no funcionalizado (NF) y papel funcionalizado (F1) de una disolución de fármaco (20 µg/mL) preparada en NaCl 0.9%.

Figura 7.7. Desorción de ciprofloxacino a partir de papel control no funcionalizado (NF) y papel funcionalizado con CD (F1) después de inmersión en agua, etanol, y HCl 10 mM (las cantidades adsorbidas se muestran en la Figura 7.5).

Figura 7.8. Adsorción de diclofenaco por papel control no funcionalizado (NF) y papel funcionalizado con CD (F1) de disoluciones de diclofenaco (40 µg/mL) preparadas en agua, NaCl 0.9% y NaCl 3.5%.

Figura 7.9. Adsorción de diclofenaco por papeles funcionalizados (F1) de disoluciones preparadas en agua a diferentes concentraciones y volúmenes de inmersión (*ver leyenda*).

Figura 7.10. Adsorción de diclofenaco por papel funcionalizado (F1) a partir de disoluciones de diclofenaco (40 µg/mL) preparadas en agua. El volumen del medio de inmersión se indica en la leyenda.

Figura 7.11. Isoterma de adsorción de diclofenaco en papel F1 (*puntos de datos*) y la adaptación del modelo de Langmuir (*línea negra*). El medio era disoluciones acuosas de NaCl 0.9% a 20 °C.

Figura 7.12. Curvas cinéticas de desorción registradas para papeles funcionalizados con CCD que previamente habían sido cargados en diclofenaco por inmersión en disoluciones preparadas en (A) agua, (B) NaCl 0.9% y (C) NaCl 3.5%. Los disolventes de extracción evaluados fueron etanol/NaOH 10 mM (50:50, v:v) (*línea roja*), acetonitrilo/NaOH 10 mM (50:50, v:v) (*línea negra*), 2-propanol (*línea azul*) y 2-propanol/NaOH 10 mM (50:50, v:v) (*línea verde*).

Figura 7.13. (A) Porcentaje de diclofenaco desorbido del papel funcionalizado CD en medio IPA/NaOH 10 mM (50:50, v:v) cuando los viales se agitaron durante varias horas (datos de izquierda de 0.1 a 24 h) o expuestos a ultrasonidos durante unos minutos (datos a la derecha de 0.1 a 15 min). Apariencia del papel funcionalizado después de (B) 10 minutos y (C) 15 minutos de exposición al ultrasonido.

Figura 7.14. Configuración para las pruebas mecánicas realizadas hasta el desgarro con papeles control (NF) y papeles funcionalizados (F1) según lo preparado y después de un ciclo completo de adsorción/elución con diclofenaco y secado al aire.

Figure 8.1. (A) Seeding of Hk-2 cells and exposure to concentrations of methylone and MDPV (in mM). The negative control is serum-free culture medium (*C- in the pink circle*) and positive control is 2% Triton (*C+ in yellow circle*). (B) An example of the MTT assay for methylone.

Figure 8.2. MTT reduction reaction.

Figure 8.3. Complete concentration-response curves obtained with the MTT reduction cytotoxicity assay for MPDV and methylone, using Hk-2 cell line after 24 h incubations at 37 °C. The blue and open circles represent data from five and six independent experiments for MDPV and methylone, respectively. The solid lines represent the regression model (logit) and the dotted lines represent the corresponding 95% CI. The *blue line* shows the EC_{50} and EC_{max} for each response curve.

Figure 8.4. Effects of MDPV on MTT reduction in Hk-2 cells. Cells were exposed for 24 h, at 37 °C, to 0.01–10 mM MDPV concentrations. Results are presented as mean ± SEM from at least five independent experiments, performed in triplicate (***p < 0.001, ****p < 0.0001 versus control).

Figure 8.5. Effects of Methylone on MTT reduction in Hk-2 cells. Cells were exposed for 24 h, at 37 °C, to 0.01–10 mM methylone concentrations. Results are presented as mean ± SEM from at least six independent experiments, performed in triplicate (*p < 0.1, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 versus control).

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los antidepresivos.

Tabla 2. Características físico-químicas de los ATD.

Tabla 3. BZD y DBZD estudiadas en esta tesis.

Tabla 4. Características físico-químicas de las BZD, DBZD e hipnóticos *Z* estudiadas.

Tabla 5. Catinonas sintéticas estudiadas en esta tesis.

Tabla 6. Características físico-químicas de las drogas de abuso abordadas en esta tesis.

Tabla 7. Convenciones Internacionales sobre la fiscalización de drogas.

Tabla 8. Estructura de los fentanilos seleccionados en esta tesis.

Tabla 9. Propiedades físico-químicas de los fentanilos.

Tabla 10. Características físico-químicas de los compuestos estudiados.

Tabla 11. Principales características de las muestras biológicas seleccionadas en esta tesis.

Tabla 12. Revisión bibliográfica de MEPS aplicada al campo toxicológico-forense.

Tabla 13. Aplicaciones de la DLLME en el campo toxicológico-forense.

Tabla 14. Revisión bibliográfica de la técnica FPSE aplicada al campo toxicológico-forense.

Tabla 1.1. Parámetros de MEPS evaluados utilizando diseño de *screening* asimétrico.

Tabla 1.2. Parámetros para la optimización de la preparación de muestra usando un diseño central compuesto.

Tabla 1.3. Resultados ANOVA: significancia (%) de los coeficientes estimados para cada analito usando CCD.

Tabla 1.4. Validación analítica del método MEPS-UHPLC-DAD en muestras de orina.

Tabla 1.5. Recuperaciones medias obtenidas para los seis antidepresivos mediante MEPS-UHPLC-DAD.

Tabla 2.1. Tiempo de retención (tR), pKa y niveles terapéutico y tóxico de las BZD estudiadas.

Tabla 2.2. Dominio experimental del diseño de *screening* y estrategia experimental.

Tabla 2.3. Estrategia experimental para el diseño experimental Doehlert.

Tabla 2.4. Coeficientes del modelo para el diseño Doehlert.

Tabla 2.5. Validación del método analítico.

Tabla 3.1. Propiedades físico-químicas de los compuestos estudiados.

Tabla 3.2. Parámetros UHPLC-MS/MS para los analitos estudiados.

Tabla 3.3. Condiciones experimentales para el diseño de cribado asimétrico $3^3 4^2 // 16$.

Tabla 3.4. Validación del método: linealidad, LOD/LOQ y precisión.

Tabla 3.5. Estudios de recuperación relativa (%RR) y eficacia del proceso (%PE) con la fase adsorbente polimérica.

Tabla 3.6. Concentraciones encontradas en las muestras analizadas en duplicado.

Tabla 4.1. Propiedades físico-químicas de las drogas de abuso estudiadas.

Tabla 4.2. Plan de experimentación del diseño de *screening* asimétrico.

Tabla 4.3. Dominio experimental y plan de experimentación del diseño CCD.

Tabla 4.4. Validación del método US-DLLME.

Tabla 4.5. Comparación de trabajos.

Tabla 5.1. Parámetros UHPLC-MS/MS para los analitos estudiados y los patrones internos.

Tabla 5.2. Condiciones experimentales para el diseño de *screening* asimétrico $3^4 4^1 // 16$ en MEPS.

Tabla 5.3. Condiciones experimentales para el diseño Doehlert en MEPS.

Tabla 5.4. LODs, LOQs, linealidad, precisión inter- e intra-día (n=4) para las 21 drogas y metabolitos en OF.

Tabla 5.5. Valores de efecto matriz (EM) y eficacia de proceso (PE) de los compuestos estudiados en OF (n=6).

Tabla 5.6. Resultados de la determinación de drogas de abuso en fluido oral por MEPS-UHPLC-MS/MS (n=2).

Tabla 6.1. Propiedades físico-químicas de los opioides sintéticos estudiados.

Tabla 6.2. Tiempos de retención y valores *m/z* para los fentanilos estudiados.

Tabla 6.3. Recuperación esperada y valores absolutos reales de recuperación para los fentanilos en los sorbentes *sol-gel* individuales.

Tabla 6.4. Plan de experimentación del diseño de *screening* asimétrico $2^3 3^3 4^1 // 16$.

Tabla 6.5. Análisis de regresión para los fentanilos estudiados.

Tabla 6.6. Validación del método FPSE-GC-MS.

Tabla 7.1. Estructura y propiedades químicas de los compuestos.

RESUMEN

El consumo de diferentes sustancias psicoactivas representa uno de los problemas sociosanitarios que afecta globalmente a la población. Estas sustancias pertenecen a un amplio grupo de compuestos, entre los que se encuentran fármacos psicotrópicos (benzodiacepinas, antidepresivos), así como diferentes drogas de abuso, desde las drogas convencionales (cocaína, heroína o cannabis) hasta las "nuevas sustancias psicoactivas, (NSP)" (catinonas, benzodiacepinas de diseño, opioides sintéticos, etc). Además, estas nuevas sustancias psicoactivas se caracterizan por tener propiedades químicas y/o farmacológicas similares a las sustancias controladas internacionalmente, por lo que no están dentro de los convenios de fiscalización. Por otro lado, entre los consumidores de estas sustancias emergentes, la prevalencia de consumo de sustancias psicoactivas tradicionales es elevada. Por lo tanto, el desarrollo de métodos analíticos capaces de identificar y cuantificar estas sustancias es un desafío constante para los laboratorios, en el campo clínico y/o forense.

El objetivo principal de esta tesis abarca el desarrollo de metodologías analíticas rápidas, eficientes y robustas para el control de psicofármacos y drogas de abuso emergentes en matrices biológicas de interés toxicológico, como orina, plasma, fluido oral y humor vítreo. Para ello, se emplearon técnicas de extracción miniaturizadas (microextracción con adsorbentes empaquetados, MEPS; microextracción líquido-líquido dispersiva, DLLME; y *fabric phase sorptive extraction*, FPSE), que permiten reducir el uso tanto de reactivos como de muestra biológica, y el posterior análisis mediante cromatografía (líquida o de gases) con detectores de red de diodos o espectrometría de masas.

Esta memoria se estructura en seis capítulos, donde se exponen detalladamente los resultados obtenidos en el desarrollo y validación de estas metodologías analíticas, para la determinación de antidepresivos (**Capítulo I**), benzodiacepinas convencionales, de diseño e hipnóticos *Z* (**Capítulo II**), drogas de abuso convencionales y NSP (**Capítulo III**), y opioides sintéticos (**Capítulo IV**). Se ha estudiado la preparación de una nueva fase de extracción basada en la funcionalización de papel de filtro de celulosa con ciclodextrinas (**Capítulo V**). Además, se ha realizado un estudio preliminar para evaluar la citotoxicidad *in vitro* de dos catinonas sintéticas utilizando un modelo de células humanas renales (**Capítulo VI**).

RESUMO

O consumo de diferentes substancias psicoactivas representa un dos problemas sociosanitarios que afecta á poboación a nivel mundial. Estas substancias pertencen a un amplo grupo de compostos, entre os que se atopan fármacos psicotrópicos (benzodiacepinas, antidepresivos), así coma diferentes drogas de abuso, dende as drogas convencionais (cocaína, heroína ou cannabis) ata as "novas substancias psicoactivas, (NSP)" (catinonas, benzodiacepinas de deseño, opioides sintéticos, etc). Ademais, estas novas substancias psicoactivas caracterízanse por ter propiedades químicas e/ou farmacolóxicas similares ás substancias controladas internacionalmente, razón pola que non están dentro dos acordos de control. Por outra banda, entre os consumidores destas substancias emerxentes, a prevalencia do consumo de substancias psicoactivas tradicionais é elevada. Polo tanto, o desenvolvemento de métodos analíticos capaces de identificar e cuantificar estas substancias é un reto constante para os laboratorios, no campo clínico e/ou forense.

O obxectivo principal desta tese abrangue o desenvolvemento de metodoloxías analíticas rápidas, eficientes e robustas para o control de psicofármacos e drogas de abuso emerxentes en matrices biolóxicas de interese toxicolóxico, como urina, plasma, fluído oral e humor vítreo. Para iso empregáronse técnicas de extracción miniaturizadas (microextracción con adsorbentes empaquetados, MEPS; microextracción líquido-líquido dispersiva, DLLME; e *fabric phase sorptive extraction*, FPSE), que reducen o uso de reactivos e mostra biolóxica e a posterior análise por cromatografía (líquida ou gas) con detectores de rede de díodos ou espectrometría de masas.

Esta memoria estrutúrase en seis capítulos, onde se expoñen os resultados obtidos no desenvolvemento e validación destas metodoloxías analíticas para a determinación de antidepresivos (**Capítulo I**), benzodiacepinas convencionais, de deseño e hipnóticos *Z* (**Capítulo II**), drogas de abuso convencionais e NSP (**Capítulo III**), e opioides sintéticos (**Capítulo IV**). Estudouse a preparación dunha nova fase de extracción baseada na funcionalización do papel de filtro de celulosa con ciclodextrinas (**Capítulo V**). Ademais, levouse a cabo un estudo preliminar para avaliar a citotoxicidade *in vitro* de dúas catinonas sintéticas usando un modelo de células renais humanas (**Capítulo VI**).

ABSTRACT

The use of different psychoactive substances represents one of the social and health problems affecting the population as a whole. These substances belong to a broad group of compounds, including psychotropic drugs (benzodiazepines, antidepressants), as well as different drugs of abuse, from as other major drugs such as cocaine, heroin or cannabis to "new psychoactive substances, (NPS)" (cathinones, designer benzodiazepines, synthetic opioids, etc). In addition, these new psychoactive substances are characterized by chemical and/or pharmacological properties similar to internationally controlled substances and are therefore not within the control conventions. On the other hand, among users of these emerging substances, the prevalence of traditional psychoactive substance use is high. Therefore, the development of analytical methods capable of identifying and quantifying these substances is a constant challenge for laboratories, in the clinical and/or forensic field.

The main objective of this thesis covers the development of fast, efficient, and robust analytical methodologies for the control of psychotropic drugs and emerging abuse drugs in biological matrices of toxicological interest, such as urine, plasma, oral fluid, and vitreous humor. Miniaturized extraction techniques (microextraction by packed sorbent, MEPS; dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME; and fabric phase sorptive extraction, FPSE) were used to reduce the use of both reagents and biological samples, and subsequent analysis by chromatography (liquid or gas) with diode array detectors or mass spectrometry.

This dissertation is structured in six chapters, where the results obtained in the development and validation of these analytical methodologies for the determination of antidepressants (**Chapter I**), conventional benzodiazepines, designer benzodiazepines and Z-hypnotics (**Chapter II**), conventional abuse drugs, and NPS (**Chapter III**), and synthetic opioids (**Chapter IV**). The preparation of a new extraction phase based on the functionalization of cellulose filter paper with cyclodextrins (**Chapter V**) has been studied. In addition, a preliminary study has been conducted to evaluate the in vitro cytotoxicity of two synthetic cathinones using a renal human cell model (**Chapter VI**).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

JUSTIFICACIÓN

El consumo de compuestos psicoactivos está relacionado con la aparición de efectos crónicos nocivos y síntomas de deterioro congnitivo asociados con la calidad de vida de la población. El desarrollo de nuevas metodologías analíticas se considera un enfoque apropiado que contribuye a la evaluación de riesgos de nuevas sustancias psicoactivas y otros fármacos psicotrópicos.

Los antidepresivos son de los fármacos más consumidos en la actualidad. El consumo de antidepresivos se duplicó en los países de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) en las últimas dos décadas. Islandia, Australia y Canadá encabezan los países con las cifras más elevadas en el consumo de antidepresivos. Así mismo, España también se sitúa entre los países con los datos de consumo por encima de la media OCDE (**Figura 1**) [1]. Precisamente, en España, el consumo se triplicó entre los años 2000 y 2013, al pasar de 26.5 a 79.5 dosis por mil habitantes, lo que representa un incremento del 200% [2].

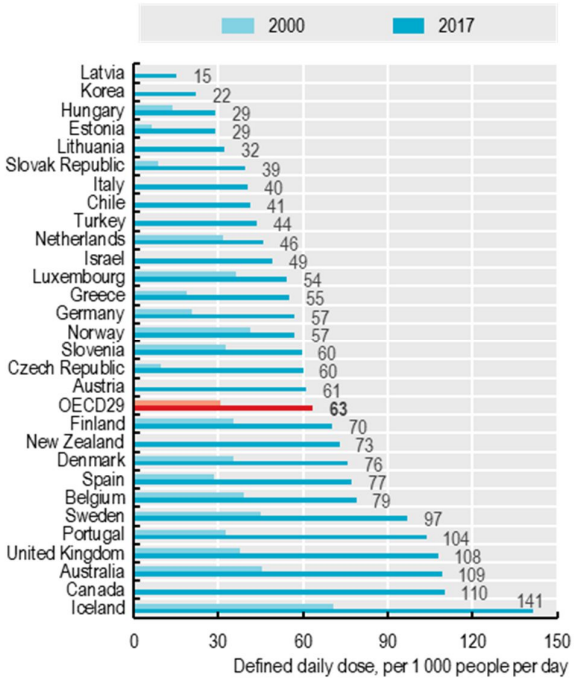


Figura 1. Consumo de antidepresivos durante los años 2000 y 2017 (o año más cercano) (Con permiso de OECD [1]).

Por otro lado, se estima que 96 millones de adultos europeos (entre 15-64 años), aproximadamente el 29% de la población, han consumido algún tipo de droga en su vida. El consumo de drogas en Europa abarca una amplia gama de sustancias, desde las drogas más tradicionales o consolidadas (cannabis, cocaína, heroína y otros estimulantes) a nuevas sustancias psicoactivas de reciente aparición en el mercado ilícito (catinonas, cannabinoides sintéticos, opioides sintéticos, nuevas benzodiacepinas, etc) [3]. El Observatorio Europeo de Drogas y Toxicomanías (OEDT) monitorizaba alrededor de 790 nuevas sustancias psicoactivas al final del año 2019, de las cuales, 53 fueron notificadas por primera vez en Europa en 2019 y 38 en 2020 [3, 4]. De entre estas nuevas sustancias psicoactivas, el OEDT supervisa actualmente 30 nuevas benzodiacepinas, 21 de las

cuales se detectaron por primera vez en Europa desde 2015. En algunos países, este tipo de compuestos se ha asociado con un mayor riesgo de sobredosis. Otro grupo de sustancias que presentan un riesgo muy alto de intoxicación para los consumidores son los nuevos opioides sintéticos. Desde 2009, se han detectado 66 nuevos opioides sintéticos en el mercado europeo de drogas, incluidos 8 compuestos notificados por primera vez en 2019 y 9 en 2020. Sin embargo, la heroína sigue siendo el opioide más consumido, aunque otros como metadona, buprenorfina, tramadol y los derivados de fentanilo también están disponibles en el mercado ilícito. Los opioides, principalmente heroína o sus metabolitos, a menudo en combinación con otras sustancias, están presentes en la mayoría de las sobredosis, con consecuencias fatales, notificadas en Europa. Además, entre 2016 y 2020, más de 250 muertes estuvieron relacionadas con los derivados de fentanilo, según informes del Sistema de Vigilancia Temprana Europea (*EU Early Warning System*), mientras que se notificaron numerosos fallecimientos en los Estados Unidos y Canadá [3, 4]. La cocaína es la segunda droga ilícita más consumida en Europa. Un análisis de las aguas residuales municipales realizado en 2019, encontró las cargas masivas más altas de benzoilecgonina, el principal metabolito de la cocaína, en ciudades de Bélgica, España, los Países Bajos y el Reino Unido. Además, la cocaína forma parte de las drogas comúnmente involucradas en emergencias agudas notificadas en 2018 por la red de centros de emergencia, junto con cannabis y heroína [3]. De las 20 drogas notificadas con mayor frecuencia en el periodo de 2014 y 2017, cuatro son benzodiacepinas (clonazepam, "benzodiacepina desconocida o no especificada", diazepam y alprazolam), con un total de 3513 notificaciones, y clonazepam es el séptimo fármaco notificado con mayor frecuencia (**Figura 2**) [5]. Esto muestra la importancia de este grupo de compuestos con respecto a las intoxicaciones agudas relacionadas con las drogas. Se informa con frecuencia de otros compuestos, incluida metadona, y zopiclone. También figuran en la lista de las drogas identificadas con mayor frecuencia, mefedrona y cannabinoides sintéticos [5].

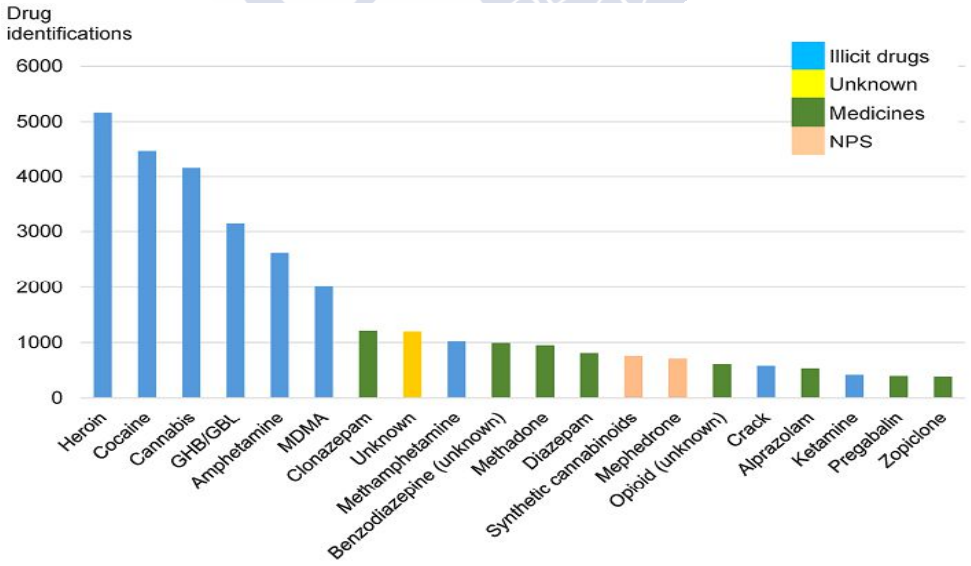


Figura 2. Lista de los 20 principales compuestos involucrados (número de informes) en las presentaciones de Euro-Den Plus, 2014-2017 (Con permiso de OEDT [5]).

La aparición continua y el elevado consumo de estas sustancias justifica la necesidad de actualizar las metodologías analíticas para su análisis en diferentes matrices biológicas. En los campos clínico, toxicológico y forense, la preparación de muestra para su análisis es importante, debido a la naturaleza compleja de la matriz, y a las características de los analitos de interés. Las muestras biológicas más utilizadas para el análisis toxicológico son la sangre (o el plasma sanguíneo) y la orina. La sangre, o el plasma, tiene la ventaja de que indica una relación directa entre el consumo y el efecto de la droga correspondiente. La orina es idónea para los análisis cualitativos, que proporcionan resultados sobre la presencia/ausencia de drogas en el individuo, debido a las altas concentraciones de compuesto que pueden hallarse en esta matriz. Existen otras muestras biológicas utilizadas de forma alternativa a las mencionadas, tales como, la saliva que es muy utilizada en casos de vigilancia de tráfico rodado, y el humor vítreo en autopsias. Por ello, se han utilizado estas cuatro muestras biológicas durante la realización de esta tesis.

Las drogas y sus metabolitos están presentes, generalmente, en niveles traza en los fluidos biológicos. Además, la cantidad de muestra disponible es limitada, por consiguiente, las técnicas de microextracción han surgido como alternativas a las metodologías tradicionales de preparación de muestra, ya que, se reducen los recursos (muestra, reactivos, tiempo de análisis y costes) siguiendo los principios de la Química Verde. Las técnicas miniaturizadas de extracción como la microextracción con adsorbentes empaquetados (MEPS), microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) o la extracción con fases funcionalizadas (*fabric phase sorptive extraction*, FPSE), han sido utilizadas en la elaboración de esta memoria. También se requiere de metodologías analíticas adecuadas para la correcta separación y cuantificación, que proporcionen datos precisos, específicos, y exactos, como los métodos cromatográficos. Las técnicas analíticas seleccionadas en esta tesis han sido: la cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a detector de red de diodos (UHPLC-DAD) o a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS), y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Por otro lado, el uso de las sustancias psicoactivas en la adolescencia incrementa las posibilidades de sufrir deterioro cognitivo en la edad adulta. Los posibles efectos crónicos para la salud del uso prolongado de estas drogas siguen siendo en su mayoría desconocidos y puede conducir al deterioro de la conducta y alteraciones en el funcionamiento de los receptores cerebrales acelerando o aumentando la gravedad de las alteraciones neurocognitivas asociadas a envejecimiento activo de la población [6-8]. Por eso es importante la prevención, el control y la evaluación toxicológica de este tipo de compuestos. Por ejemplo, no existen datos epidemiológicos sobre los efectos a largo plazo de las catinonas sobre la salud, por eso es interesante llevar a cabo estudios de toxicidad *in vitro* y metabólicos de estos compuestos psicoactivos. Los resultados obtenidos pueden proporcionar información sobre los metabolitos que se asocian indirectamente a la toxicidad, con el fin de conocer posteriores deterioros cognitivos que afecten a la calidad de vida y al envejecimiento saludable.

OBJETIVOS

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo de metodologías analíticas rápidas, eficientes y robustas para la determinación de psicofármacos y drogas de abuso emergentes en matrices biológicas de interés toxicológico, utilizando cromatografía líquida y de gases. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollo y validación de metodologías analíticas basadas en la microextracción con adsorbentes empaquetados para la determinación de antidepresivos en muestras de orina. Este objetivo se desarrollará en el **Capítulo I**.
2. Desarrollo y validación de metodologías analíticas basadas en microextracción con adsorbentes empaquetados para la determinación de benzodiacepinas e hipnóticos *Z*. Dichas metadologías se aplicarán a la determinación de los compuestos en muestras de plasma. Este objetivo se desarrollará en el **Capítulo II**.
3. Desarrollo y validación de metadologías analíticas basadas en la microextracción líquida-líquida dispersiva y microextracción con adsorbentes empaquetados para la determinación de drogas de abuso en muestras de humor vítreo y de fluido oral. Este objetivo se desarrollará en el **Capítulo III**.
4. Desarrollo y validación de metodologías analíticas basadas en la extracción con fases funcionalizadas (FPSE) para la determinación de fentanilo y derivados sintéticos en muestras de fluido oral. En el **Capítulo IV** se desarrollará este objetivo.
5. Preparación de nuevas fases de microextracción en formato plano basada en la funcionalización de papel de filtro de celulosa con ciclodextrinas para la extracción de compuestos bioactivos en muestras acuosas. Este objetivo se alcanzará en el **Capítulo V**.
6. Evaluación y caracterización del potencial citotóxico *in vitro* de catinonas sintéticas mediante un modelo de células humanas renales. En el **Capítulo VI** se desarrollará este objetivo.

Como objetivos transversales se han considerado:

- Optimización de las condiciones de extracción mediante diseño de experimentos.
- Combinación de las técnicas de preparación de muestra con técnicas cromatrográficas de determinación, utilizando diferentes sistemas de detección.
- Aplicación de las metodologías propuestas en el análisis de diferentes matrices biológicas de interés toxicológico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] OECD, Pharmaceutical consumption, en: Health at a Glande 2019: OECD Indicators, OECD Publishing, París. 2019. https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/4dd50c09-en.pdf?expires=1611619552&id=id&accname=guest&checksum=A3D461428454B24260319DF77A69256A (acceso mayo 2021).

[2] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Utilización de medicamentos antidepresivos en España durante el periodo 2000-2013. Informe de Utilización de Medicamentos U/AD/V1/14012015. https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/antidepresivos-2000-2013.pdf (acceso mayo 2021).

[3] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, European Drug Report 2020: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2020. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13236/TDAT20001ENN_web.pdf (acceso mayo 2021).

[4] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, New psychoactive substances: global markets, glocal threats and the COVID-19 pandemic. An update from the EU Early Warning System (December 2020), Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2020. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13464/20205648_TD0320796ENN_PDF_rev.pdf (acceso mayo 2021).

[5] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Drug-related hospital emergency presentations in Europe: update from the Euro-DEN Plus expert network, Technical report, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2020. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/12725/TD02AY20001ENN.pdf (acceso mayo 2021).

[6] Kamińska K., Noworyta-Sokołowska K., Górska A., Rzemieniec J., Wnuk A., Wotjas A., Kreiner G., Kajta M., Gołembiowska K., The Effects of Exposure to Mephedrone During Adolescence on Brain Neurotransmission and Neurotoxicity in Adult Rats, *Neurotox. Res*. 2018, *34*, 525–537.

[7] Feio-Azevedo R., Costa V.M., Barbosa D.J., Teixeira-Gomes A., Pita I., Gomes S., Pereira F.C., Duarte-Araújo M., Duarte J.A., Marques F., Fernandes E., Bastos M.L., Carvalho D., Capela J.P., Aged rats are more vulnerable than adolescents to "ecstasy"-induced toxicity, *Arch. Toxicol*. 2018, *92*, 2275–2295.

[8] Luikingaet S.L., Kim J.H., Perry C.J., Developmental perspectives on methamphetamine abuse: Exploring adolescent vulnerabilities on brain and behavior, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2018, *87*, 78–84.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. COMPUESTOS DE INTERÉS

1.1. ANTIDEPRESIVOS (ATD)

1.1.1. ASPECTOS GENERALES

La depresión es un trastorno mental que afecta a aproximadamente a unos 350 millones de personas en todo el mundo. Esta enfermedad es el resultado de una compleja interacción de factores sociales, psicológicos y biológicos. Dependiendo de los síntomas, un episodio depresivo puede ser clasificado como leve, moderado o grave. Durante un episodio depresivo leve, una persona tendrá algunas dificultades para continuar con el trabajo ordinario y las actividades sociales. La depresión grave se caracteriza por la incapacidad del paciente de continuar con el trabajo social o las actividades domésticas. En los casos más graves puede conducir al suicidio [1, 2]. Acualmente, no se conocen cuáles son realmente los mecanismos patogénicos de los trastornos de depresión. Sin embargo, una de las primeras hipótesis formuladas data de 1965, la cual establecía que la depresión se debía a una deficiencia funcional de la transmisión monoaminérgica de una o más de las aminas biógenas (serotonina, noradrenalina y/o dopamina) [3, 4]. La 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) es una amina biógena compuesta por un anillo indólico y una cadena lateral etilamina. Uno de los sitios que el que se localiza y se sintetiza este compuesto es en las neuronas serotonérgicas del sistema nervioso central (SNC). La serotonina es almacenada en estructuras vesiculares que la protegen de la acción de enzimas intracelulares, como la monoaminooxidasa (MAO). La noradrenalina y la dopamina son compuestos naturales pertenecientes a las catecolaminas que poseen un grupo aromático común 3,4-dihidroxifenilo o catecol y una cadena lateral etilamina con diversas modificaciones [5].

Los primeros fármacos empleados como antidepresivos aparecen a principios de la década de 1950. En 1951 se descubre isoniazida, un potente agente antituberculoso. En 1952, se sintetizó un derivado isopropil de isoniazida, denominado iproniazida y con actividad tuberculostática. Zeller y sus colaboradores [6] descubrieron la capacidad de iproniazida de inhibir la enzima MAO. Este compuesto se convertiría en el primer antidepresivo conocido que formaría parte del primer grupo de fármacos específicamente antidepresivos, conocido como IMAO (inhibidores de la monoaminooxidasa). Imipramina es un derivado iminodibenzílico evaluado inicialmente como antihistamínico en 1950. Es un compuesto tricíclico de estructura similar a las fenotiazinas, y que demostró su acción antidepresiva. En 1958, se comercializó bajo el nombre comercial de Tofranil®, convirtiéndose en el primer representante de la familia de antidepresivos imipramínicos o tricíclicos (ATC) [4, 7]. Los IMAO y los ATC están considerados como los antidepresivos de primera generación. Los ATC tienen numerosos efectos secundarios y presentan un bajo margen de seguridad [3]. Por ello, décadas más tarde surgieron los antidepresivos de nueva generación, incluyendo los inhibidores de recaptación selectiva de serotonina (ISRS) y los inhibidores de recaptación selectiva de serotonina y noradrenalina (IRNS). Estos antidepresivos se caracterizan por ser más seguros y tener baja toxicidad, con respecto a los IMAO y a los ATC [8].

1.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS ATD

Los antidepresivos se clasifican según su mecanismo de acción, debido a su diversidad estructural (**Tabla 1**) [2-4, 9]. En general, los antidepresivos actúan sobre los sistemas de neurotransmisores afectando a tres procesos: degradación, recaptación o unión de neurotransmisores. La mayoría de ellos actúan inhibiendo la recaptación de los

neurotransmisores monoaminérgicos, es decir, aumentando las monoaminas cerebrales (serotonina, noradrenalina y, en menor medida, dopamina) [2]:

- **Inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina (IRNS)**.

Se distinguen entre *no selectivos* y *selectivos* [2]. Los IRNS *no selectivos* son los antidepresivos tricíclicos. Bloquean la recaptación de las aminas biógenas noradrenalina y serotonina en mayor o menor grado. Se caracterizan por tener una estructura de tres ciclos condensados, aunque se han desarrollado nuevos compuestos mono- y tetracíclicos. Los IRNS *selectivos* se caracterizan por tener propiedades inhibitorias de la recaptación de serotonina, noradrenalina y, en menor medida, de dopamina. Venlafaxina pertenece a este grupo de antidepresivos [2, 3].

- **Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS)**.

Componen un grupo heterogéneo de compuestos, con efectos terapéuticos muy próximos al de los antidepresivos tricíclicos. Son estructuralmente diferentes entre sí, pero comparten el mismo mecanismo de acción: su potente inhibición de la recaptación de serotonina. Además, a diferencia de los antidepresivos tricíclicos, no tienen prácticamente efectos inhibitorios en los receptores histaminérgicos, adrenérgicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos o colinérgicos, mejorado así su seguridad. Pertenecen a este grupo fluoxetina, fluvoxamina, citalopram y sertralina [2-4].

- **Antidepresivos noradrenérgicos y serotoninérgicos específicos (NSSA)**.

Pertenece a este grupo mirtazapina. No ejerce su actividad sobre los mecanismos de recaptación de la serotonina o noradrenalina, difiriendo así del de venlafaxina, los antidepresivos tricíclicos o los ISRS. Su acción la lleva a cabo a través del bloqueo de los autorreceptores α_2 presinápticos, facilitando la liberación de 5-HT y noradrenalina en la sipnasis [3, 4].

Tabla 1. Clasificación de los antidepresivos.

MECANISMO DE ACCIÓN		PRINCIPALES ATD
Inhibidores de la monoaminooxidasa (IMAO)	Irreversibles	Iproniazida, fenelcina, tranilcipromida
	Reversibles	Moclobemida
Inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina	No selectivos	Tricíclicos: imipramina, amitriptilina, clomipramina, trimipramina
	Selectivos (IRNS)	Venlafaxina
Inhibidores seletivos de la recaptación de serotonina (ISRS)		Fluoxetina, fluvoxamina, citalopram, sertralina
Inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina (ISRN)		Reboxetina
Inhibidores de la recaptación de dopamina (y noradrenalina)		Bupropión (e hidroxibupropión)
Antagonistas de receptores de serotonina y noradrenalina (NSSA)		Mirtazapina

1.1.3. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LOS ATD

Los antidepresivos constituyen un grupo heterogéneo estructuralmente, tal como se observa en la **Figura 3**. Mirtazapina es un compuesto tetracíclico racémico perteneciente al grupo de las piperazinoazepinas y el primer antidepresivo serotoninérgico y noradrenérgico específico. El (*S*)-enantiómero se conoce como esmirtazapina [10, 11]. Venlafaxina es un compuesto racémico perteneciente a la familia de las feniletilaminas. Comercialmente, está disponible la mezcla de las respectivas sales de clorhidrato [12, 13]. Escitalopram es el (*S*)-enantiómero activo de citalopram [14], compuesto por un grupo 4-fluorofenilo y un grupo *N*,*N*-dimetil-3-aminopropilo. La estructura química de fluoxetina pertenece a las fenilpropilaminas, mientras que fluvoxamina es un compuesto derivado de las araquilcetinas. Sertralina posee dos centros quirales, comercializándose sólo uno de los enántiómeros (1*S*, 4*S*) [12, 15].

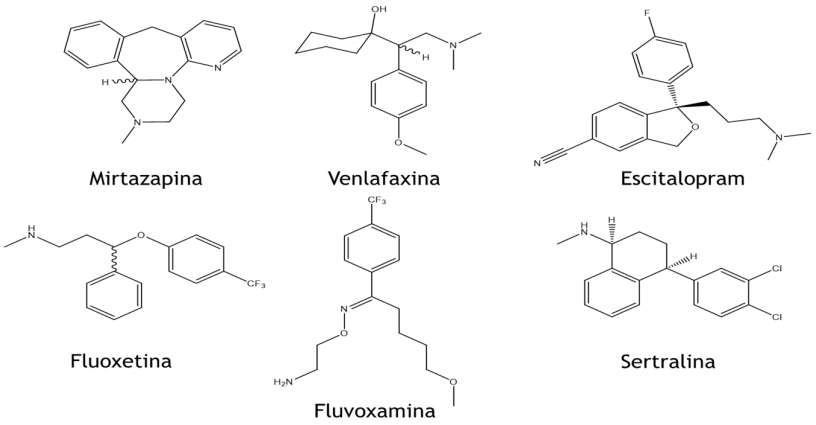


Figura 3. Estructura de los ATD estudiados en esta tesis.

Tabla 2. Características físico-químicas de los ATD.

Compuesto	Nombre IUPAC	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	pKa	Log P
Mirtazapina	(*RS*)-2-Methyl-1,2,3,4,10,14b-hexahydropyrazino[2,1-a]pyrido[2,3-c][2]benzazepine	$C_{17}H_{19}N_3$	265.36	8.10	0.88
Venlafaxina	(*RS*)-1-[2-dimethylamino-1-(4-methoxyphenyl)-ethyl]cyclohexanol	$C_{17}H_{27}NO_2$	277.40	14.84	2.47
Escitalopram	(*S*)-1-[3-[Dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carbonitrile	$C_{20}H_{21}FN_2O$	324.40	9.57	3.47
Fluoxetina	*N*-methyl-3-phenyl-3-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]propan-1-amine	$C_{17}H_{18}F_3NO$	309.33	10.0	3.93
Fluvoxamina	2-[(*E*)-[5-methoxy-1-[4-(trifluoromethyl)phenyl]pentylidene]amino]oxyethanamine	$C_{15}H_{21}F_3N_2O_2$	318.34	9.39	3.71
Sertralina	(1*S*,4*S*)-4-(3,4-Dichlorophenyl)-*N*-methyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-amine	$C_{17}H_{17}Cl_2N$	306.23	9.47	5.08

1.1.4. TOXICIDAD

Los antidepresivos ISRS son usados ampliamente en los trastornos depresivos y de ansiedad [12] y tienen un amplio margen terapéutico. Se suelen prescribir en combinación con otros fármacos, lo cual puede causar interacciones farmacológicas. Aunque son más seguros que los ATC y los IMAO, pueden tener efectos secundarios adversos derivados del tratamiento antidepresivo a largo plazo o un síndrome de abstinencia, que incluye síntomas como mareos, somnolencia, ansiedad, agitación, irritabilidad y pérdida de concentración [8, 16, 17]. Generalmente, las muertes por sobredosis de este tipo de compuestos se producen en concentraciones superiores al rango terapéutico [18] o por la presencia de otras sustancias, atribuyéndose la muerte a la intoxicación por la acción de múltiples psicofármacos [19]. Es poco frecuente que se produzca la muerte por intoxicación exclusiva de un fármaco de este grupo [20].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2. BENZODIACEPINAS (BZD)

1.2.1. ASPECTOS GENERALES

Las benzodiacepinas (BZD) son un gran grupo de fármacos que se introdujeron en la práctica médica en la década de 1960. Tienen efectos ansiolíticos, sedantes, hipnóticos, relajantes musculares y anticonvulsivos, por ello se prescriben ampliamente en todo el mundo [21, 22]. La primera BZD se sintetizó por extensión del anillo de un derivado de 3-óxido de quinazolina mediante la síntesis de Sternbach en 1955 [23]. Clordiazepóxido (Librium®) fue la primera BDZ utilizada en tratamientos médicos, introducida en el mercado en 1960, después diazepam (Valium®) en 1963, y en 1965 oxazepam (Serax®) [24, 25].

El Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (OEDT) es la agencia europea encargada de proporcionar información real, objetiva, fiable y comparable a escala europea sobre las drogas, las toxicomanías y sus consecuencias [26]. Este organismo monitoriza y vigila las distintas sustancias en el mercado de las drogas con objeto de asesorar la elaboración de políticas en la materia y guiar las iniciativas de lucha contra la droga. Muchas de las nuevas sustancias psicoactivas (NSP) monitorizadas por el OEDT son derivados de cannabinoides sintéticos o catinonas sintéticas, fenetilaminas, triptaminas y piperazinas [27]. Entre estas NSP, destacan las benzodiacepinas de nuevo diseño o "*designer benzodiazepines*" (DBZD), de rápido crecimiento en el mercado ilícito en los últimos años [28-32]. Las DBZD, a menudo, se han descrito en la literatura científica o de patentes como compuestos que fueron explorados por compañías farmacéuticas, pero que nunca se convirtieron en medicamentos [33]. La primera benzodiacepina catalogada como una NSP por el OEDT fue fenazepam en 2007 [34, 35], después etizolam en 2011 [36]. Estas benzodiacepinas están aprobadas en algunos países, pero a menudo se usan incorrectamente en otros. Fenazepam se desarrolló en la Unión Soviética en la década de 1970 [37] y todavía está aprobado para su uso en Rusia y otros antiguos estados soviéticos [38]. Etizolam se introdujo por primera vez en Japón y también está aprobado en India e Italia [39, 40]. Las primeras DBZD representativas fueron pirazolam, flubromazolam y diclazepam [41, 42]. Recientemente, otras cinco DBZD (meclonazepam, descloroetizolam, flubromazolam, nifoxipam y clonazolam) fueron incluidas en el informe del OEDT, ninguna de las cuales ha sido aprobada para uso médico en ningún país [32, 38, 43, 44].

Los hipnóticos no benzodiacepínicos (hipnóticos *Z* o *Z-drugs*) son compuestos empleados como fármacos en los trastornos del sueño, como el insomnio [45]. El nombre del grupo hace referencia a la primera letra por la que empiezan estos compuestos: zopiclone, zaleplon y zolpidem [45, 46]. Las *Z-Drugs* fueron desarrolladas a finales de 1980 e inicios de 1990. Zopiclone fue el primer compuesto sintetizado en 1980 para el tratamiento del insomnio [47]. Zolpidem fue sintetizado a principios de la década de 1990 por Synthelábo Recherche [46] e induce al sueño rápidamente. En 1999 se comercializó zaleplon. Más tarde, en 2005, se comercializó eszopiclone, un enantiómero de zopiclone.

1.2.2. CLASIFICACIÓN DE LAS BZD

El aminoácido no proteico ácido γ-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central de los mamíferos y, por lo tanto, reduce la excitabilidad de las neuronas. Hay tres subtipos principales de receptores de GABA, designadas como $GABA_A$, $GABA_B$ y $GABA_C$. Las BZD se unen a los receptores $GABA_A$ ubicados en las membranas neuronales del SNC (**Figura 4**). Al

unirse, inducen un cambio conformacional en el receptor, permitiendo a GABA que se una a dicho receptor. No todas las BZD interactúan con el mismo tipo de receptor o con igual afinidad. Estas diferencias en las isoformas de una subunidad, la afinidad del tipo de receptor y la ubicación dentro del sistema nervioso central explican los diferentes efectos farmacológicos de las diferentes BZD [48-52]. Hasta el momento no existen datos publicados sobre las propiedades farmacodinámicas o de unión a receptores de las DBZD [53], aunque probablemente interactúan de manera similar a las benzodiacepinas tradicionales [39], al igual que las *Z-drugs* (**Figura 4**) [45, 54, 55]. Sin embargo, las *Z-drugs* producen respuestas farmacodinámicas diferentes a las BZD, debido a sus distintas especificidades con las isoformas del receptor $GABA_A$ [46, 54].

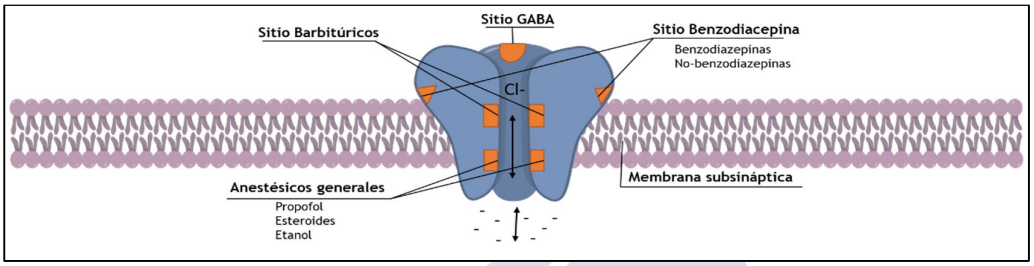


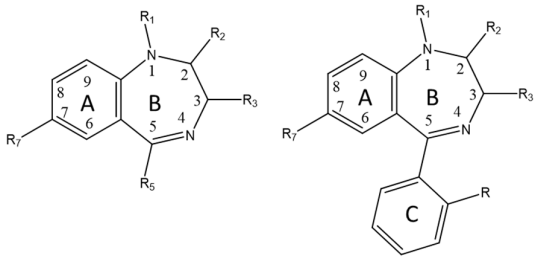
Figura 4. Sitios de unión funcional en el receptor $GABA_A$.

Las benzodiacepinas se pueden clasificar en función de tres criterios: la duración de la acción farmacológica, atendiendo a sus propiedades farmacocinéticas y en base a su estructura química. Según la duración de la acción farmacológica, las benzodiacepinas se clasifican como benzodiacepinas de duración corta (si la duración del efecto es menor de 24 h) o de duración prolongada (si el efecto se prolonga más de 24 h). Atendiendo a sus propiedades farmacocinéticas, incluído el tiempo medio de eliminación ($t_{1/2}$), se clasifican como benzodiacepinas de acción ultra corta ($t_{1/2} < 6$ h), corta ($t_{1/2}$ 6 h), intermedia ($t_{1/2}$ 6-24 h) y larga ($t_{1/2} > 24$ h). Finalmente, las benzodiacepinas se pueden clasificar en base a su estructura química como 1,4-benzodiazepinas, triazolobenzodiazepinas o tienotriazolodiazepinas. Las *Z-drugs* aprovechan la estructura química básica de las benzodiacepinas, pero son estructuralmente distintas de la estructura del anillo de las benzodiacepinas [39, 40].

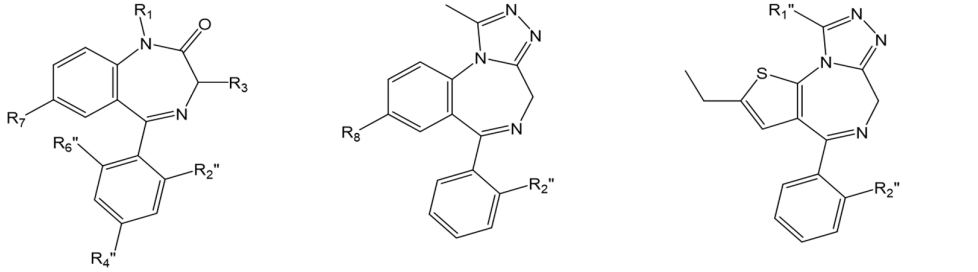
1.2.3. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LAS BZD

Las benzodiacepinas son compuestos lipofílicos, con coeficientes de partición octanol-agua relativamente altos. En la forma ácida/básica libre, las BZD son generalmente solubles en la mayoría de disolventes orgánicos como acetato de etilo, cloroformo, etil éter o metanol, pero prácticamente insolubles en agua [22, 51, 56-58]. Estructuralmente, son compuestos heterocíclicos bicíclicos. Están formados por un anillo de benceno (A) que está unido al enlace C_6-C_7 de un anillo de diazepina de siete miembros (B) que contiene dos átomos de nitrógeno. Existen diferentes tipos de estructuras de BZD, dependiendo de la posición de los dos átomos de nitrógeno en el anillo de diazepina. Las BZD clásicas están basadas en una estructura 1,4-benzodiazepina, donde los nitrógenos están en la posición 1 y 4 en el anillo de la diazepina. Generalmente, las BZD de relevancia farmacológica poseen también un anillo arilo (C) unido en la posición 5 del anillo de diazepina (**Figura 5**). El sustituyente arilo en la posición 5 suele ser fenilo o 2-halofenilo. Es posible obtener una gran cantidad de derivados de esta estructura básica de BZD mediante leves alteraciones en varias

posiciones de sustituyentes químicos. Las DBZD tienen una estructura química básica como 1,4-benzodiazepinas, triazolobenzodiazepinas o tienotriazolodiazepinas.



Estructura general de las benzodiacepinas



1,4-Benzodiazepinas Triazolobenzodiazepinas Tienotriazolobenzodiazepinas

Figura 5. Estructura general de las BZD y DBZD.

Las 1,4-benzodiazepinas tienen un sustituyente electronegativo (por ejemplo, un halógeno o un resto nitro) en la posición $\mathbf{R_7}$, y muchos también tienen grupos electronegativos en $\mathbf{R_{2''}}$. Todas las triazolobenzodiazepinas tienen grupos electronegativos en $\mathbf{R_8}$ y en muchos casos en $\mathbf{R_{2''}}$. Las tienotriazolodiazepinas también pueden tener grupos electronegativos en $\mathbf{R_{2''}}$ (**Tabla 3**) [39, 40].

Tabla 3: BZD y DBZD estudiadas en esta tesis.

COMPUESTO	TIPO DE BZD	ESTRUCTURA	R_1	$R_{2''}$	R_3	R_7	R_8	$R_{1''}$
Alprazolam	BZD	Triazolobenzodiazepina	-	H	-	-	Cl	-
Bromazepam	BZD	1,4-benzodiacepina	H	H	2H	Br	-	-
Clonazepam	BZD	1,4-benzodiacepina	H	Cl	2H	NO_2	-	-
Diazepam	BZD	1,4-benzodiacepina	CH_3	H	2H	Cl	-	-
Lorazepam	BZD	1,4-benzodiacepina	H	Cl	OH	Cl	-	-
Lormetazepam	BZD	1,4-benzodiacepina	CH_3	Cl	OH	Cl	-	-
Tetrazepam	BZD	1,4-benzodiacepina	CH_3	2H	2H	Cl	-	-
Clonazolam	DBZD	Triazolobenzodiacepina	-	Cl	-	-	NO_2	-
Descloroetizolam	DBZD	Tienotriazolodiacepina	-	H	-	-	-	CH_3
Flubromalozam	DBZD	Triazolobenzodiacepina	-	F	-	-	Br	-

Tabla 3: BZD y DBZD estudiadas en esta tesis (*continuación*).

COMPUESTO	TIPO DE BZD	ESTRUCTURA	R_1	$R_{2'}$	R_3	R_7	R_8	$R_{1'}$
Meclonazepam	DBZD	1,4-benzodiacepina	H	Cl	CH_3	NO_2	-	-
Nifoxipam	DBZD	1,4-benzodiacepina	H	F	OH	NO_2	-	-

Alprazolam es una benzodiacepina de alta potencia debido a que posee un anillo 1,2,4-triazol en lugar del anillo de diazol [52]. Tetrazepam pertenece a las 1,4-benzodiazepinas, pero tiene una estructura peculiar, ya que el sustituyente típico de 5-fenil está sustituido por un grupo ciclohexenilo. Existen estudios que demuestran la conversión metabólica de tetrazepam a diazepam, ya que sólo se diferencian estructuralmente en el sustituyente C_5 [59-61]. Flubromazolam es una triazolobenzodiazepina, análoga de la otra DBZD, flubromazepam [62]. Contiene un sustituyente de F, Br y triazol metilado en su esqueleto central, lo que lo hace ser más potente que su análogo [63]. Clonazolam es una triazolobenzodiazepina, con un anillo de triazol 1-metilado fusionado con el anillo de diazepina. Es la DBZD más potente de entre las 1,4-triazolobenzodiazepinas. Además, es un análogo triazolo de clonazepam y alprazolam. Su síntesis se remonta por primera vez al año 1971, pero sin licencia para su uso terapéutico [62]. Descloroetizolam es una tienotriazolobenzodiazepina. Posee un anillo aromático de cinco miembros con un átomo de azufre (anillo de tiofeno) fusionado a su anillo diazepínico. Se diferencia del compuesto original, etizolam, por la eliminación de un átomo de cloro en la posición 2´´ de su anillo fenilo [64]. Meclonazepam es una 1,4-benzodiazepina, análoga a la benzodiazepina clonazepam y patentada en 1977 por Hoffman-La Roche. Se encontró que tiene actividad para la esquistosomiasis (enfermedad aguda y crónica causada por gusanos parásitos) y es un tratamiento candidato para la infección por parásitos esquistosómicos [33, 64]. Nifoxipam es el derivado 3-hidroxi-desmetil de la 7-nitrobenzodiazepina (flunitrazepam). Flunitrazepam se desmetila seguido de 3-hidroxilación del anillo benzodiazepínico para formar el metabolito activo, nifoxipam [64]. Además, nifoxipam también podría ser metabolito de fonazepam, otro de los metabolitos activos de flunitrazepam [65].

Los compuestos no benzodiacepínicos (*Z-drugs*) son estructuralmente distintos de la estructura del anillo benzodiacepínico (**Figura 6**). Zaleplon es una pirazolopirimidina, mientras que zolpidem pertenece a la clase de las imidazopiridinas. Zopiclone es una ciclopirrolona, un compuesto quiral con un centro asimétrico que posee dos enantiómeros. Está disponible como una mezcla racémica de dos enantiómeros, uno de los cuales se comercializa en EEUU como eszopiclone [45].

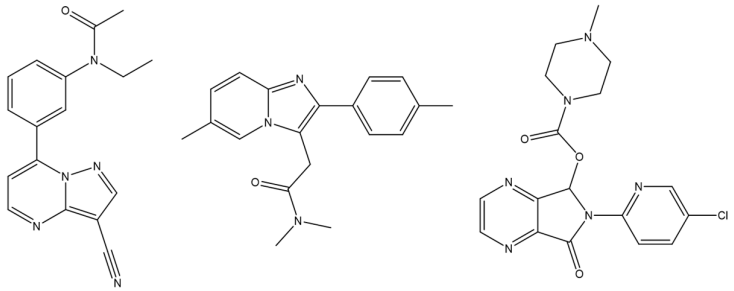


Figura 6. Estructura de las *Z-drugs*.

En la **Tabla 4** se muestran las principales características de las benzodiacepinas (BZD y DBZD) y de los hipnóticos *Z*, estudiados en esta Tesis.

Tabla 4. Características físico-químicas de las BZD, DBZD e hipnóticos *Z* estudiadas.

Compuesto	Categoría	Nombre IUPAC	Fórmula Molecular	Peso Molecular (g/mol)	pKa	Log P
Alprazolam	BZD	8-Chloro-1-methyl-6-phenyl-4*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepine	$C_{17}H_{13}ClN_4$	308.77	2.37	1.91
Bromazepam	BZD	7-bromo-5-(pyridin-2-yl)-1*H*-benzo[e][1,4]diazepin-2(3*H*)-one	$C_{14}H_{10}BrN_3O$	316.20	11.39	2.27
Clonazepam	BZD	5-(2-chlorophenyl)-1,3-dihydro-7-nitro-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-one	$C_{15}H_{10}ClN_3O_3$	315.72	11.21	2.52
Diazepam	BZD	7-chloro-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-one	$C_{16}H_{13}ClN_2O$	284.70	3.40	2.80
Lorazepam	BZD	7-chloro-5-(2-chlorophenyl)-1,3-dihydro-3-hydroxy-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-one	$C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$	321.20	10.80	2.38
Lormetazepam	BZD	7-Chloro-5-(2-chlorophenyl)-3-hydroxy-1-methyl-1*H*-benzo[e][1,4]diazepin-2(3*H*)-one	$C_{16}H_{12}Cl_2N_2O_2$	335.20	11.60	2.35
Tetrazepam	BZD	7-chloro-5-(cyclohexen-1-yl)-1-methyl-3*H*-1,4-benzodiazepin-2-one	$C_{16}H_{17}ClN_2O$	288.80	4.10	2.62
Clonazolam	DBZD	6-(2-Chlorophenyl)-1-methyl-8-nitro-4*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepine	$C_{17}H_{12}ClN_5O_2$	353.77	1.88	0.93
Flubromazolam	DBZD	8-bromo-6-(2-fluorophenyl)-1-methyl-4*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepine	$C_{17}H_{12}BrFN_4$	371.21	2.27	1.68
Descloroetizolam	DBZD	4-phenyl-2-ethyl-9-methyl-6*H*-thieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepine	$C_{17}H_{16}N_4S$	308.40	2.45	2.03
Meclonazepam	DBZD	(3*S*)-5-(2-chlorophenyl)-3-methyl-7-nitro-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepin-2-one	$C_{16}H_{12}ClN_3O_3$	329.74	11.24	3.06
Nifoxipam	DBZD	5-(2-fluorophenyl)-3-hydroxy-7-nitro-1,3-dihydro-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-one	$C_{15}H_{10}FN_3O_4$	315.26	10.38	1.62
Zaleplon	*Z-drug*	*N*-(3-(3-cyanopyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)phenyl)-*N*-ethylacetamide	$C_{17}H_{15}N_5O$	305.33	-1.47	1.40

Tabla 4. Características físico-químicas de las BZD, DBZD e hipnóticos *Z* estudiadas *(continuación)*.

Compuesto	Categoría	Nombre IUPAC	Fórmula Molecular	Peso Molecular (g/mol)	pKa	Log P
Zolpidem	*Z-drug*	*N,N*-Dimethyl-2-[6-methyl-2-(4-methylphenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl]acetamide hemitartrate	$C_{19}H_{21}N_3O$	307.39	6.77	3.09
Zopiclone	*Z-drug*	(*RS*)-6-(5-chloropyridin-2-yl)-7-oxo-6,7-dihydro-5*H*-pyrrolo[3,4-b]pyrazin-5-yl-4-methylpiperazine-1-carboxylate	$C_{17}H_{17}ClN_6O_3$	388.81	6.70	2.71

1.2.4. TOXICIDAD

En general, las BZD tienen grandes volúmenes de distribución y atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica y placentaria, pudiéndose encontrar en la leche materna [48]. Actualmente, existen más de 50 derivados de BZD y la gran mayoría está bajo control internacional de la *Convención sobre Sustancias Psicotrópicas*. A pesar de ser relativamente seguras, las BZD pueden causar varios efectos adversos, como sedación, ataxia, desinhibición conductual, dependencia, abuso y síntomas de abstinencia al dejar de tomarlas [52]. Además, la seguridad de usar BZD disminuye al consumirlas conjuntamente con alcohol u otros sedantes, antidepresivos, neurolépticos u opioides que pueden provocar efectos sedantes aditivos [21, 22, 48, 66].

Las DBZD se han detectado en combinación con otras drogas como el etanol, los depresores del SNC, opioides y otras drogas psicoactivas, que pueden potenciar su efecto negativo en el organismo humano [53, 67].

Actualmente, las *Z-drugs* están clasificadas como sustancias de la **lista IV** de la Ley de Sustancias Controladas de Estados Unidos [47]. Las propiedades farmacológicas son similares a las BZD y se consideraron alternativas efectivas con mejores perfiles de seguridad debido a sus perfiles farmacocinéticos favorables [45]. En general, las *Z-drugs* son bien toleradas y los efectos adversos más comunes incluyen dolor de cabeza, malestar gastrointestinal, somnolencia y mareos [46]. Las interacciones farmacológicas pueden darse entre zolpidem y varios agentes serotoninérgicos y noradrenérgicos, incluidos los ISRS, venlafaxina y los ATC, causando alucinaciones. La tolerancia, la dependencia y la abstinencia de estos hipnóticos *Z* es menos severo y con menor incidencia que las BZD en el tratamiento del insomnio. Aún así, se caracterizan por tener efectos adversos como ansiedad, temblor, palpitaciones y, en raras ocasiones, convulsiones y psicosis. El potencial de abuso y dependencia se refiere a zolpidem y zopiclone, sobre todo en pacientes con antecedentes de abuso de drogas [45, 46].

1.3. DROGAS DE ABUSO

1.3.1. ASPECTOS GENERALES, ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

1.3.1.1.OPIÁCEOS

El opio es una mezcla compleja, de la que se pueden extraer más de 20 alcaloides al desecar el jugo de las cápsulas de la adormidera (*Papaver somniferum*) [68, 69]. Los componentes mayoritarios del opio son derivados fenantrénicos como: morfina (10%), noscapina (6%) y codeína (0.5%), encontrándose en menor proporción derivados bencilisoquinolínicos como papaverina y tebaína. Los derivados del opio (opiáceos y opioides) se diferencian en la naturaleza del conjunto de alcaloides que contienen. Éstos pueden tener un origen natural (morfina, codeína o tebaína), un origen semisintético (heroína y oxicodona) o un origen completamente sintético (metadona) [70, 71].

Morfina es el alcaloide natural mayoritario del opio, descubierto y aislado por primera vez en 1804, por Friedrich Sertürner [72] y usada frecuentemente en medicina como analgésico para el tratamiento del dolor agudo y crónico de intensidad severa [73]. Pertenece al grupo de los fenantrenos o 4,5-epoximorfinanos, ya que posee una estructura pentacíclica con un grupo fenantreno de 4 anillos. La presencia de morfina sóla o conjugada puede ser indicativo de consumo de otros opioides como codeína y heroína, puesto que es uno de los metabolitos de ambos compuestos [70, 71] (**Figura 7**). Heroína (diamorfina o diacetilmorfina) es un éster de morfina semisintético, con dos grupos acetilo acoplados a los grupos 3 y 6-hidroxilo de morfina [74]. Tiene una vida media de sólo unos pocos minutos, por lo que rara vez se detecta en los fluidos biológicos. En el organismo se hidroliza rápidamente a 6-monoacetilmorfina (6-MAM), su principal metabolito, y cuya presencia es señal inequívoca de un consumo previo de heroína, ya que no es producto del metabolismo de morfina ni de codeína [70, 71] (**Figura 7**). Posteriormente, 6-MAM se transforma en morfina por estereasas séricas y hepáticas [73, 74].

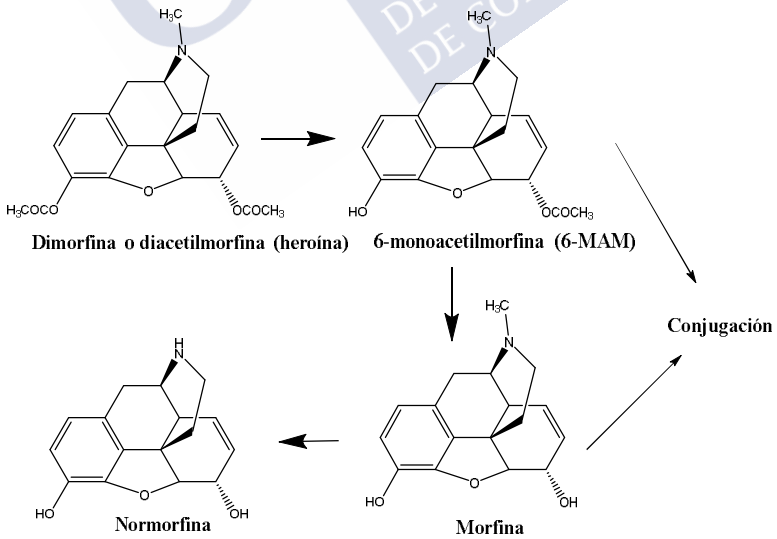


Figura 7. Metabolismo de heroína.

Metadona es un compuesto sintético derivado de 3,3-difenilpropilamina. Es ligeramente más potente que morfina, por lo que empezó a utilizarse como sedante, aunque, se utiliza en el tratamiento de la adicción a otros opioides y opiáceos, como

heroína [70, 71]. Estructuralmente, posee un átomo de carbono quiral (C_6), por lo que posee 2 esteroisómeros [70, 71, 75]. Sufre reacciones metabólicas de mono- y di-*N*-desmetilación que dan como resultado un compuesto intermedio que es espontáneamente ciclado a 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP), el cual se *N*-desmetila a 2-etil-5-metil-3,3-difenilpirrolidina (EMDP) (**Figura 8**) [70, 71, 75].

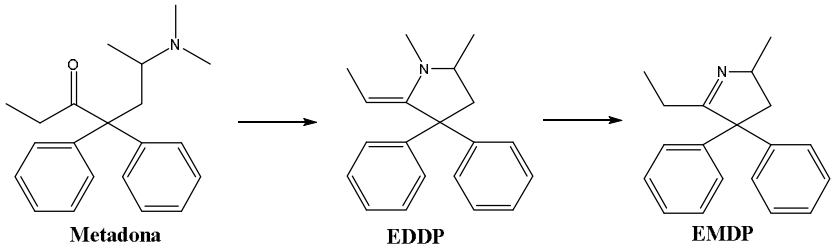


Figura 8. Metabolismo de metadona.

Buprenorfina es un opioide semisintético derivado de oripavina, que es el metabolito principal de tebaína. Posee una actividad analgésica 25-30 veces más potente que morfina y un efecto más duradero [70, 71]. Se utiliza en programas de desintoxicación en drogodependencias de otros opiáceos y opioides, de manera similar al tratamiento con metadona. También puede usarse en combinación con naloxona, reduciéndose su potencial de abuso [28]. Naloxona es el *N*-alil derivado de oximorfona, un opioide semisintético procedente de tebaína [70, 71]. Es una mezcla racémica de dos enantiómeros: (-)-naloxona (levonaloxona) y (+)-naloxona (dextronaloxona), teniendo más afinidad el enantiómero levo por los recepores opioides [76]. Se suele utilizar como antídoto en los casos de intoxicación y sobredosis por opioides, al ser antagonista de la acción de éstos (**Figura 9**) [28, 70].

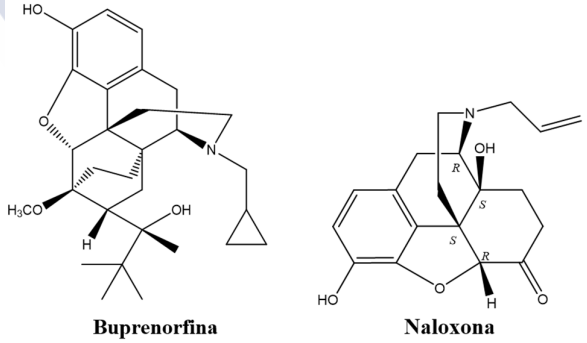


Figura 9. Estructuras de buprenorfina y naloxona.

1.3.1.2.COCAÍNA

Cocaína es uno de los alcaloides naturales que se extrae de las hojas de la planta de coca (*Erythroxylon coca*), un arbusto procedente principalmente de las regiones tropicales del norte de América del Sur, México, Indonesia y las Indias Occidentales. Es consumida desde hace miles de años por sus efectos psicoestimulantes y anestésicos [77, 78]. Estructuralmente, cocaína o metilbenzoilecgonina es un éster del ácido benzoico y de una base nitrogenada, metilecgonina (**Figura 10**). Ecgonina es una base amino alcohólica que está estrechamente relacionada con tropina, el amino alcohol de atropina. Por ello, cocaína está estructuralmente relacionada con atropina (**Figura 11**), pero no

farmacológicamente. Cocaína contiene una parte hidrófoba (anillo bencénico) y una parte hidrofílica (amina terciaria). El enlace éster es rápidamente hidrolizado, lo cual contribuye a la corta vida del compuesto [78, 79]. El resto ecgonina posee cuatro átomos de carbono quirales, por lo que pueden existir cuatro mezclas racémicas. Comercialmente, cocaína es sintetizada a partir de (-)-ecgonina en presencia de metanol y ácido benzoico, y en (-)-cocaína resultante, el grupo benzoil y el metiléster están localizados en posición *cis* respecto al puente de nitrógeno [79]. La cocaína se metaboliza rápidamente en el hígado para producir principalmente benzoilecgonina (BEG) y ecgonina metil éster (EME) y posteriormente ecgonina (**Figura 10**). Benzoilecgonina es el correspondiente ácido carboxílico de cocaína y su principal metabolito, junto con ecgonina metiléster. Se produce por acción de las enzimas carboxilestereases hepáticas y es el marcador principal de consumo de cocaína [79]. Cocaetileno (COCET) es el etil éster de benzoilecgonina. Estructuralmente, difiere de cocaína en la sustitución de un grupo etilo en lugar del metil éster (**Figura 10**). Se produce como consecuencia del consumo de cocaína y etanol, y su formación resulta de la transesterificación de cocaína con etanol. Además, cabe esperar que cocaetileno se metabolice en BEG, a través de las mismas reacciones que convierten cocaína en benzoilecgonina [79, 80].

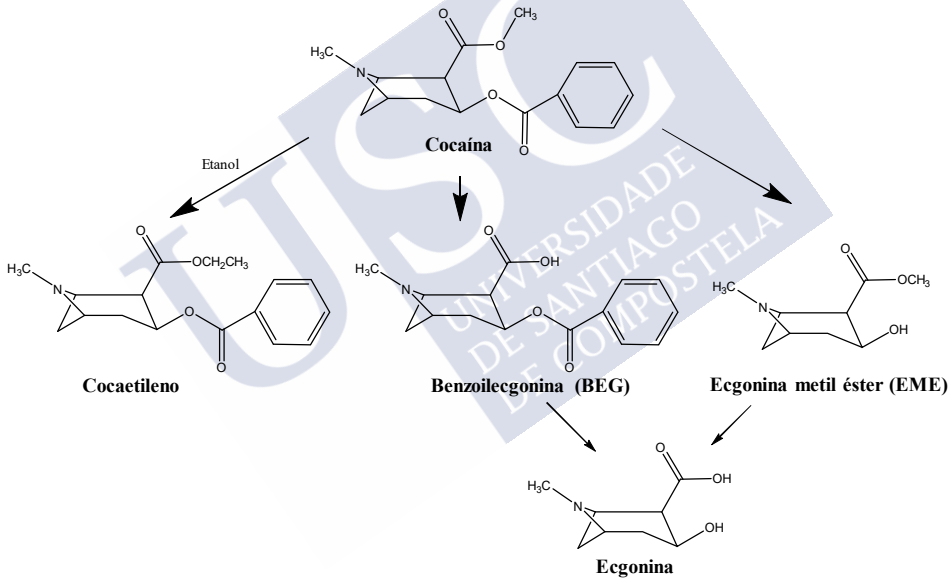


Figura 10: Principales metabolitos de cocaína.

1.3.1.3.ESCOPOLAMINA

Escopolamina o hioscina (*L*-(-)-hioscina) es un alcaloide tropánico formado por un éster del ácido trópico y una base nitrogenada terciaria, conocida como escopina, la cual es muy similar a la base nitrogenada (tropina) de atropina ((±)-hiosciamina). Ambos alcaloides tienen un centro quiral localizado en el componente derivado del ácido trópico (*S*-(-)-tropano). Se diferencian en una función epoxi situada en escopina, entre los átomos de carbono 6 y 7 de la base nitrogenada (**Figura 11**) [81, 82]. Estos alcaloides tropanos se extraen de plantas que pertenecen a la familia de las solanáceas (*Solanaceae*), como por ejemplo *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger*, *Datura stramonium*, *Duboisia myoporoides*, *Scopolia carniolica* o *Brugmansia arbórea* [81, 83].

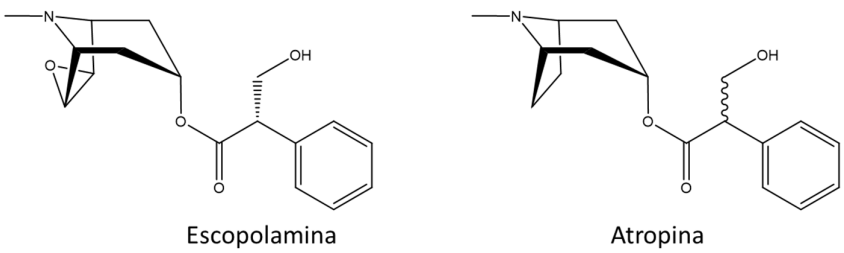


Figura 11. Estructuras químicas de escopolamina y atropina.

1.3.1.4.CATINONAS SINTÉTICAS

Las catinonas sintéticas son un grupo de NSP de reciente aparición en el mercado ilícito, a pesar de que su síntesis y su estructura química se conocen desde hace tiempo. Así, en 1928 se sintetizó metcatinona, el análogo metilado de la catinona natural [84, 85]. Metilona, un análogo de 3,4-metilendioxi-*N*-metil-anfetamina (MDMA, éxtasis), fue la primera catinona sintética notificada por el OEDT en 2005 [86]. Sin embargo, su síntesis fue patentada en 1996 [84]. Mefedrona y 3,4-metilendioxipirovalerona (MDPV) fueron detectados por primera vez en 2007, pero sus síntesis fueron descritas por primera vez en 1929 y 1967, respectivamente [84, 86, 87]. Comercialmente, se venden bajo el nombre de "sales de baño" y producen un efecto similar al obtenido con estimulantes ilegales, como metanfetamina, éxtasis o cocaína [87]. Estructuralmente, las catinonas sintéticas son los β-ceto análogos de la catinona natural (*S*-(-)-2-amino-1-fenilpropan-1-ona), un alcaloide fenetilalquilamina presente en las hojas del arbusto Khat (*Catha edulis*). Por ello, las catinonas sintéticas están relacionadas estructuralmente con las fenetilaminas, de las cuales se diferencian en un grupo carbonilo unido al carbono β de la cadena amino-alquílica unida al anillo de fenilo (**Figura 12**). Por ejemplo, catinona, mefedrona y metilona se relacionan estructuralmente con anfetamina, metanfetamina y MDMA, respectivamente [86]. Pueden existir en dos formas esteroisoméricas, que proporciona diferente potencia de acción [88].

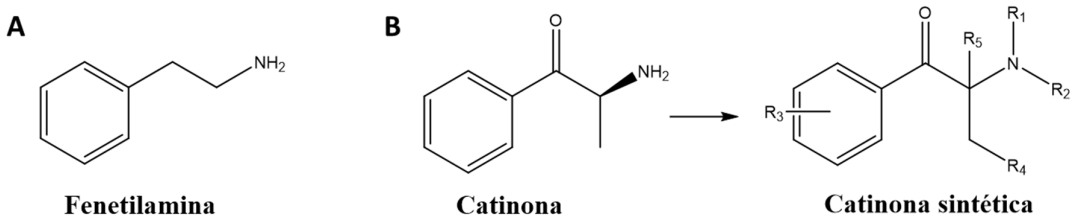
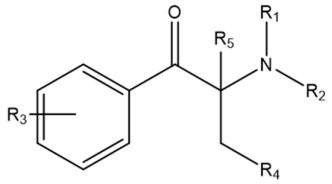


Figura 12. Estructura química de fenetilamina (A) y de las catinonas (B).

Químicamente, las catinonas pueden ser clasificadas en cuatro grupos. El primer grupo es el formado por las catinonas *N*-alquiladas en $\mathbf{R_1}$ y/o $\mathbf{R_2}$, algunas de las cuales pueden tener sustituciones (alquilación o halogenación) en el anillo aromático ($\mathbf{R_3}$). Pertenecen a este grupo flefedrona y mefedrona. En particular, mefedrona es metilada en el grupo amino, formando una estructura similar a metanfetamina y metcatinona. Otro grupo son las catinonas en las que se añade un grupo 3,4-metilendioxi al anillo bencilo ($\mathbf{R_3}$), como metilona que tiene un anillo metilendioxi unido al anillo aromático, formando una estructura similar a MDMA [84]. Este grupo comprende los derivados *N*-metilados y *N*-etilados, metilona y etilona, y también butilona y pentilona, que resultan de una alquilación en $\mathbf{R_1}$ y $\mathbf{R_4}$, respectivamente. Otro grupo de catinonas sustituídas es la familia

similar a pirrolidinofenona, la cual se caracteriza por una sustitución de pirrolidinilo en el átomo de nitrógeno, como la catinona pirovalerona. El último grupo lo forman aquellas catinonas sintéticas que tienen la sustitución del anillo 3,4-metilendioxi y el resto *N*-pirrolidinilo. Por ejemplo, MDPV tiene un anillo de metilendioxi unido al anillo aromático de la cadena principal de β-cetofetilamina y un anillo de pirrolidinilo y propano unidos al carbono α, formando una estructura similar a pirovalerona (**Tabla 5**) [84, 89].

Tabla 5. Catinonas sintéticas estudiadas en esta tesis.



Catinona sintética

COMPUESTO	R_1	R_2	R_3	R_4
Butilona	$-CH_3$	-H	3,4-metilendioxi	$-CH_3$
Etcatinona	$-CH_2CH_3$	-H	-H	-
Etilcatinona Efedrina	$-CH_2CH_3$	-H	-H	-
Etilona	$-CH_2CH_3$	-H	3,4-metilendioxi	-
Flefedrona (4-FMC)	$-CH_3$	-H	4-F	-
MDPV	-	pirrolidinil	3,4-metilendioxi	$-CH_2CH_3$
Mefedrona	$-CH_3$	-H	4-CH_3	$-CH_3$
Metilefedrina	$-CH_3$	$-CH_3$	-H	-
Metilona	$-CH_2CH_3$	-H	3,4 metilendioxi	-
Pentedrona	$-CH_3$	-H	-H	$-CH_2CH_3$
Pirovalerona	-	pirrolidinil	4-CH_3	$-CH_2CH_3$

En la **Tabla 6**, se recogen las propiedades físico-químicas de las drogas de abuso abordadas en esta tesis.

Tabla 6. Características físico-químicas de las drogas de abuso abordadas en esta tesis.

Compuesto	Categoría	Nombre IUPAC	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	pKa	Log P
6-MAM	Opioide	3-Hydroxy-6-acetyl-(5α,6α)-7,8-didehydro-4,5-epoxy-17-methylmorphinan	$C_{19}H_{21}NO_4$	327.37	9.41	1.56
Morfina	Opiáceo	(5α,6α)-7,8-didehydro-4,5-epoxy-17-methylmorphinan-3,6-diol	$C_{17}H_{19}NO_3$	385.34	9.48	0.87

Tabla 6. Características físico-químicas de las drogas de abuso abordadas en esta tesis (*continuación*).

Compuesto	Categoría	Nombre IUPAC	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	pKa	Log P
Metadona	Opioide	(*RS*)-6-(dimethylamino)-4,4-diphenylheptan-3-one	$C_{21}H_{27}NO$	309.45	9.05	3.93
EDDP	Opioide	2-Ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine	$C_{20}H_{23}N$	277.40	7.71	5.36
Buprenorfina	Opoide	(2*S*)-2-[(5*R*,6*R*,7*R*,14*S*)-17-cyclopropylmethyl-4,5-epoxy-6,14-ethano-3-hydroxy-6-methoxymorphinan-7-yl]-3,3-dimethylbutan-2-ol	$C_{29}H_{41}NO_4$	467.65	9.47	2.83
Naloxona	Opioide	(4*R*,4a*S*,7a*R*,12b*S*)-4a,9-dihydroxy-3-(prop-2-en-1-yl)-2,3,4,4a,5,6-hexahydro-1H-4,12-methano[1]benzofurano[3,2-e]isoquinolin-7(7aH)-one	$C_{19}H_{21}NO_4$	327.37	9.16	1.78
Cocaína	Alcaloide	Methyl(1*R*,2*R*,3*S*,5*S*)-3-(benzoyloxy)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-2-carboxylate	$C_{17}H_{21}NO_4$	303.35	8.97	2.28
BEG	Alcaloide	(1*R*,2*R*,3*S*,5*S*)-3-Benzoyloxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-2-carboxylic acid	$C_{16}H_{19}NO_4$	289.33	3.35 10.82	2.26
Cocaetileno	Alcaloide	ethyl (2*R*,3*S*)-3-benzoyloxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-2-carboxylate	$C_{18}H_{23}NO_4$	317.38	9.04	2.79
Escopolamina	Alcaloide	(-)-(*S*)-3-Hydroxy-2-phenylpropionic acid (1*R*,2*R*,4*S*,5S,7α,9*S*)-9-methyl-3-oxa-9-azatricyclo[3.3.1.02,4]non-7-yl ester	$C_{17}H_{21}NO_4$	303.35	14.11	0.69
Butilona	Catinona	1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino)butan-1-one	$C_{12}H_{15}NO_3$	221.25	7.74	0.11
Etcatinona	Catinona	(*RS*)-2-ethylamino-1-phenyl-propan-1-one	$C_{11}H_{15}NO$	177.24	7.14	0.86
Etilcatinona efedrina	Catinona	2-(Ethylamino)-1-phenylpropan-1-ol	$C_{11}H_{17}NO$	179.26	-	-
Etilona	Catinona	(*RS*)-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(ethylamino)propan-1-one	$C_{12}H_{15}NO_3$	221.25	7.75	0.11
Flefedrona (4-FMC)	Catinona	1-(4-Fluorophenyl)-2-(methylamino)propan-1-one	$C_{10}H_{12}FNO$	181.21	7.24	0.83
MDPV	Catinona	1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one	$C_{16}H_{21}NO_3$	275.34	8.41	2.43

Tabla 6. Características físico-químicas de las drogas de abuso abordadas en esta tesis (*continuación*).

Compuesto	Categoría	Nombre IUPAC	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	pKa	Log P
Mefedrona	Catinona	(*RS*)-2-Methylamino-1-(4-methylphenyl)propan-1-one	$C_{11}H_{15}NO$	177.24	7.41	0.67
Metilefedrina	Catinona	(1*R*,2*S*)-2-(Dimethylamino)-1-phenyl-1-propanol	$C_{11}H_{17}NO$	179.26	13.88	1.62
Metilona	Catinona	1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino)propan-1-one	$C_{11}H_{13}NO_3$	207.23	7.74	-0.40
Pentedrona	Catinona	(±)-1-phenyl-2-(methylamino)pentan-1-one	$C_{12}H_{17}NO$	191.27	7.21	1.37
Pirovalerona	Catinona	(*RS*)-1-(4-methylphenyl)-2-(1-pyrrolidinyl)pentan-1-one	$C_{16}H_{21}NO$	245.36	8.22	3.50

1.3.2. CLASIFICACIÓN DE LAS DROGAS DE ABUSO

Las sustancias psicoactivas tienen distintos grados de restricción y se pueden clasificar legalmente según leyes federales y estatales de cada país, o mediante consensos internacionales en las políticas sobre drogas, como la Administración de Control de Drogas de los Estados Unidos (DEA) [90] o el Parlamento Europeo [91-94]. A nivel internacional, los países siguen los modelos existentes de las convenciones sobre fiscalización de estupefacientes de la Organización de las Naciones Unidas (ONU), como son la *Convención Única sobre Estupefacientes de 1961*, el *Convenio sobre Sustancias Psicotrópicas de 1971* o la *Convención Contra el Tráfico Ilícito de Estupefacientes y Sustancias Psicotrópicas de 1988* [68, 95]. La *Convención Única* (1961) creó cuatro listas de sustancias a controlar, permitiendo incluir nuevas sustancias en la lista sin modificar el texto del tratado. El *Convenio de 1971* ampliaba el sistema de control, al incluir una nueva gama de sustancias psicoactivas como anfetaminas, barbitúricos, benzodiacepinas y drogas psicodélicas. En el tratado de la *Convención de 1988*, se diseñaron dos tablas en las que se muestran precursores, reactivos y disolventes que se utilizan en la fabricación ilícita de sustancias psicotrópicas [96, 97]. En la **Tabla 7** se muestra de forma resumida las distintas listas de clasificación de las *Convenciones Internacionales* sobre fiscalización de las drogas.

Tabla 7: Convenciones Internacionales sobre la fiscalización de drogas.

Convención Única sobre Estupefacientes de 1961			
Lista I	**Lista II**	**Lista III**	**Lista IV**
Sustancias muy aditivas y precursores de convertirse en estupefacientes, y que son de problable uso indebido	Sustancias menos aditivas y cuyo uso indebido es menos probable que las de la **Lista I**	Preparados que contienen una cantidad baja de compuestos de la **Lista I** y/o **II**, y son poco susceptibles de uso indebido	Estupefacientes (también clasificados en la **Lista I**) peligrosos por propiedades aditivas, y escaso o ningún valor terapéutico
Cannabis, opio, heroína, metadona, cocaína, oxicodona	Codeína	<2.5% codeína, < 0.1% cocaína	Cannabis, heroína
Convenio sobre Sustancias Psicotrópicas de 1971			
Lista I	**Lista II**	**Lista III**	**Lista IV**
Estupefacientes que presentan un alto riesgo de uso indebido y que constituyen una amenaza especialmente grave para la salud pública, con escaso o ningún valor terapéutico	Estupefacientes que presentan un riesgo de uso indebido y que constituyen una amenaza grave para la salud pública, con un valor terapéutico de bajo a moderado	Estupefacientes que presentan un riesgo de uso indebido y que constituyen una amenaza grave para la salud pública, con un valor terapéutico de moderado a alto	Estupefacientes que presentan un riesgo de uso indebido y que constituyen una amenaza menor para la salud pública, con un alto valor terapéutica
MDMA, catinona, LSD	Anfetaminas, dronabinol	Barbitúricos, buprenorfina	Benzodiacepinas
Convención contra el tráfico ilícito de estupefacientes y sustancias psicotrópicas de 1988			
Tabla I		**Tabla II**	
Precursores de sustancias psicotrópicas, como efedrina, piperonal, safrol, ácido fenilacético, ácido lisérgico y algunos reactivos clave usados para la conversión de morfina en heroína, así como el permanganato potásico, usado en la extracción de cocaína		Una amplia gama de reactivos y disolventes que se pueden usar en la producción ilícita de estupefacientes y sustancias psicotrópicas, pero también tienen usos industriales ilícitos extendidos, como acetona, éter etílico, tolueno y ácido sulfúrico	

Atendiendo al criterio farmacológico que tiene en cuenta su mecanismo de acción y sus efectos biológicos, las drogas de abuso pueden ser clasificadas en: depresoras, estimulantes y alucinógenas [68, 77]. Las sustancias depresoras son aquellas que disminuyen o retardan el funcionamiento del sistema nervioso central, potenciando la acción del neurotransmisor GABA [77]. El alcohol, los barbitúricos, los tranquilizantes y el opio, junto sus derivados son considerados drogas depresoras. Además, el opio y sus derivados también se engloban en la clase conocida como "narcóticos" [68]. Los estimulantes, a diferencia de las drogas depresoras, aceleran la actividad del sistema nervioso central. En este grupo se incluyen cocaína, anfetaminas y nuevas sustancias psicoactivas. Las drogas alucinógenas se caracterizan por producir distorsiones en las sensaciones, y engloban una amplia variedad de compuestos de origen natural y sintético, como el ácido lisérgico (LSD).

1.3.3. TOXICIDAD

El uso de analgésicos opioides puede suponer efectos adversos como el fallo respiratorio, el cual es la principal causa de muerte en los casos de intoxicación, y causar adición, al incrementar el nivel de tolerancia. El consumo prolongado de estos compuestos provoca que se aumente la dosis para producir un efecto terapéutico equivalente. Además, cuando se coadministran con otros fármacos o drogas, como alcohol, antidepresivos o benzodiacepinas, pueden potenciar el efecto aditivo o intensificar las reacciones adversas [70, 98].

Es frecuente el consumo de cocaína y alcohol por la gran mayoría de los consumidores habituales de cocaína, con la consecuente potenciación de la euforia y el aumento del riesgo por dicha combinación [99]. La dosis mortal de cocaína es de, aproximadamente, 1 g por vía intravenosa. La intoxicación aguda tiene efectos adversos a nivel cardiovascular, cerebrovascular, gastrointestinal y la muerte puede suceder en las primeras horas posteriores al consumo [78]. Además, cocaína es capaz de atravesar la placenta induciendo daños en el feto que pueden llegar a provocar la muerte intrauterina y pasar a la leche materna [99].

Escopolamina también es conocida como "burundanga" cuando es utilizada como droga de abuso o droga recreativa. Es usada en actividades delitivas como en robos o en agresiones sexuales porque, debido a sus efectos inhibitorios muscarínicos, puede causar efectos negativos en la memoria, como anular la voluntad. Además, como otros alcaloides tropanos, también posee efectos alucinógenos y su dosis activa está muy cercana a su dosis letal, sobre 100 mg [100], encontrándose concentraciones letales de 1.89 µg/mL en sangre [101]. Por ello, el abuso de escopolamina es muy peligroso [102].

La información de los aspectos toxicológicos referente a las catinonas sintéticas es bastante limitada. Estos compuestos fueron introducidos en el mercado de las drogas recreativas como sustitutos legales de otras drogas como cocaína y las anfetaminas, ya que simulan los efectos de éstas y, además, carecen de control fiscal. Entre los efectos producidos se encuentran la euforia, el aumento de las capacidades sociales y de trabajo y aumento de la energía, entre otras. Entre los efectos adversos, el consumo de estos compuestos produce taquicardia, hipertensión, hipertemia, infarto de miocardio y muerte [88, 103]. Las intoxicaciones mortales informadas en la literatura científica se han relacionado con mefedrona, MDPV, metedrona, butilona y metcatinona, entre otras drogas de abuso. Las concentraciones postmortem detectadas en sangre variaron entre 0.13-22 µg/mL (mefedrona), 0.43-1.2 µ/mL (butilona) y 82 ng/mL (suero)- 670 ng/mL (orina) para MDPV [88].

1.4. FENTANILOS

1.4.1. ASPECTOS GENERALES

Fentanilo es un opioide sintético más potente que morfina y fue introducido en 1963 como un anestésico. También es utilizado como fármaco contra el dolor agudo y crónico [70, 71]. A partir de su síntesis en 1960 por Paul Janssen [104], se desarrollaron compuestos análogos a fentanilo para uso médico y veterinario, como sufentanilo, alfentanilo, remifentanilo y carfentanil [105]. Carfentanil fue sintetizado en 1974 por la empresa farmacéutica Janssen, aunque su síntesis fue descrita por primera vez por Van Bever *et al*. en 1976 [106] y patentada en 1977 por Janssen *et al* [107]. Es el más potente de los análogos de fentanilo disponibles comercialmente. Es utilizado en el campo veterinario como tranquilizante en la sedación, hipnótico y anestésico de animales grandes. Ilícitamente, es usado para adulterar drogas de abuso, como heroína, fentanilo o cocaína [108]. A principios de la década de 1980, los análogos de fentanilo de uso no farmacéutico fueron sintetizados mediante una ruta alternativa de síntesis a través de el método Siegfried. En esta ruta sintética, se empleó el compuesto *N*-fenetil-4-piperidinona (NPP) como producto de partida para producir un producto intermediario, 4-anilino-*N*-fenetil-4-piperidina (4-ANPP), y que se utiliza como precursor para la conversión directamente en fentanilo (**Figura 13**) [109, 110].

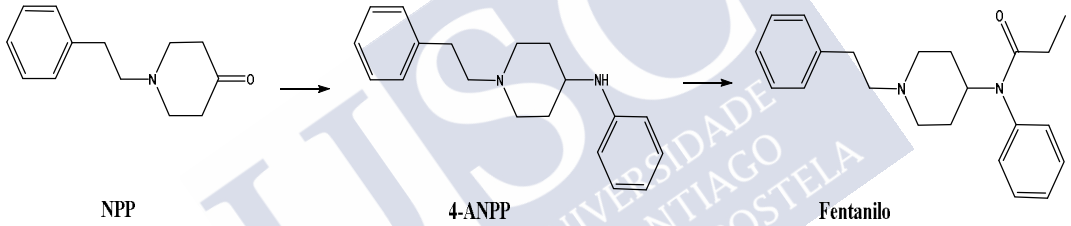


Figura 13. Estructuras de los precursores (NPP y 4-ANPP) en la síntesis de fentanilo.

1.4.2. CLASIFICACIÓN DE LOS FENTANILOS

La DEA catalogó los compuestos precursores en la síntesis de fentanilo (NPP y 4-ANPP) como sustancias controladas de la **Lista I** y **II** (ver **Tabla 7**), respectivamente [109, 110]. Además de los usos legítimos (médico e investigación) de los fentanilos, éstos tienen un uso ilícito como sustitutos de heroína y otros opioides controlados [111]. Por ello, la DEA ha clasificado fentanilo y sus análogos con fines médicos/veterinarios en la **Lista II** de Narcóticos, mientras que los análogos no farmacéuticos están clasificados en la **Lista I** [105, 112].

1.4.3. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LOS FENTANILOS

Fentanilo y los derivados estudiados en esta tesis son opioides sintéticos pertenecientes al grupo de las 4-anilidopiperidinas. Fentanilo en su estructura tiene un esqueleto feniletil piperidina, una cadena propanamida y un grupo fenilo (**Figura 14**). Según las diversas modificaciones que puede sufrir esta estructura, se pueden obtener un gran número de derivados de fentanilo [113, 114].

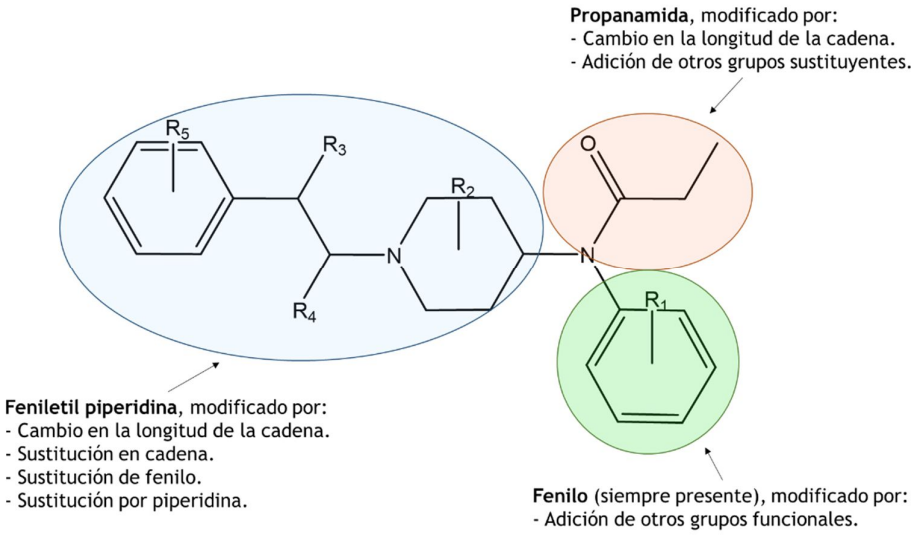
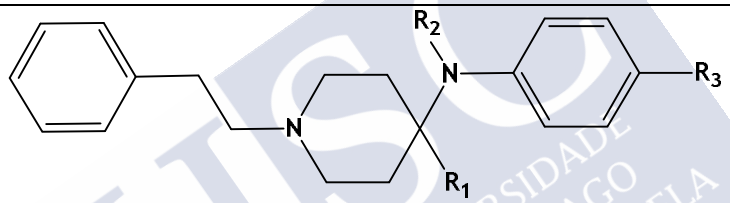


Figura 14. Modificaciones sobre la estructura de fentanilo.

Tabla 8. Estructura de los fentanilo seleccionados en esta tesis.



Compuesto	R_1	R_2	R_3
4-aminofenil-1-fenetilpiperidina (4-ANPP)	-H	-H	-H
4-fluoroisobutirilfentanilo	-H	$-COCH(CH_3)_2$	-F
***p*-fluorofentanilo**	-H	$-COCH_2CH_3$	-F
Fentanilo	-H	$-COCH_2CH_3$	-H
Acrilfentanilo	-H	$-COCH=CH_2$	-H
Ciclopropilfentanilo	-H	-CO-ciclopropil	-H
Metoxiacetilfentanilo	-H	$-COCH_2OCH_3$	-H
Carfentanil	$-COOCH_3$	$-COCH_2CH_3$	-H
Valerilfentanilo	-H	$-COCH_2CH_2CH_2CH_3$	-H
Furanilfentanilo	-H	-CO-furanil	-H
Tetrahidrofuranilfentanilo	-H	-CO-tetrahidrofuranil	-H

Carfentanil es el 4-carbometoxi derivado de fentanilo, es decir, posee un grupo carboximetilo unido en la posición 4 del resto piperidina, lo que le proporciona esa potencia tan alta que posee el compuesto, aproximadamente 100 veces mayor que la de fentanilo [108]. Posee dos isómeros posicionales (2- y 3-carbometoxifentanilo) que difieren en la posición del grupo carboximetilo en el anillo de piperidina. Acrilfentanilo se diferencia de fentanilo en el doble enlace presente en la posición 2 del propano unido al resto *N*-fenilo, por lo que lo convierte en un análogo insaturado de fentanilo. Debido a su similitud estructural, acrilfentanilo puede ser teóricamente un precursor para la síntesis de fentanilo [115]. Ciclopropilfentanilo posee un grupo ciclopropanocarboxamida a diferencia del grupo propionamida en fentanilo [116]. Furanilfentanilo se diferencia de fentanilo debido a la presencia de un anillo de furano en lugar de un grupo etilo unido al grupo carbonilo. Tiene un isómero posicional (3-furanilfentanilo) en el cual, la carboxamida se une a la posición 3 del anillo de furano [117]. Tetrahidrofuranilfentanilo es el derivado saturado de furanilfentanilo [118]. Metoxiacetilfentanilo se diferencia de fentanilo debido al reemplazo del grupo propionamida por un grupo 2-metoxiacetamida. Este compuesto también está relacionado estructuralmente con ocfentanilo, debido a la ausencia del átomo de flúor en la posición 2 del anillo de fenilo [119]. 4-fluoroisobutirilfentanilo posee un átomo de flúor en el anillo de anilidofenilo y también un grupo isobutiramida en lugar del grupo propanamida presente en fentanilo. Además, 4-fluoroisobutirilfentanilo es es isómero isoposicional de 4-fluorobutirfentanilo y, por lo tanto, ambas sustancias están estructuralmente relacionadas (poseen misma fórmula y masa molecualr) [120]. En *para*-fluorofentanilo se introduce un átomo flúor en posición *para*- en el anillo fenilo conectado a propanamida. Además, todos los derivados fentanilos contienen un átomo de nitrógeno básico en el anillo de piperidina que puede formar fácilmente sales con ácidos orgánicos o inorgánicos [115, 121].

Tabla 9. Propiedades físico-químicas de los fentanilos.

Compuesto	Nombre IUPAC	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	pKa	Log P
4-anilino-*N*-fenetil-4-piperidina (ANPP)	*N*-phenyl-1-(2-phenylethyl)-4-piperidinamine	$C_{19}H_{24}N_2$	280.41	9.03	3.98
4-Fluoroisobutirilfentanilo (4-FIBF)	*N*-(4-fluorophenyl)-*N*-(1-phenylethylpiperidin-4-yl)isobutyramide	$C_{23}H_{29}FN_2O$	368.50	8.91	4.15
***p*-Fluorofentanilo (*p*-FF)**	*N*-(4-fluorophenyl)-*N*-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]propanamide	$C_{22}H_{27}FN_2O$	354.46	8.91	3.80
Acrilfentanilo (AF)	*N*-phenyl-*N*-[1-(2-phenethyl)piperidin-4-yl]prop-2-enamide	$C_{22}H_{26}N_2O$	334.46	8.72	3.20
Carfentanil	Methyl 1-(2-phenylethyl)-4-[phenyl(propanoyl)amino]piperidine-4-carboxylate	$C_{24}H_{30}N_2O_3$	394.51	7.76	3.68
Ciclopropilfentanilo (CPF)	*N*-phenyl-*N*-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]cyclopropanecarboxamide	$C_{23}H_{28}N_2O$	348.49	8.75	3.56

Tabla 9. Propiedades físico-químicas de los fentanilos (*continuación*).

Compuesto	Nombre IUPAC	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	pKa	Log P
Fentanilo	*N*-phenyl-*N*-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]propanamide	$C_{22}H_{28}N_2O$	336.47	8.92	3.68
Furanilfentanilo (FF)	*N*-phenyl-*N*-[1-(2-phenethyl)piperidin-4-yl]-furan-2-carboxamide	$C_{24}H_{26}N_2O_2$	374.48	8.71	5.28
Metoxiacetilfentanilo (MAF)	2-methoxy-*N*-phenyl-*N*-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]acetamide	$C_{22}H_{28}N_2O_2$	352.48	8.88	2.57
Tetrahidrofuranilfentanilo (THFF)	(*N*-phenyl-*N*-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]oxolane-2-caeboxamide	$C_{24}H_{30}N_2O_2$	378.52	8.71	2.82
Valeryl fentanilo (VF)	*N*-(1-(2-Phenylethyl)-4-piperidinyl)-*N*-phenylpentylamide	$C_{24}H_{32}N_2O$	364.52	8.92	4.70

1.4.4. TOXICIDAD

Estos compuestos se venden y utilizan como sustitutos "legales" de los opioides ilícitos, como heroína y los medicamentos opioides. Se usan como automedicación para el tratamiento del dolor o de la abstinencia de opioides. Además, forman parte de las mezclas con otros opioides ilícitos, como cocaína y/o heroína, con riesgo de provocar sobredosis accidental. Se han encontrado concentraciones postmortem en suero que oscilan entre 3 a 383 ng/mL para fentanilo. Desde finales de 2015, las agencias europeas OEDT y Europol, llevaron a cabo investigaciones conjuntas sobre diversas sustancias como son acetilfentanilo, acrilfentanilo, furanilfentanilo, 4-fluoroisobutirilfentanilo, tetrahidrofuranilfentanilo, carfentanil y etoxiacentanilo. Todas estas sustancias han estado involucradas conjuntamente en más de 250 muertes. El OEDT ha evaluado entre 2017 y 2018 cinco de estas sustancias (acrilfentanilo, furanilfentanilo, 4-fluoroisobutirilfentanilo, tetrahidrofuranilfentanilo y carfentanil), junto con metoxiacetilfentanilo y ciclopropilfentanilo. Debido a los riesgos de toxicidad por su uso ilegal, acrilfentanilo y furanilfentanilo han sido objeto de medidas de control de vigilancia a nivel de la Unión Europea [115, 122].

1.5. CIPROFLOXACINO Y DICLOFENACO

1.5.1. ASPECTOS GENERALES Y CLASIFICACIÓN

1.5.1.1.CIPROFLOXACINO

Las quinolonas son un grupo de agentes sintéticos con actividad antimicrobiana [123]. La primera quinolona con uso clínico fue el ácido nalidíxico en 1962, aunque las más utilizadas en clínica son las quinolonas fluoradas, ya que poseen un amplio espectro dirigido hacia las bacterias grampositivas, gramnegativas y microbacterianas [124]. La primera quinolona con un átomo de flúor en la posición 6 (flumequina) apareció en 1973, aunque es en 1978 cuando se inicia la era de las quinolonas fluoradas, con la aparición de norfloxacino. Norfloxacino es una 6-fluoroquinolona con una cadena lateral piperazinil en la posición 7. La actividad y el espectro de la molécula viene dado por la incorporación de un átomo de flúor en posición 6 y el grupo piperacínico heterocíclico en el 7, otorgándole mayor actividad antibacteriana y un amplio espectro frente a bacterias [125]. En 1981, la compañía farmacética Bayer descubrió que reemplanzando el grupo etilo de norfloxacino por un grupo ciclopropilo aumentaba en gran medida su actividad frente a las bacterias gramnegativas, patentando en 1983 ciprofloxacino, el cual fue aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) en 1987 [126]. Ciprofloxacino es la fluoroquinolona más potente con actividad contra una amplia gama de bacterias, las más susceptibles son los bacilos gramnegativos [127].

Las quinolonas se clasifican atendiendo a su espectro de actividad y su perfil farmacocinético [127]. Estructuralmente, contienen una estructura central bicíclica relacionada con la 4-quinolona (**Figura 15**). Así pues, se distinguen cuatro clases o generaciones de antibióticos quinolonas [128]:

- **Quinolonas de primera generación**: se incluyen las quinolonas de espectro reducido, aquellas que actúan sólo sobre las bacterias gramnegativas, excluyendo las especies *Pseudomonas*.
- **Quinolonas de segunda generación**: quinolonas con un amplio espectro que actúan sobre organismos gramnegativos (incluídas las especies *Pseudomonas*), algunos organismos grampositivos y otros patógenos [125]. La ampliación en el espectro se logró con la adición de un anillo de piperazina en la posición $\mathbf{R_7}$ (potenciando así su actividad sobre los organismos gramnegativos) y la adición de un grupo ciclopropilo en la posición $\mathbf{R_1}$, mejorando la actividad general de estos compuestos [123, 129]. Ciprofloxacino es el compuesto más activo dentro de este grupo.
- **Quinolonas de tercera generación**: este grupo tiene la fluoración en la posición $\mathbf{R_6}$, dando lugar a la clasificación de futuros compuestos como fluoroquinolonas [129]. Incluyen la adición de grupos piperazina y pirrolidinilo alquilados en la posición $\mathbf{R_7}$, y grupos $-NH_2$, -OH y $-CH_3$ en la posición $\mathbf{R_5}$. También incluyen nuevos sustituyentes, como el cloro en la posición $\mathbf{R_8}$. Todo ello mejora la actividad sobre las grampositivas [123].
- **Quinolonas de cuarta generación**: están formada por aquellas con una cadena lateral metoxi en la posición $\mathbf{R_8}$ [129].

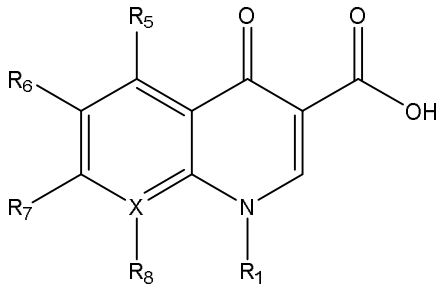


Figura 15. Estructura general de las quinolonas.

1.5.1.2.DICLOFENACO

Los fármacos aniinflamatorios no esteroideos (AINEs) poseen una actividad antitérmina y, en su mayoría, antiinflamatoria. Comparten las tres acciones que definen a este grupo (analgésica, antitérmica y antiinflamatoria), aunque su eficacia relativa para cada una de ellas es diferente [130]. El fármaco prototipo de este grupo es el ácido salicílico, que fue patentado por Bayer en 1899 como Aspirina®. A principios de la década de 1950, la Compañía Geigy (Suíza) descubrió un nuevo compuesto, fenilbutazona, un derivado de pirazolidina que se convirtió en el primer AINE sin salicilato. A finales de la década de 1950, se desarrolló indometacina, el primer derivado del ácido acético con propiedades antiinflamatorias, sintetizado por T.Y. Shen [131]. La compañía Boots desarrolló una variedad de compuestos derivados del ácido propiónico, como ibuprofeno que fue comercializado en 1969, y flurbiprofen, en 1977. La compañía Parke-Davis desarrolló derivados del ácido fenámico. Diclofenaco sódico fue sintetizado por Alfred Sallmann y Rudolf Pfister e introducido en 1973 por Ciba-Geigy (actualmente Novatis AG, Suiza) [132, 133]. Su estructura se muestra en la **Figura 16a**.

Los AINEs pueden clasificarse atendiendo a su estructura química o su mecanismo de acción [130, 133, 134]:

- **Salicilatos**: comparten un núcleo principal de 2-hidroxibenzoico (ácido salicílico). Destaca dentro de este grupo el acetilsalicílico (aspirina).
- **Derivados del ácido propiónico**: derivados del ácido fenilpropiónico. El primero de la serie fue ibuprofeno. Pertenecen a este grupo naproxeno, ketoprofeno y flurbiprofen.
- **Derivados del ácido acético**: comparten diversos sistemas cíclicos (anillos indólicos, pirrólicos, fenilos o piranoindólicos) que contienen moléculas de ácido acético. Dentro de este grupo se diferencian los derivados indolacéticos, pirrolacéticos, fenilacéticos (diclofenaco) y piranoindolacéticos. La estructura de diclofenaco se muestra en la **Figura 16b**.
- **Derivados del ácido enólico**: a diferencia de otros AINEs que son ácidos carboxílicos, estos derivados son ácidos enólicos. Entre ellos, se encuentra piroxicam (primero en ser introducido en terapéutica) y meloxicam (recientemente introducido en España).
- **Derivados del ácido antranílico**: derivados del ácido *N*-fenilantranílico, denominados como fenamatos. Incluye el ácido mefenámico, meclofenámico y flufenámico.

- **Otros:**
  - **Paraaminofenoles**: derivados de la anilina. El más utilizado es paracetamol, aunque no es un AINE en sentido estricto al carecer de actividad antiinflmatoria. Sin embargo, posee actividad antitérmica y analgésica comparable a la de aspirina.
  - **Sulfonanilidas**.
  - **Alcanonas.**

1.5.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

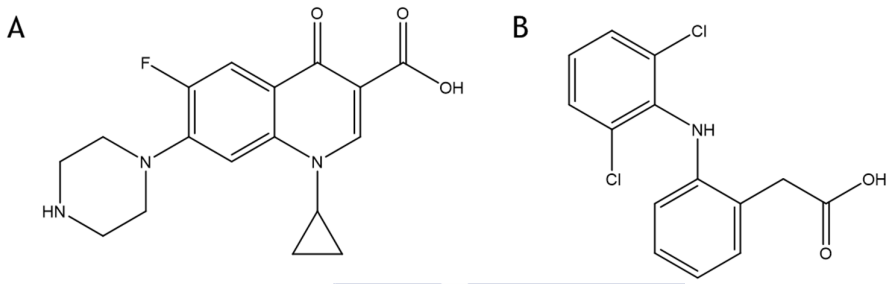


Figura 16. Estructuras químicas de ciprofloxacino (A) y diclofenaco (B).

En la **Tabla 10** se muestran las propiedades físico-químicas de los dos compuestos estudiados en esta memoria, ciprofloxacino y diclofenaco.

Tabla 10. Características físico-químicas de los compuestos esudiados.

Compuesto	Categoría	Nombre IUPAC	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	pKa	Log P
Ciprofloxacino	Antibiótico	1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-quinoline-3-carboxylic acid	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$	331.34	6.43	1.63
Diclofenaco	AINE	[2-(2,6-Dichloroanilino)phenyl]acetic acid	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	296.15	4.18	4.55

1.5.3. TOXICIDAD

Todas las quinolonas (de primera y segunda generación) pueden originar molestias gastrointestinales, como náuseas, diarrea o dolor abdominal [124, 125]. Los efectos adversos son en su mayoría de carácter leve. Los casos en los que se produjo sobredosis presentaron neurotoxicidad y posible insuficiencia renal [126].

Los AINEs se caracterizan por provocar alteraciones y lesiones gastrointestinales, las más frecuentes leves, como dolor gástrico, diarrea o estreñimiento. Las más graves pueden provocar lesiones en la mucosa gástrica o duodenal. Diclofenaco, como derivado del ácido acético, provoca reacciones neurológicas bastante frecuentes, como cefalea, vértigo, mareos, desorientación o confusión mental. Además, puede agravar la epilepsia y la depresión mental [130].

2. MATRICES BIOLÓGICAS

Las muestras biológicas utilizadas en los análisis toxicológicos clínicos y forenses pueden ser numerosas y variables. Se seleccionan en función de la historia del caso, las solicitudes, los aspectos legales y la disponibilidad de dichas muestras [135]. Generalmente, las muestras más recolectadas y enviadas a los servicios toxicológicos son la orina y la sangre. Sin embargo, hay otras muestras que pueden ser utilizadas, como la saliva, el sudor, el pelo, el contenido gástrico, el humor vítreo o diversos tejidos (hígado, pulmones, cerebro, etc), entre otras [136].

2.1. ORINA

Una de las principales funciones del riñón es filtrar los productos de desecho del metabolismo de la sangre y eliminar cualquier sustancia nociva a través de la orina (**Figura 17**) [137]. Este fluido es un líquido acuoso, transparente y amarillento. Está compuesto en su mayoría por agua (>90%) y un pequeño porcentaje de sales inorgánicas y orgánicas, como urea, creatinina, hormonas, y un amplio rango de metabolitos. Dentro de los compuestos que componen la orina, la urea es el constituyente más predominante (>50% de los sólidos orgánicos totales) y se produce mediante el metabolismo de las proteínas. Otros solutos excretados son el sodio y el potasio (derivados de la ingesta dietética). La orina se caracteriza por tener un pH de 6.2, aunque éste puede variar dentro del rango 5.5-7.0, dependiendo de diversos factores, predominando el factor de la dieta [138].

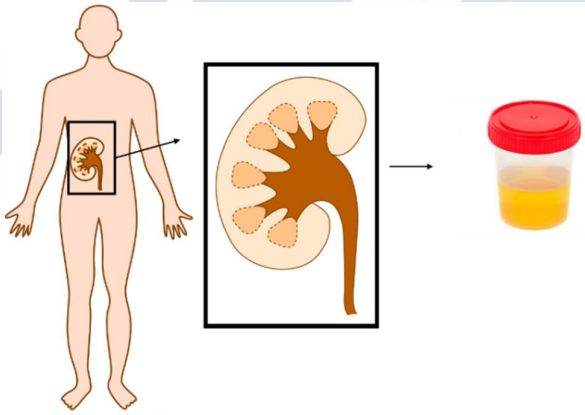


Figura 17. Formación de la orina.

La orina se caracteriza por poseer concentraciones elevadas de diferentes compuestos por la acumulación de fármacos, drogas y metabolitos, facilitando la detección del consumo o exposición a dichos compuestos. Por ello, la orina es utilizada frecuentemente en los cribados cualitativos (*screening*), sin necesidad de un tratamiento previo de la muestra, ya que contiene muy bajo porcentaje de proteínas y lípidos, a diferencia de la sangre. Sin embargo, no existe una correlación entre la concentración del fármaco/droga en la orina y los efectos farmacológicos. Además, el amplio rango de pH de la orina influye en la excreción de algunos fármacos/drogas. Los compuestos débilmente básicos (por ejemplo, metadona) se excretan eficazmente en la orina ácida, mientras que los compuestos débilmente ácidos lo hacen en la orina básica [135]. Entre las ventajas de esta matriz están: la disponibilidad de grandes volúmenes de muestra [137], la facilidad de

recogida (no invasiva, aunque puede ser fácilmente adulterada) y la amplia ventana de detección de los compuestos (2-4 días) [139].

2.2. PLASMA

La sangre en un fluido que circula a través de los vasos del sistema circulatorio. Está formado, en su mayoría, por plasma (55%) y el 45% restante de glóbulos rojos (responsables de transportar oxígeno y dióxido de carbono), plaquetas (responsables de la coagulación de la sangre) y glóbulos blancos (que forman parte del sistema inmunológico) (**Figura 18**). El plasma se puede aislar centrifugando a altas velocidades la sangre. Las células y plaquetas sedimentan en el fondo del tubo, mientras que el plasma permanece en la parte superior formando una capa amarillenta. El plasma está formado en un 90% de agua y el 10% restante de su volumen lo componen en su mayoría proteínas, encontrándose también iones, nutrientes, desechos y gases disueltos [135, 140].

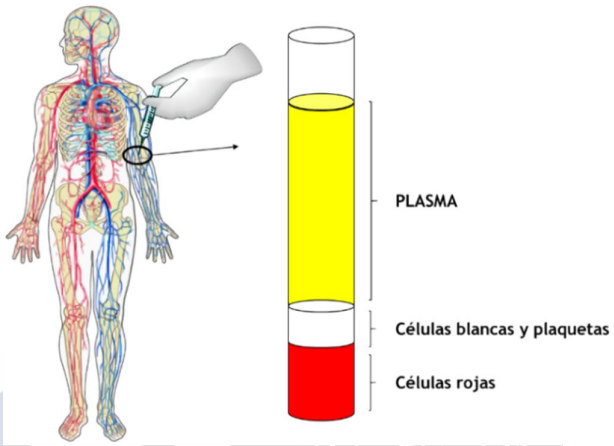


Figura 18. Componentes de la sangre.

La sangre es la única matriz biológica que refleja la concentración del fármaco/droga en el cerebro [139]. Por ello, es la matriz elegida para cuantificar e interpretar las concentraciones de los compuestos y metabolitos correspondientes [135]. Tiene la desventaja de que su recolección es invasiva, y debe ser realizada por personal cualificado. Además, necesita de aditivos para su conservación y su ventana de detección es menor que en la orina (de horas a 2 días, pudiéndose detectar compuestos justo después de su ingesta, antes del metabolismo y/o eliminación) [136, 139].

2.3. FLUIDO ORAL

La saliva es un fluido orgánico complejo producido por un grupo de glándulas exocrinas, denominadas glándulas salivales. Estas glándulas se clasifican según su tamaño anatómico como: glándulas salivales menores, responsables de la producción del 5-8% de la saliva, y glándulas salivales mayores, responsables del 92-95% de la saliva producida [141, 142]. Las glándulas salivales mayores están formadas por: las glándulas parótidas (responsables del 30% de la producción salival), las glándulas submandibulares (responsables del 55-65% de la saliva producida) y las glándulas sublinguales (contribuyen con un 5% a la producción salival) (**Figura 19**) [141]. La saliva completa o total (fluido oral, OF) se refiere a la mezcla compleja de fluidos de las glándulas salivares, mucosa oral, fluido gingival, además de la secreción mucosa de la cavidad

nasal y faringe, bacterias orales, restos de comida, así como trazas de productos químicos [142-144].

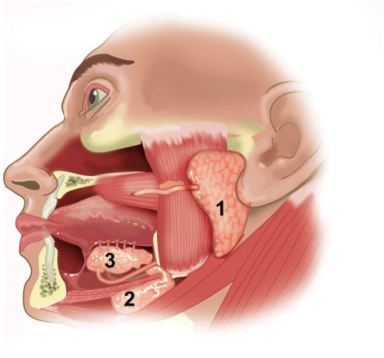


Figura 19. Glándulas salivales mayores: glándulas parótidas (1), glándulas submandibulares (2) y glándulas sublinguales (3) (Con permiso de *John Wiley and Sons* (Ed.); [145]).

La cantidad y composición de la saliva secretada depende de varios factores (velocidad del flujo salival, dieta, edad, sexo, estado fisiológico, etc), pero de media, la cantidad total diaria de saliva producida en individuos sanos oscila ente 0.5-1.5 L [142-144]. La saliva está compuesta en su mayoría por agua (95-99%) y el resto por electrolitos (calcio, magnesio, sodio, potasio, cloruro, bicarbonato y fosfato), proteínas, enzimas, inmunoglobulinas, mucinas, y otros compuestos como urea y amoniaco (productos metabólicos) [142, 143]. Su pH normal está en torno 6-7 (ligeramente ácida), aunque puede variar entre 5.3 (flujo bajo) y 7.8 (flujo alto) [141, 142].

Las principales ventajas que ofrece este tipo de matriz biológica son: la toma de muestra no es invasiva y no necesita de aditivos para su conservación (a diferencia de la muestra de sangre), la probabilidad de adulteración es baja (en comparación a la muestra de orina), refleja mejor el consumo reciente de drogas, ya que los niveles de droga en la saliva se pueden correlacionar con la concentración de droga libre en la sangre [143, 146]. Entre las desventajas están: la limitación en el volumen de muestra obtenido (1-2 mL), las concentraciones encontradas de fármaco/droga son frecuentemente menores que en sangre u orina, la posibilidad de contaminación de la muestra debido a la ingesta de alimentos y bebidas, y la influencia del pH. Así, un aumento de pH (causado por la estimulación del flujo salival, por ejemplo) puede reducir las concentraciones del compuesto debido a la dilución [143, 146].

2.4. HUMOR VÍTREO

El humor vítreo (HV) es una sustancia gelatinosa que ocupa la cavidad posterior del ojo, situada entre la retina y el cristalino (**Figura 20**). Su función es mecánica, manteniendo la retina en su lugar, y manteniendo la forma esférica y el tono del globo ocular.

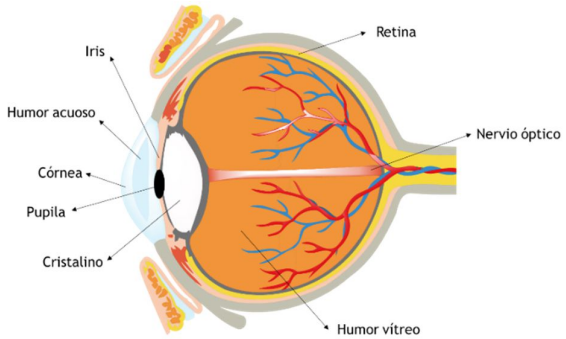


Figura 20. Esquema de un ojo humano.

Está compuesto por un alto porcentaje de agua (98-99.7%) y tiene un volumen medio de 4 mL. También contiene proteínas fibrilares (compuestas principalmente de fibras de colágeno asociadas a ácido hialurónico) que le proporciona esa estructura gelatinosa, electrolitos (sodio, potasio, cloruro, lactato y ascorbato), carbohidratos y pequeñas cantidades de proteínas, distintas del colágeno. El HV se caracteriza también por tener muy pocas células y por ser avascular [147, 148].

Es una muestra ampliamente usada en toxicología forense, como matriz alternativa a la sangre. Además, las concentraciones de drogas en el HV suelen reflejar las concentraciones plasmáticas circulantes una o dos horas antes de la muerte, sobre todo aquellas que tienden a ser más hidrofílicas a pH fisiológico [135, 148]. Es una muestra que es menos susceptible a la contaminación o a fenómenos enzimáticos o bacterianos debido a su localización aislada en el ojo [135, 147, 148]. El volumen recogido está limitado a 2 mL (cada ojo), para evitar las células epiteliales de la retina o el iris durante su aspiración [147].

En la **Tabla 11**, se recogen las principales características de las muestras biológicas estudiadas en esta tesis:

Tabla 11. Principales características de las muestras biológicas seleccionadas en esta tesis.

MUESTRA	TIPO DE OBTENCIÓN	TIEMPO DE DETECCIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS
ORINA	Antemortem Postmortem	2-4 días	-Toma de muestra no invasiva. -Gran volumen de muestra (20-50 mL). -Concentraciones elevadas de drogas y metabolitos. -No necesita aditivos para su conservación.	-Posibilidad de adulteración. -No existe relación entre la concentración y la dosis. -Niveles bajos de la droga original. -No siempre está disponible.
SANGRE/ PLASMA	Antemortem Postmortem	1-2 días	-Determinación de consumo reciente. -Correlación con el estado clínico y el efecto farmacológico. -No manipulable.	-Toma de muestra invasiva. -Necesidad de aditivos para su conservación. -Volumen limitado. -Tiempos cortos de detección.

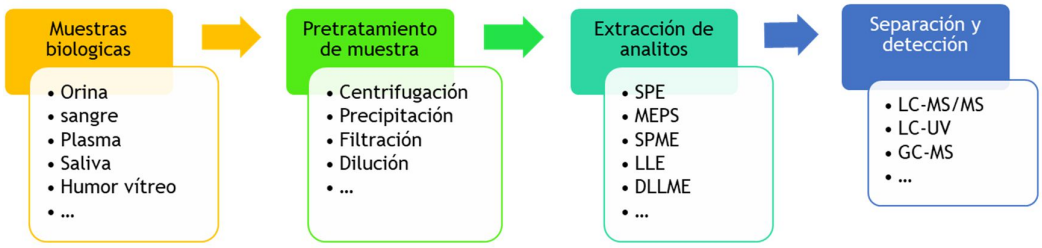
Tabla 11. Principales características de las muestras biológicas seleccionadas en esta tesis *(continuación)*.

MUESTRA	TIPO DE OBTENCIÓN	TIEMPO DE DETECCIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS
FLUIDO ORAL (OF)	Antemortem	1-2 días	-Detección de reciente consumo de drogas. -Fácil recogida de muestra. -Detección de drogas sin modificar y algunos metabolitos.	-Posibilidad de contaminación después de administración oral, fumanda o intranasal. -Bajo volumen de muestra recogida (1-2 mL). -Tiempo de detección corto. -Limitado a individuos vivos.
HUMOR VÍTREO (HV)	Postmortem	Horas-Días	-Consumo reciente de drogas. -Relacionado con el efecto farmacológico. -Resistente a la putrefacción. -Mínima preparación de muestra. -Pocas interferencias en la muestra.	-Limitado a cadáveres. -Poco volumen de muestra recogido (2 mL). -Pocos datos para comparar.

3. TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.1. TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA

El completo desarrollo de un método analítico requiere un número intermedio de etapas desde la toma de muestras hasta el informe final con los resultados.



En la química analítica, concretamente en la toxicología analítica forense, la preparación de muestra es fundamental. Las drogas y sus metabolitos están generalmente presentes a niveles traza en los fluidos biológicos y las matrices biológicas tienen cierta complejidad. Las características buscadas en estos métodos de preparación son la simplicidad y la rapidez de ejecución para poder aplicarlo a un gran número de muestras [149-151]. Las técnicas tradicionales incluyen la extracción líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE) y la extracción en fase sólida (*solid-phase extraction*, SPE). Sin embargo, estas técnicas convencionales requieren un elevado consumo de muestra, reactivos y tiempo. En las últimas décadas, la tendencia es el uso de técnicas de microextracción y/o la miniaturización de procedimientos convencionales, así como el desarrollo de nuevos métodos y materiales respectuosos con el medio ambiente (Química Verde) [152-155]. Por ello, se han desarrollado técnicas como la microextracción con adsorbentes empaquetados (*microextraction by packed sorbents*, MEPS), la microextracción líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME) o la extracción mediante fases funcionalizadas (*fabric phase sorptive extraction*, FPSE) para la extracción de numerosas drogas en distintas matrices.

3.1.1. MICROEXTRACCIÓN CON ADSORBENTES EMPAQUETADOS (*MICROEXTRACTION BY PACKED SORBENT*, MEPS)

La microextracción con adsorbentes empaquetados (MEPS) ha sido introducida por Abdel Rehim en 2004 [156]. Es una miniaturización de la técnica convencial SPE, donde una pequeña cantidad de adsorbente (aproximadamente 1-4 mg) se empaqueta en el interior de un cartucho que se sitúa entre el cuerpo y la aguja de una jeringa, a diferencia de los cartuchos de la SPE. Esta técnica ha sido ampliamente usada para extraer un amplio rango de analitos en diversas matrices. Entre sus ventajas destacan la reducción de los volúmenes de disolvente y muestra, así como de los residuos generados; la posibilidad de reutilizar el adsorbente en numerosas extracciones; y la integración de las etapas de extracción y determinación, pudiendo acoplarlo al sistema cromatográfico [157].

Las etapas son análogas a las de la SPE: acondicionamiento de la fase adsorbente, paso de la muestra por el lecho adsorbente para la retención de los analitos de interés, el lavado de posibles compuestos interferentes retenidos en la fase y la posterior elución de los compuestos para su posterior determinación (**Figura 21**). Adicionalmente, MEPS incluye una etapa final de lavado de la fase adsorbente para su posterior reutilización en un nuevo ciclo de extracción. Además, el paso de la muestra es ligeramente diferente que

en la SPE. El flujo de la muestra es en una sola dirección en la SPE. Sin embargo, en MEPS, el flujo de la muestra es en dos direcciones (aspiración y expulsión de un pequeño volumen de muestra dentro del mismo vial que la contiene).

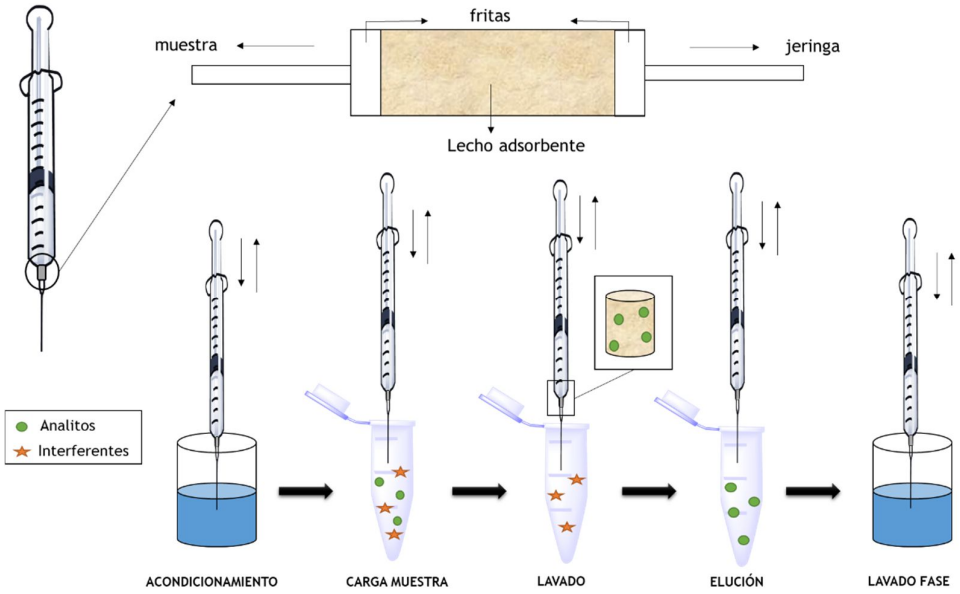


Figura 21. Esquema de la MEPS y sus etapas.

Existen una serie de factores que pueden afectar a la extracción con MEPS [158]. Uno de ellos es la naturaleza del adsorbente. Comercialmente, existen distintos adsorbentes basados en sílice, como son: sílice sin modificar (SIL), dimetil sobre sílice (C_2), octil sobre sílice (C_8), octadecil sobre sílice (C_{18}) y modo mixto (M1) compuesto por C_8 e interambio catiónico (SCX) (80% C_8 y 20% SCX con sílice unida con ácido sulfónico); poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB), y carbón poroso grafitizado (Hiper-Carb) [159]. En los últimos años se han desarrollado nuevos adsorbentes no comerciales incluyendo polímeros de impronta molecular (MIPs), polipirrol/poliamida, materiales nanoporosos, y monolitos de sílice funcionalizados para extraer diferentes grupos de analitos [153, 157]. Otro de los factores que pueden afectar al rendimiento de la extracción es el número de ciclos en los que la muestra pasa por el lecho adsorbente, incrementando la concentración de dichos analitos en la fase al aumentar los ciclos de extracción. El estudio de los disolventes de lavado y de elución también afectarán a dicha extracción. El disolvente de lavado tiene la capacidad de arrastrar las posibles interferencias retenidas en el adsorbente, sin eluir a los compuestos de interés. Los disolventes más utilizados para lavar la fase son agua o disoluciones acuosas con un pequeño porcentaje (5-10%) de disolvente orgánico, como metanol, isopropanol o acetonitrilo. En cambio, el disolvente de elución tiene que ser capaz de desplazar los analitos desde el lecho adsorbente a un pequeño volumen de eluyente. Las disoluciones de metanol, isopropanol, acetonitrilo u otro disolvente orgánico, puras o mezcladas con un pequeño porcentaje (0.1-3%) de disoluciones ácidas o básicas son empleados normalmente como eluyentes [160, 161].

3.1.1.1. APLICACIONES DE MEPS

En los últimos años, MEPS ha sido ampliamente utilizada en diferentes campos de investigación (clínico, toxicológico, medioambiental y alimentario) para la extracción de

un amplio número de distintos compuestos (drogas de abuso, pesticidas, contaminantes medioambientales, etc) en diferentes matrices biológicas y no biológicas [161]. En el campo de la toxicología analítica, Rosado *et al.* [162] optimizaron un método MEPS para la purificación de muestras de pelo con el fin de determinar cocaína y sus metabolitos. Basándose en trabajos previamente publicados de SPE sobre estos analitos, determinaron el tipo de fase (modo mixto, M_1) y los disolventes de acondicionamiento, lavado de la fase, y el disolvente de elución. Además, emplearon un diseño experimental para optimizar el resto de factores: el número de ciclos de extracción, el volumen del disolvente de lavado y el número de ciclos de elución. Da Cunha *et al*. [163] desarrollaron un método MEPS para la cuantificación simultánea de fentanilo y derivados (sufentanilo, alfentanilo, acrilfentanilo, tiofentanilo, valerilfentanilo, furanilfentanilo, acetilfentanilo y carfentanilo, y dos metabolitos, norfentanilo y acetil norfentanilo) en muestras de orina con una fase C_{18}. Estos autores también hicieron uso de los diseños experimentales para optimizar los factores que consideraron más relevantes para la extracción con MEPS: la velocidad de carga/expulsión de la muestra en la jeringa y el número de ciclos, mediante un diseño factorial, y el tipo de disolvente de elución, con un diseño mixto. Además, durante el desarrollo del método observaron que era necesaria una dilución de la muestra de orina, con el fin de evitar pérdidas en la eficiencia de la extracción y para alargar la vida de la fase. Sorribes-Soriano *et al*. [164] determinaron metilona en fluido oral mediante MEPS usando una fase C_{18}. Optimizaron variables, como pH, fuerza iónica, número de ciclos de extracción, tipo de disolvente de lavado, y tipo, volumen y número de ciclos del disolvente de elución. Prata *et al*. [165] determinaron opioides (morfina, codeína y 6-MAM) en sangre mediante MEPS. Estos autores optimizaron mediante un diseño factorial fraccionado los siguientes factores: el número de ciclos de extracción, el porcentaje de ácido fórmico en el disolvente de lavado, el número de ciclos de lavado, la cantidad de hidróxido amónico en el disolvente de elución, y el número de ciclos de elución. Previamente a la extracción, fue necesaria una etapa de precipitación de proteínas con acetonitrilo, para evitar la obturación del cartucho que contiene la fase mixta (M_1) utilizada. Rocchi *et al*. [166] desarrollaron un método para la cuantificación simultánea de 31 NSP, entre ellas catinonas, en fluido oral. El procedimiento implicó una preparación de muestra basada en la precipitación de proteínas seguida de una extracción mediante MEPS con una fase C_{18}. En la optimización de MEPS, los autores evaluaron la composición de los disolventes de carga, lavado y elución, modificando el porcentaje de metanol.

Como se puede observar, en los últimos años, esta técnica miniaturizada se ha empleado en diversas matrices biológicas para determinar un amplio rango de drogas de abuso. En la **Tabla 12**, se recompila una revisión de los trabajos publicados sobre MEPS aplicados al campo forense para la extracción de diversas drogas de abuso.

Tabla 12. Revisión bibliográfica de MEPS aplicada al campo toxicológico-forense.

Compuestos	Matriz	Volumen de muestra	Fase	Nº ciclos de extracción	Disolvente extractante	Técnica de determinación	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Recuperación (%)	Referencia
Cocaína, metabolitos	Pelo	50 mg	M_1	21	3 x 0.1 mL 2% NH_4OH en MeOH	GC-MS/MS	-	0.01-0.15 ng/mg	0.8-73.2	162
Opioides (fentanilo y derivados)	Orina	0.8 mL	C_{18}	8	0.05 mL ACN	LC-MS/MS	0.1	1	4.8-27	163
Metilona	Fluido oral	0.5 mL	C_{18}	5	5 x 0.1 mL IPA	IMS LC-MS/MS	4	14	78-91	164
Opioides	Sangre	0.25 mL	M_1	20	11 x 0.25 mL 2.36% NH_4OH en MeOH	GC-MS/MS	5	5	6-23	165
31 NPS	Fluido oral	0.2 mL	C_{18}	5	5 x 0.1 mL 10 mM HCOOH en MeOH	LC-MS/MS	0.005-0.850	0.015-2.6	31-96	166
Cocaína, metabolitos	Orina	0.2 mL	M_1	6	4 x 0.1 mL 1% NH_4OH en MeOH	GC-MS	-	25	14-83.3	167
Opioides, cocaína y metabolitos, catinonas	Plasma	0.3 mL	M_1	10	0.2 mL DCM/IPA/NH_4OH (78:20:2)	LC-DAD	5-25	10-50	80-104	168
Anfetaminas, opioides, cocaína y metabolitos, y otras drogas de abuso	Fluido oral	0.12 mL	C_{18}	5	5 x 0.1 mL 5 mM HCOOH en MeOH	LC-MS/MS	0.3-10	0.5-30	18-102	169
Ketamina, metabolito	Orina	0.25 mL	M_1	8	0.1 mL 6% NH_4OH en MeOH/	GC-MS/MS	5	10	63-101	170
	Plasma			26	0.1 mL 3% NH_4OH en MeOH					

Tabla 12. Revisión bibliográfica de MEPS aplicada al campo toxicológico-forense (*continuación*).

Compuestos	Matriz	Volumen de muestra	Fase	Nº ciclos de extracción	Disolvente extractante	Técnica de determinación	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Recuperación (%)	Referencia
Anfetamina, metadona	Orina	0.1 mL	C_8	5	5 x 0.05 mL 0.1% HCOOH en MeOH	MS/MS	0.06-3	0.2-10	91.7-106.7	171
Canabinoides	Fluido oral	0.125 mL	C_{18}	5	2 x 0.025 mL 50 mM NH_4OH en MeOH	LC-MS/MS	0.008-0.12	0.020-0.4	50-105	172
Cocaína, metabolitos	Orina	-	Clean Screen DAU	-	0.1 mL DCM/IPA/NH_4OH (78:20:2)	DART-TOF	4-23.7	65-95	93-116	173
Metanfetamina, anfetamina	Pelo	1-5 mg	C_{18}	15	MeOH	MiAMi-GC-MS	-	0.2 ng/mg	61.1-74.2	174

3.1.2. MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (*DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION*, DLLME)

La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) es una miniaturización de la técnica tradicional LLE, introducida por Rezaee *et al*. en 2006 [175]. Se basa en un sistema ternario de disolventes, consistente en una fase acuosa que contiene los analitos de interés, un disolvente dispersante miscible con la fase acuosa y con el tercer componente del sistema, el disolvente extractante. La mezcla formada por el dispersante y el extractante se inyecta rápidamente en la disolución acuosa formando una disolución turbia. Esta microemulsión consiste en minúsculas gotas de disolvente extractante dispersadas en la fase acuosa, aumentando la superficie de contacto entre ellas y alcanzándose el equilibrio rápidamente. Posteriormente, la disolución se centrifuga para que las gotas de extractante sedimenten, formándose una única gota de mayor tamaño que es extraída mediante una microjeringa y finalmente inyectada en el sistema cromatográfico (**Figura 22**) [155, 176].

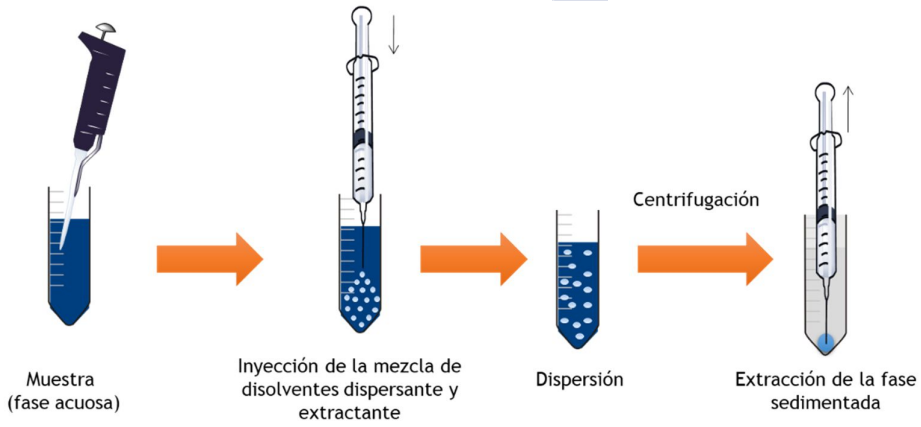


Figura 22. Esquema de la DLLME.

Entre los factores que afectan a esta técnica se encuentran el tipo de disolvente extractante y dispersante [177]. En la DLLME clásica, los disolventes de extracción tienen la característica de ser más densos que la muestra acuosa, para una efectiva separación después de la etapa de centrifugación. Además, el extractante debe extraer completamente los analitos de interés, al igual que en la técnica convencional (LLE) y tener un punto de ebullición alto, para evitar que se evapore y así no perder reproducibilidad en los resultados. Los más utilizados son los disolventes clorados, como cloroformo, tetracloruro de carbono, clorobenceno o diclorometano. Los disolventes utilizados generalmente como dispersantes son disolventes polares, tales como metanol, acetonitrilo, acetona o isopropanol, miscibles tanto con la muestra acuosa como con el disolvente extractante [178]. Además, los volúmenes de estos dos tipos de disolventes afectan a la eficacia de la extracción, así como a la preconcentración (factor de enriquecimiento). Otro parámetro a tener en cuenta es el efecto salino. La adición de sales reduce la solubilidad de los analitos en la fase acuosa, favoreciendo el paso de éstos al disolvente orgánico (extractante) debido al efecto *salting-out*. Sin embargo, la fuerza iónica de la disolución puede llevar a factores de enriquecimiento menores, debido al mayor tamaño de la fase sedimentada [178].

A lo largo de los últimos años, DLLME ha evolucionado para lograr la dispersión mediante la ayuda de diferentes procesos como la combinación de la extracción con microondas (MAE) o asistida de ultrasonidos (UAE) y la utilización de disolventes extractantes menos tóxicos, como los líquidos iónicos o los disolventes extractantes menos densos que la fase acuosa, como alcoholes (1-dodecanol, 1-undecanol o hexadecanol) [155, 177-179]. Las principales ventajas de esta técnica son la pequeña cantidad necesaria de disolvente extractante, la rápida extracción y los elevados factores de enriquecimiento (EFs, definidos como la relación entre la concentración de analito en la fase sedimentada y la concentración inicial en la fase acuosa) que se consiguen debido a la alta relación de fase entre la fase donante y la aceptora; además de la simplicidad, rapidez y eficacia [176, 177].

3.1.2.1. APLICACIONES DE DLLME

La DLLME ha sido aplicada a un amplio número de compuestos en diversos campos, como la determinación de pesticidas en estudios medioambientales, contaminantes en matrices alimentarias [180] y diversas drogas de abuso en toxicología forense [155]. En el campo forense, la DLLME ha sido ampliamente usada sóla o en combinación con otras técnicas para la determinación de drogas de abuso (como opioides, alucinógenos, anfetaminas, cocaína, antidepresivos, cannabinoides y NSP, entre ellas, catinonas).

Mercieca *et al*. [181] aplicaron la microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonidos (UA-DLLME) a la extracción de cannabinoides sintéticos en orina y plasma. En muestras de orina, la DLLME se llevó a cabo con 150 µL de cloroformo y 5 min de ultrasonidos. En este caso, no se ha utilizado disolvente dispersante. Sin embargo, la eficacia de extracción de UA-DLLME en muestras de sangre fue por debajo del 30%. Los autores explican que esto pudo ser debido a la desproteinización de la sangre con metanol, introduciendo un disolvente dispersante en la mezcla de extracción. Wang *et al*. [182] emplearon la UA-DLLME para determinar fluoxetina y su metabolito, norfluoxetina, en muestras de orina y plasma. Evaluaron distintos parámetros, tales como: tipo de disolvente extractante y dispersante, y sus volúmenes, pH de la muestra, adición de sal, y tiempo de ultrasonidos. Las condiciones óptimas fueron 200 µL de dispersante (acetona), 50 µL de extractante (tetracloroetano, $C_2H_2Cl_4$), un pH alcalino (11.5) y 1 min de US. Fernández *et al*. [183] aplicaron US-DLLME a la determinación de 10 catinonas y 10 drogas ilícitas en muestras de fluido oral. Los factores que afectaron a la extracción (volumen de muestra, volúmenes de dispersante y extractante, pH de la muestra, tiempo de US y cantidad de cloruro sódico) fueron estudiados mediante diseño de experimentos, reduciendo el tiempo de optimización de dichos factores. Un pequeño volumen de muestra (0.5 mL) fue mezclado con 1.4 mL de MeOH (disolvente que actúa como dispersante y precipitador de proteínas). El disolvente extractante utilizado fue cloroformo (200 µL). La extracción se vio favorecida por la adición de 0.1 g de NaCl, pH 8 y 5 min de sonicación. Vicenti *et al*. [184] combinaron la extracción con líquidos presurizados (PLE) y DLLME para la determinación de 60 drogas de abuso, incluyendo sustancias tradicionales (morfina, codeína, anfetaminas) y NSP (cannabinoides sintéticos, catinonas) en muestras de pelo. Después de una etapa de descontaminación de las muestras de pelo y extracción de los analitos mediante PLE, los extractos obtenidos se sometieron a un procedimiento de *clean-up* mediante DLLME. Para ello, los autores han utilizado 500 µL de 2-propanol (IPA) y 200 µL de cloroformo como dispersante y extractante, respectivamente. El procedimiento se vió favorecido con la adición de 1.2 g de cloruro sódico y 10 min de sonicación. DLLME permite una rápida preconcentración

de los compuestos desde los extractos acuosos obtenidos en la PLE hacia un pequeño volumen de disolvente orgánico. Sin embargo, se produjo una pérdida significativa para algunos analitos, aunque la buena reproducibilidad en el proceso general hace que el proceso sea adecuado para dichos analitos. Xu *et al*. [185] optimizaron un método DLLME para la determinación simultánea de metanfetamina, petidina, ketamina y tramadol en muestras de orina. En este trabajo, los autores estudiaron conjuntamente una serie de disolventes dispersante-extractante, obteniendo los mejores resultados con etanol-tetracloroetileno. Alahyari *et al.* [186] analizaron tres opioides (morfina, codeína y metadona) en muestras de orina post-mortem mediante DLLME. Para ello optimizaron los parámetros: tipo y volumen de disolvente extractante y dispersante (300 µL de cloroformo y 500 µL de acetona, respectivamente), pH de la muestra (9.8) y el tiempo de extracción (el tiempo de inyección de la mezcla dispersante/extractante, 30 s). Mercieca *et al*. [187] desarrollaron un procedimiento DLLME para la extracción simultánea de catinonas, anfetaminas y otras NSP en orina y sangre. La DLLME se llevó a cabo con 350 µL de una mezcla cloroformo/metanol (1:2.5) en muestras de orina y 700 µL de cloroformo/metanol (2:5) para muestras de sangre. Estos volúmenes permitieron la formación de la disolución turbia, resultando en buenas recuperaciones para todos los compuestos estudiados. Martins *et al*. [188] aplicaron la DLLME para la determinación de cocaína y sus metabolitos en aguas efluyentes hospitalarias. La extracción se llevó a cabo con 150 µL de cloroformo (extractante) y 350 µL de metanol (dispersante), a un pH 9 y con adición de sal (0.3 mol/L). Además, aplicaron también la SPE al estudio de estos analitos. Sin embargo, la DLLME ofreció ventajas como simplicidad, y pequeños volúmenes de disolventes y muestra, con respecto a la técnica convencional. En la **Tabla 13** se recoge una amplia revisión de la DLLME aplicada al campo forense para la extracción de diversas drogas de abuso, en los últimos años.

Tabla 13. Aplicaciones de la DLLME en el campo toxicológico-forense.

Compuestos	Matriz	Volumen de muestra	pH de la muestra	Disolvente dispersante	Disolvente extractante	Técnica de determinación	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Recuperación (%)	Referencia
Canabinoides sintéticos	Orina	2 mL	7	-	0.15 mL $CHCl_3$	GC-MS	1-5	5	63-94	181
	Sangre									
Fluoxetina, norfluoxetina	Orina	1 mL	11.5	0.2 mL CH_3COCH_3	0.05 $Cl_2CHCHCl_2$	FASS-CE-UV	0.1-0.8	0.2-3	-	182
	Plasma									
20 NSP (10 catinonas)	Fluido oral	0.5 mL	8	1.4 mL MeOH	0.2 mL $CHCl_3$	UHPLC-MS/MS	0.1-25	0.25-50	74-129	183
60 Drogas de abuso (opioides, catinonas, anfentaminas, canabinoides)	Pelo	5 mL	11	0.5 mL IPA	0.2 mL $CHCl_3$	LC-HRMS	0.1-5 pg/mg	0.2-50 pg/mg	39-95	184
Metanfetamina, petidina, ketamina, tramadol	Orina	5 mL	10	0.5 mL EtOH	0.03 mL C_2Cl_4	GC-MS	0.4-1.96	1.44-6.53	80.45-95.55	185
Opioides	Orina	5 mL	9.8	0.5 mL CH_3COCH_3	0.3 mL $CHCl_3$	HPLC-DAD	9-25	30-100	87.5-107.9	186
Catinonas, anfetaminas, NSP	Orina	2 mL	9	0.35 mL $CHCl_3$/MeOH (1:2.5)		GC-MS	1-10	2-50	79.4-116	187
	Sangre			0.7 mL $CHCl_3$/MeOH (2:5)						
Cocaína, metabolitos	Aguas hospitalarias	5 mL	9	0.35 mL MeOH	0.15 mL $CHCl_3$	HPLC-FL-DAD	0.1	0.3	3.1-102.6	188
4 DBZD	Orina	1 mL	11.3	-	0.168 mL $CH_3COOCH_2CH_3$	GC-MS/MS	1-3	3.5-10	73.8-85.5	189

Tabla 13. Aplicaciones de la DLLME en el campo forense (*continuación*).

Compuestos	Matriz	Volumen de muestra	pH de la muestra	Disolvente dispersante	Disolvente extractante	Técnica de determinación	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Recuperación (%)	Referencia
Anfetaminas, meperidina, metadona, ketamina	Sangre	0.2 mL	13	1.3 mL MeOH	0.2 mL $CHCl_3$	GC-MS	10	40	77-92.4	190
6 ATD	Plasma	0.5 mL	9.8	2.5 mL ACN	0.2 mL $CHCl_3$	UHPLC-DAD	4-5	12-17	92.5-110	191
Fenproporex, dietilpropiona, sibutramina	Orina	5 mL	11	1.0 mL MeOH	0.3 mL DCM	GC-MS	0.05-0.1	1	91.7-96.6	192
Fentanilo	Orina	0.5 mL	11	0.2 mL MeOH	0.03 mL C_6H_5Cl	GC-MS	1	1	89.9-102.6	193
8 BZD	Orina	3 mL	-	1.0 mL EtOH	0.5 mL DCM	FASS-MEKC	20-30	50-100	90.65	194
Anfetaminas, metcatinona, ketamina, meperidina, metadona	Orina	1 mL	13	-	0.1 mL C_7H_8	GC-MS	0.5-4	-	79.3-103.4	195
	Sangre									
Cocaína y metabolitos, anfetaminas y análogos, LSD, ketamina, opioides, BZD, Hipnóticos *Z*	Sangre	0.5 mL	9	0.25 mL MeOH	0.1 mL $CHCl_3$	LC-MS/MS	0.05-2	0.2-10	6-142	196
Drogas de abuso	Plasma	0.5 mL	10.6	3.2 mL ACN	0.22 mL $CHCl_3$	HPLC-DAD	13.9-28.5	46.2-94.9	84.2-101.9	197
7 BZD	orina	0.5 mL	9	1.6 mL CH_3COCH_3	0.16 mL $CHCl_3$	UHPLC-DAD	-	1.8-7.4	81-124	198
	Aguas residuales de hospital							0.05-0.42		

Tabla 13. Aplicaciones de la DLLME en el campo forense (*continuación*).

Compuestos	Matriz	Volumen de muestra	pH de la muestra	Disolvente dispersante	Disolvente extractante	Técnica de determinación	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Recuperación (%)	Referencia
7 BZD	Plasma	0.5 mL	9	2 mL MeOH	0.25 mL $CHCl_3$	UHPL-DAD	2.8-10.6	4.0-18.8	71-102	199
MDMA, LSD, PCP	Orina	4 mL	Alcalino	1.508 mL ACN	0.606 CH_2Br_2	FASI-CZE	1-4.5	3.3-15.1	80.3-91.4	200
Cannabinoides	Orina	10 mL	2	1 0.5 mM TTAB	0.085 mL C_7H_8	HPLC-UV	0.1-0.5	-	47.5-73	201

3.1.3. *FABRIC PHASE SORPTIVE EXTRACTION* (FPSE)

La técnica de extracción utilizando sustratos con fases funcionalizadas, conocida como *Fabric Phase Sorptive Extraction* (FPSE), es una técnica novedosa desarrollada en 2014 por Kabir y Furton, en el que la extracción se lleva a cabo en una fase de tela o tejido funcionalizada [202]. FPSE combina el mecanismo de extracción exhaustiva de la SPE y el mecanismo de extracción basada en el equilibrio de la microextracción en fase sólida (SPME) en una sola y simple técnica, sin la necesidad de la etapa de pretratamiento de la muestra, como la precipitación de proteínas. Una sección de tela o tejido (celulosa, poliéster, o fibra de vidrio) es utilizada como sustrato con un recubrimiento sorbente *sol-gel* sobre este sustrato [203]. Las etapas que engloban la creación de la membrana FPSE incluyen:

- La selección y pretratamiento de la membrana de extracción, la cual debe tener abundantes grupos hidroxilo disponibles en su superficie, y ser lo suficiente permeable para que la disolución acuosa y el disolvente orgánico puedan penetrar fácilmente a través de la membrana FPSE, durante los procesos de extracción y elución. Comercialmente, los más utilizados son la celulosa, el poliéster y la fibra de vidrio.
- El diseño y preparación de la disolución *sol* para el recubrimiento sorbente sobre el sustrato, dependiendo de la naturaleza del analito y la muestra.
- El proceso del recubrimiento con sorbente *sol-gel* usando la tecnología de recubrimiento por inmersión, utilizando normalmente metiltrimetoxisilano (MTMS) como precursor *sol-gel* y una disoluciónde ácido trifluoroacético (TFA) como catalizador.
- Envejecimiento y acondicionamiento de la membrana de extracción revestida con sorbente *sol-gel* para asegurar la completa reacción *sol-gel* y posterior limpieza de dicha membrana para eliminar posibles restos del precursor, polímero e intermediarios de reacción.

El sorbente está unido covalentemente a la superficie del sustrato, ofreciendo estabilidad térmica, física y química. Las ventajas que ofrece esta técnica son: simplicidad, bajo coste, consumo mínimo de disolventes y minimización de las etapas de preparación de muestra [203, 204]. La fase FPSE pueden ser introducida directamente dentro de la muestra, previamente lavada sumergiéndola en una mezcla de disolventes orgánicos y posteriormente lavada con agua ultrapura para eliminar posibles restos de disolvente. Después de un tiempo de extracción, en el que la transferencia de analitos desde la disolución a la fase extractante se ve favorecida por agitación (magnética, sonicación, vórtex), los analitos son eluidos en un pequeño volumen de disolvente orgánico durante 4-10 min. El eluyente es centrifugado o filtrado para eliminar posibles partículas antes de la inyección en el sistema cromatográfico (**Figura 23**). Finalmente, la fase FPSE puede volver a usarse, después de una etapa de limpieza con una mezcla de disolventes orgánicos [204]. Algunos factores que pueden afectar al procedimiento de la FPSE son el volumen de muestra, el tiempo de extracción, así como el de elución el tipo y su volumen, la fuerza iónica o el tipo de agitación [205].

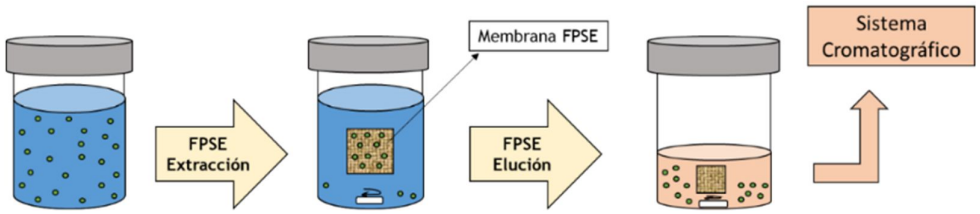


Figura 23. Esquema de la FPSE.

3.1.3.1. APLICACIONES DE FPSE

Esta novedosa técnica de extracción ha sido aplicada, desde su creación en 2014, a numerosos analitos de interés en distintos tipos de muestras. La mayoría de los trabajos publicados fueron aplicados a la determinación de diversas drogas y compuestos farmacéuticos usando cromatografía líquida acoplada a diversos detectores, como ultravioleta o espectrometría de masas [204].

Jiménez-Holgado *et al*. [206] desarrollaron un método de FPSE-HPLC-DAD para la extracción y análisis simultáneo de cinco antidepresivos en muestras acuosas medioambientales. Se evaluaron tres tipos de sustratos (filtro de celulosa, filtro de vidrio de microfibra y discos de ácido poliláctico) junto con dos tipos de recubrimiento FPSE de carácter polar (PEG 300 y PEG-PPG-PEG). Los mejores resultados se obtuvieron con un recubrimiento de PEG 300 sobre un filtro de vidrio de microfibra. Otros parámetros optimizados por los autores fueron: volumen de muestra (1 mL) ajustada a un pH 12, un tiempo de extracción de 30 min a 300 rpm. Los analitos fueron extraídos con 1 mL de MeOH durante 10 min a 300 rpm. Ruan *et al*. [207] utilizaron la FPSE para el análisis de tres anfetaminas en aguas residuales. Debido al caráter polar de las anfetaminas estudiadas, se seleccionaron dos tipos de sorbentes FPSE, uno polar (*sol-gel* polietilenglicol, PEG) y otro de polaridad intermedia (*sol-gel* politetrahidrofurano, PTHF) inmovilizados en un soporte de celulosa. Los resultados mostraron altas recuperaciones con la fase de polaridad intermedia. Después de la optimización de las condiciones, la fase se puso en contacto con 10 mL de muestra (pH 11) durante 60 min. Posteriormente, los compuestos fueron desorbidos en un 1 mL de acetonitrilo/metanol (3:1) durante 8 min e inyectados en el sistema UHPLC-MS/MS. Tartaglia *et al*. [208] desarrollaron un rápido método *offline* de FPSE-HPLC-DAD para la determinación y purificación simultánea de seis antidepresivos en muestras de saliva. Se evaluaron cinco tipos de sorbentes (uno polar y cuatro de polaridad intermedia) en soporte de celulosa, debido al amplio rango de polaridades que presentan estos analitos. Finalmente, los autores obtuvieron los mejores resultados utilizando una fase intermedia, como es la *sol-gel* PTHF, en discos de 1 cm de diámetro en contacto con 1 mL de muestra durante 10 min bajo agitación magnética. La desorción óptima de los analitos se consiguió con 150 µL de metanol durante 5 min. Alampanos *et al*. [209] usaron la técnica de FPSE para la determinación de cuatro antibióticos del grupo de las penicilinas, en suero sanguíneo mediante HPLC-DAD. Estos compuestos poseen una polaridad intermedia-alta. Por ello, fueron evaluados catorce tipos de recubrimientos de distinta polaridad inmovilizados en distintos sustratos (celulosa y poliéster), consiguiendo los mejores resultados con la fase *sol-gel* PTHF inmovilizada en celulosa. La extracción de los antibióticos se consiguió después de 25 min de contacto de la muestra con la fase y una posterior etapa de desorción con 500 µL de acetonitrilo/acetato amónico (90:10) durante 10 min. Zilfidou *et al*. [210] consiguieron la extracción simultánea de cinco antidepresivos de muestras de suero sanguíneo con una

membrana formada por *sol-gel* policaprolactona-dimetilsiloxano-policaprolactona inmovilizada en celulosa. La mayor eficiencia de extracción se consiguió después de 15 minutos de contacto con la muestra y la posterior elución con 500 µL de metanol/acetonitrilo (1:1) durante 5 minutos. Liupi *et al*. [211] aislaron cinco antidepresivos en muestras de orina utilizando un recubrimiento de *sol-gel* grafeno sobre un sustrato de celulosa y un tiempo de extracción de 20 minutos. La recuperación de los analitos se llevó a cabo con 500 µL de acetonitrilo/metanol (50:50). En la **Tabla 14** se recoge más detalladamente los trabajos publicados de la aplicación de la FPSE para la extracción y determinación de diferentes compuestos de interés toxicológico en diversas muestras.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 14. Revisión bibliográfica de la técnica FPSE aplicada al campo toxicológico-forense.

Compuestos	Matriz	Volumen de muestra	Fase	Disolvente extractante	Técnica de determinación	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Recuperación (%)	Referencia
ATD	Agua	1 mL	PEG 300	1 mL MeOH	HPLC-DAD	0.64-3.22	1.9-10.71	61.94-98.10	206
Anfetaminas	Agua	10 mL	PTHF	1 mL ACN: MeOH (3:7)	LC-MS/MS	0.01-0.029	0.031-0.097	73.4-95.4	207
AINEs	Saliva	1 mL	PTHF	0.15 mL MeOH	HPLC-DAD	30	80	-	208
Antibióticos	Suero	0.05 mL	PTHF	0.5 mL ACN:CH_3COONH_4 0.5 M (9:1)	HPLC-DAD	150	500	88.1-110.3	209
ATD	Suero	0.05 mL	PCL-PDMS-PCL	0.5 mL ACN: MeOH	HPLC-DAD	150	500	9.4-88.1	210
ATD	Orina	0.5 mL	Grafeno	0.5 mL ACN: MeOH	HPLC-DAD	150	500	85.6-120	211
Fármacos anticancer	Sangre	1 mL	PEG-PPG-PEG	0.15 mL MeOH	HPLC-DAD	20-100	50-250	-	212
	Plasma	0.5 mL							
	Orina	1 mL							
Ciprofloxacino, sulfasalacina, cortisona	Sangre	0.2 mL	Carbowax 20M	0.15 mL MeOH	HPLC-DAD	20-100	50-250	-	213
	Plasma	0.5 mL							
	Orina	1 mL							
Fármacos antimicrobianos	Plasma	0.5 mL	Carbowax 20M	0.15 mL MeOH	HPLC-DAD	30	100	-	214
	Orina	1 mL							

Tabla 14. Revisión bibliográfica de la técnica FPSE aplicada al campo toxicológico-forense (*continuación*).

Compuestos	Matriz	Volumen de muestra	Fase	Disolvente extractante	Técnica de determinación	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Recuperación (%)	Referencia
BZD	Suero	0.05 mL	PEG	0.5 mL ACN: MeOH	HPLC-DAD	10	30	92.5-107	215
AINEs	Agua	30 mL	PEG	1 mL $CH_3COOCH_2CH_3$	GC-MS	0.8-5	3-15	82-116	216

3.1.4. DESARROLLO DE NUEVAS FASES DE EXTRACCIÓN FUNCIONALIZADAS

En los últimos años, se han introducido los principios de la Química Verde en los procesos analíticos. Esta tendencia conlleva a investigar alternativas respectuosas con el medioambiente, como es el desarrollo de nuevos materiales de extracción, capaces de proporcionar extracciones más eficientes. Una de las alternativas es el uso de los polímeros naturales, que constituyen una fuente de materiales renovable y biodegradable. Estos biopolímeros tienen un amplio potencial de aplicaciones en los campos biomédicos debido a su diversidad en cuanto a composición y propiedades [217].

Uno de los biopolímeros naturales más abundantes en la Tierra disponible para la preparación de materiales es la celulosa, debido a las propiedades que ofrece (biodegradable, no tóxico, renovable y barato). Este biopolímero es sintetizado por una gran diversidad de organismos vivos como bacterias, algas o plantas [218, 219]. Químicamente, es un homopolisacárido lineal formado por unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces β-1,4-glicosídicos. La estructura tiene tres grupos hidroxilo reactivos en los átomos C_2, C_3 y C_6, que son accesibles para su conversión en otras especies, resultando útil para preparar materiales más hidrófilos y polifuncionales (**Figura 24**) [220].

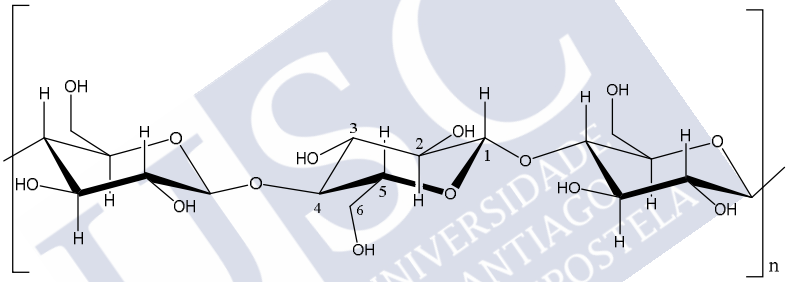


Figura 24. Estructura de la celulosa.

Así pues, la celulosa puede usarse como soporte en el cual injertar otros compuestos mediante distintas reacciones de funcionalización. Las rutas sintéticas, conocidas en la actualidad para la unión covalente entre las cadenas laterales de polímero sobre la celulosa, incluyen la polimerización por radical, iónica y apertura de anillo, poliadición y policondensación. Una reacción con gran interés es la polimerización radical de compuestos vinílicos iniciada por un sistema redox, utilizando los monómeros como el ácido acrílico o metacrílico para introducir grupos iónicos [220]. También se ha descrito la aplicación de la química de Fenton a los materiales lignocelulósicos [221]. En este tipo de reacción, las especies de oxígeno activo (como los radicales OH·) se forman mediante la reducción de un electrón de peróxido de hidrógeno, catalizada por iones de metales de transición como los iones ferrosos (Fe^{2+}) en la siguiente reacción:

$$Fe^{2+} + HOOH \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH\cdot$$

Los iónes Fe^{3+} se pueden regenerar en Fe^{2+} por reacción con peróxido de hidrógeno bajo la formación de radicales HOO·, o pueden reaccionar como catalizador en el sistema de oxidación. Los grupos hidroxilos en las posiciones C_2, C_3 y C_6 en la celulosa son susceptibles a la oxidación directa y el grupo aldehído o cetona resultante pueden llevar a la escisión del enlace glicosídico (**Figura 25**) [221, 222].

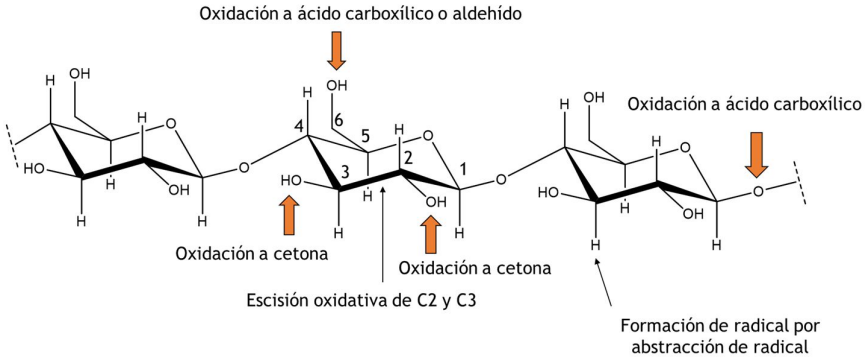


Figura 25. Posiciones de la cadena celulósica que pueden sufrir oxidación (adaptado de [221]. Con permiso de *Springer Nature*).

Mediante esta reacción de Fenton, se puede funcionalizar la celulosa para usarla como un sistema de adsorción/liberación de sustancias mediante el injerto de compuestos como las ciclodextrinas, en la superficie de la celulosa [219, 222, 223].

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos de origen natural muy versátiles debido a su habilidad de formar complejos de inclusión con una amplia variedad de moléculas [224]. Se descubrieron a finales del siglo XIX por el científico francés Villiers. A principios del siglo XX, el científico Schardinger consiguió aislar la bacteria (*Bacillus macerans*) responsable de su síntesis [224-226]. Actualmente, las CDs son fabricadas industrialmente a escala mundial, a partir del almidón. El almidón es expuesto al enzima ciclomaltodextrina glucanotransferasa, producida por las bacterias *B. macerans*, produciendo una mezcla de anillos de 6, 7 y 8 miembros de α-D-glucopiranosa unidos a través de enlaces covalentes α-(1,4)-glicosídicos [226]. Según el número de unidades de glucopiranosa, las CDs naturales pueden denominarse α-ciclodextrinas (si poseen 6 unidades de glucopiranosa), β-ciclodextrina (si tiene 7 unidades de glucopiranosa) o γ-ciclodextrina (si está formada por 8 unidades de ciclodextrina) (**Figura 26**) [219, 224-226]. La β-CD es la ciclodextrina más estudiada y, por lo tanto, con el mayor potencial de aplicación debido a su sencilla síntesis, disponibilidad y precio, y su capacidad de formar complejos con una amplia gama de sustancias [219, 225]. Debido a su versatilidad y propiedades únicas, como su baja toxicidad, las CDs son ampliamente usadas en distintos campos como el farmacéutico, el sector alimentario o el cosmético, así como en nuevos campos de aplicación como la medicina regenerativa [219, 224].

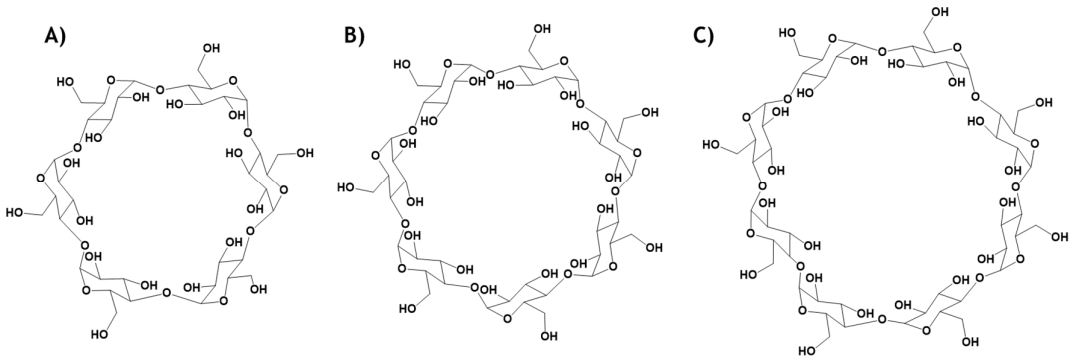


Figura 26. Estructuras químicas de las ciclodextrinas naturales: (A) α-ciclodextrina, (B) ß-ciclodextrina y (C) γ-ciclodextrina.

Estructuralmente, las CDs son moléculas huecas, donde la disposición de los monómeros le proporciona una estructura troncocónica (forma de cono truncado) con diámetros máximos comprendidos entre 4.7 y 8.3 Å, y una altura de 7.9 Å. Están compuestas por varias unidades de glucosa unidas covalentemente por átomos de oxígeno y mantienen la forma mediante enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo secundarios en unidades adyacentes en el borde más ancho de la cavidad, lo que le confiere un carácter hidrofílico a la superficie exterior. Su cavidad está revestida por átomos de hidrógeno (H_3 y H_5) y puentes de oxígeno glicosídico que se encuentran en un plano (**Figura 27**) [219, 227]. Esto hace que la cavidad sea relativamente hidrófoba [226]. En la β-CD, su cavidad central que está compuesta por 7 unidades de glucosa es hidrófoba y su parte externa es hidrofílica debido a la presencia de 21 grupos hidroxilo. El núcleo de la estructura puede atrapar o encapsular otras sustancias [228].

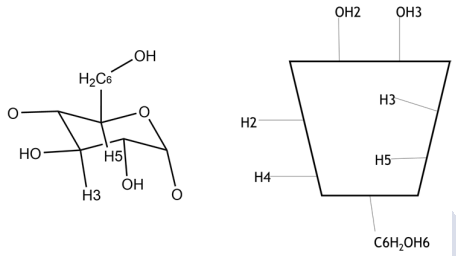


Figura 27. Esquema de la orientación promedio de los átomos y grupos OH más importantes en el anillo de glucopiranósido y en la CD (adaptado de [227]. (Con permiso de *Wiley&Sons*).

Las moléculas pueden ser capaces de penetrar total o parcialmente en la cavidad interior de las CDs formando complejos de inclusión. La complejación está impulsada por la constante de afinidad e intervienen interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y de Van de Waals, así como puentes de hidrógeno y cambios conformacionales. También pueden influir otros factores como la concentración relativa de cada componente y la polaridad del medio externo, entre otros [225, 229]. En medios acuosos, las moléculas huésped unidas en un complejo de CD están en equilibrio dinámico con moléculas no unidas, formándose y deshaciéndose constantemente dicho complejo. El tipo más común de complejo huésped-CD formado es en el que una molécula de huésped (D) forma un complejo con una molécula de CD en una proporción 1:1 [225, 226]:

$$D + CD \leftrightarrow D/CD \ (K_{1:1})$$

Las CDs se han empleado en sectores, como el sector químico o farmacéutico, desde hace tiempo. En la ciencia de la sepación, las CDs se han utilizado como ligandos de fase estacionaria o aditivos en la fase móvil, especialmente en las separaciones quirales cromatográficas o electroforéticas. Además, se han estudiado varios materiales basados en CDs para preparar sorbentes para SPE [230]. En las últimas décadas, las CDs han atraído la atención como agentes complejantes para la eliminación de contaminantes presentes en el medio ambiental (suelos, aire, aguas residuales, y sedimentos). Los materiales a base de CDs para el tratamiento de agua incluyen polímeros retículados y nanoespojas, membranas, nanofibras y sistemas funcionalizados como polímeros, sílice y resinas [228, 231]. Por lo tanto, la celulosa es una matriz apropiada para preparar polímeros que contienen CDs dirigidos a numerosas aplicaciones innovadoras como en la fabricación de papel, el sector textil, tecnología farmacéutica y sistemas de administración de fármacos y como sistemas de bioeliminación de contaminantes [223, 231].

3.2. TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN

La determinación de los distintos compuestos de interés toxicológico en distintas matrices biológicas es de gran importancia, sobre todo en el campo clínico y toxicológico-forense. La mayoría de los métodos desarrollados para el análisis de las drogas ilícitas, se basan principalmente en procedimientos cromatográficos, como cromatografía líquida (LC) y cromatografía de gases (GC) acopladas a distintos detectores, como ultravioleta (UV), de fluorescencia (FL), y espectrometría de masas simple (MS) o en tándem (MS/MS).

3.2.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

La mayoría de las moléculas orgánicas absorben luz en la región ultravioleta-visible (UV-VIS). Por ello, la combinación de LC con detectores UV son muy habituales en los laboratorios analíticos, mostrando muy buena sensibilidad. En las últimas décadas, es frecuente el uso de sistemas de fotodiodos en lo que se conoce como detector de red de diodos (*Diode Array Detector*, DAD). A diferencia de los detectores de UV y VIS que visualizan el resultado obtenido en dos dimensiones (intensidad de luz x tiempo), el detector DAD agrega una tercera dimensión, la longitud de onda, (intensidad x tiempo x longitud de onda). Por consiguiente, este tipo de detector permite realizar un barrido espectral (190-800 nm) y monitorizar los compuestos a más de una longitud de onda [232-234].

Este tipo de sistema de separación (LC-DAD) ha sido ampliamente aplicado en el campo de la toxicología analítica, para desarrollar métodos analíticos para la determinación de distintos compuestos: drogas de abuso (catinonas, opioides, cocaína y cannabinoides) [168, 186, 188, 197, 201], antidepresivos [191, 210, 211], benzodiacepinas [199, 215], AINEs [208], fármacos anticáncer [212], fármacos antimicrobianos [213] y antibióticos [209] en distintas matrices biológicas como plasma, orina, saliva o aguas efluentes hospitalarias.

La combinación de cromatografía líquida y la espectrometría de masas (LC-MS) se ha convertido en una técnica habitual para la identificación y cuantificación de drogas durante el análisis toxicológico [232, 233]. La espectrometría de masas es una técnica analítica que se basa en la ionización de las moléculas de los analitos de interés, y el subsecuente análisis de estos iones y sus fragmentos en base a su relación masa/carga (*m/z*). En general, un espectrómetro de masas está compuesto por tres principales componentes: una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector [235]. Las técnicas de ionización más comunes usadas en LC-MS son las de ionización a presión atmosférica (API), la ionización con electrospray (ESI), la ionización química a presión atmosférica (APCI) o la fotoionización a presión atmosférica (APPI). La fuente ESI es la fuente de iones más utilizada para moléculas biológicas de polaridad moderada. La muestra líquida es nebulizada por la aguja de un capilar aplicando un alto potencial (3-5 kV) y formando una fina pulverización de gotitas cargadas. Las gotas formadas se vuelven más pequeñas debido a las colisiones con el gas de secado y, finalmente, se liberan iones muy cargados [236-238]. Los iones generados en la fuente entran en el analizador de masas. Los analizadores de masas que se usan típicamente en toxicología incluyen cuadrupolos (Q), trampa de iones (IT) o tiempo de vuelo (TOF). El analizador cuadrupolo consiste en un set de cuatro barras cilíndricas paralelas conectadas eléctricamente en pares opuestos, a las que se le aplica una combinación de voltajes de radiofrecuencia (RF) y campos de corriente continua. Variando los voltajes con el tiempo, es posible el escaneo a través de un rango de valores *m/z*, resultando en un

espectro de masas. En aplicaciones clínicas, el triple cuadrupolo (QQQ-MS) es el analizador con capacidades más versátiles, en el cual, tres analizadores cuadrupolos están organizados en tándem. El primer cuadrupolo (Q1) selecciona los iones analito de interés (conocidos como iones precursores) que entrarán en el segundo cuadrupolo (Q2), que actúa como una celda de colisión. En dicha celda se lleva a cabo la colisión de los iones precursores, mediante la aplicación de voltajes RF y la introducción de un gas inerte (helio, argón o nitrógeno), que se fragmentan en iones moleculares de menor peso (iones producto). Los iones producto resultantes entran en el tercer cuadrupolo (Q3), el cual puede guiar finalmente los iones seleccionados al detector. Este proceso de monitorización, conocido como *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), es comúnmente utilizado en LC-MS/MS [235, 237, 238].

En los últimos años, la combinación de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas o espectrometría de masas en tándem ha acaparado gran interés, debido a la alta especificidad y sensibilidad comparado con otros detectores cromatográficos. Por ello, el acoplamiento LC-MS(MS) ha sido utilizado en un amplio rango de aplicaciones, incluyendo la monitorización terapéutica de fármacos (TDM), la toxicología forense y clínica, o en el campo proteómico [235, 238-240]. En el campo de la toxicología analítica, se aplicó la LC-MS/MS para la determinación de opioides sintéticos en muestras de orina [163], drogas de abuso (convencionales y/o NSP) en muestras de fluido oral [166, 169, 172, 183], pelo [184] y sangre [196], o anfetaminas en muestras de agua [207].

3.2.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía de gases (GC), se basa en dos componentes principales: una fase estacionaria y una fase móvil. La GC requiere de compuestos que sean térmicamente estables y volátiles, por lo que es frecuente una etapa de derivatización, previa a su introducción en el sistema GC, de los analitos que no reúnan esas propiedades para modificar su estructura y hacerlas adecuadas para su análisis [236, 241, 242].

La combinación de la cromatografía de gases con la espectrometría de masas (GC-MS) es utilizada para la identificación y cuantificación de un amplio rango de compuestos, debido a su sensibilidad, alta resolución y selectividad. Además, la GC-MS está considerada como la técnica estándar para la identificación positiva de la presencia de un compuesto en los campos de análisis forense y toxicológico, o medicina legal [232, 236, 243]. Las fuentes de ionización utilizadas en GC suelen ser de ionización electrónica o ionización química [236]. La ionización electrónica o impacto electrónico (EI) es uno de los métodos de ionización más utilizados en GC-MS, convirtiendo moléculas neutras en fase gas a moléculas ionizadas con carga positiva. A la ionización le sigue la división del ión molecular altamente energizado en fragmentos de iones más pequeños [241]. El analizador más frecuente en GC-MS es el cuadrupolo simple, el cual puede operar de dos maneras: realizando un escaneo total de iones, en el cual registra todos los iones en un rango específico *m/z* (*full-scan mode,* SCAN); o monitorizando un valor específico de *m/z*, correspondiente a un ion determinado (*selected ion monitoring*, SIM). La ventaja de trabajar en modo SIM es la mayor sensibilidad y selectividad alcanzada que en SCAN, ya que se pueden preseleccionar uno o varios iones, enfocando el barrido del analizador exclusivamente a esos mismos iones [236, 241, 242].

Como se ha mencionado anteriormente, la combinación GC-MS(MS) es muy utilizada en el campo toxicológico forense, para determinar un amplio rango de analitos en diferentes muestras biológicas. Entre las aplicaciones, se halla la determinación de

varias clases de drogas de abuso convencional, como cocaína [162, 167], opioides [165, 193, 195], cannabinoides [181], ketamina [170, 185, 190] o anfetaminas [185, 190, 192] en matrices biológicas como sangre, plasma u orina. También se ha aplicado la GC-MS para la determinación de NSP, entre las que se encuentran catinonas [187] o DBZD [189] en muestras de sangre y orina, o AINEs en aguas residulaes [216].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] World Health Organization (WHO), 2020. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression (acceso mayo 2021).

[2] To S.E., Zepf R.A., Woods A.G., The symptoms, Neurobiology, and Current Pharmacological Treatment of Depression, *J. Neurosci. Nurs*. 2005, *37*, 102-107.

[3] Schatzberg A.F., Pharmacological principles of antidepressant efficacy, *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp*. 2002, *17*, 17-22.

[4] del Río J., Fármacos antidepresivos y antimaníacos, en: Flórez Beledo J., Armijo Simón J.A., Mediavilla Martínez Á. (eds), Farmacología humana, Elsevier, 2015.

[5] Pazos A., Mediadores celulares I. Histamina y 5-hidroxitriptamina. Farmacología de la migraña, en: Flórez Beledo J., Armijo Simón J.A., Mediavilla Martínez Á. (eds), Farmacología humana, Elsevier, 2015.

[6] Zeller E.A., Barsky J., Fouts J.R., Kirchheimer W.F., Van Orden L.S., Influence of isonicotinic acid hydrazide (INH) and 1-isonicotinic-2-isopropyl-hydrazide (IIH) on bacterial and mammalian enzymes, *Experientia* 1952, *8*, 349-350.

[7] López-Muñoz F., Alamo C., Cuenca E., La "Década de Oro" de la Psicofarmacología (1950-1960): Transcendencia Histórica de la Introducción Clínica de los Psicofármacos Clásicos, Congreso Virtual de Psiquiatría 1 de febrero- 15 de marzo 2000. https://psiquiatria.com/trabajos/539.pdf (acceso mayo 2021).

[8] Wilson E., Lader M., A review of the management of antidepressant discontinuation symptoms, *Ther. Adv. Psychopharmacol*. 2015, *5*, 357-368.

[9] Manzanares Iribas J., Pita Calandre E., Fármacos antidepresivos, *Rev. Asoc. Esp. Neuropsiq*. 1992, *Vol. XII, (Suplemento I)*, 11-20.

[10] Anttila S.A.K., Leinonen E.V.J., A Review of the Pharmacological and Clinical Profile of Mirtazapine, *CNS Drug Rev*. 2001, *7*, 249-264.

[11] Timmer C.J., Ad Sitsen J.M., Delbressine L.P., Clinical Pharmacokinetics of Mirtazapine, *Clin. Phamacokinet*. 2000, *38*, 461-474.

[12] Spina E., Santoro V., DÁrrigo C., Clinically Relevant Pharmacokinetics Drug Interactions with Second-Generation Antidepressants: An Update, *Clin. Ther*. 2008, *30*, 1206-1227.

[13] Ereshefsky L., Dugan D., Review of the pharmacokinetics, pharmacogenetics, and drug interaction potential of antidepressants: focus on venlafaxine, *Depress. Anxiety* 2000, *12*, 30-44.

[14] Søgaard B., Mengel H., Rao N., Larsen., The Pharmacokinetics of Escitalopram after Oral and Intravenous Administration of Single and Multiple Doses to Healthy Subjects, *J. Clin. Pharmacol*. 2005, *45*, 1400-1406.

[15] Hiemke C., Härtter S., Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors, *Pharmacol. Ther*. 2000, *85*, 11-28.

[16] Renoir T., Selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant treatment discontinuation syndrome: a review of the clinical evidence and the possible mechanism involved, *Front. Pharmacol*. 2013, *4*, 1-10.

[17] Richelson E., Pharmacology of Antidepressants, *Mayo Clin. Proc*. 2001, *76*, 511-527.

[18] Compton R., Spiller H.A., Bosse G.M., Fatal Fluoxetine Ingestion with Postmortem Blood Concentrations, *Clin. Toxicol*. 2005, *43*, 277-279.

[19] Cheeta S., Schifano F., Oyefeso A., Webb L., Ghodse H., Antidepressant-related deaths and antidepressant prescriptions in England and Wales, 1998-200, *Br. J. Psychiatry* 2004, *184*, 41-47.

[20] Burillo Putze G., Alonso Lasheras E., Intoxicación por inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, *Jano* 2008, *1680*, 28-30.

[21] Kiajima R., Miyamoto S., Tenjin T., Ojima K., Ogino S., Miyake N., Fujiwara K., Funamoto Y., Arai J., Tsukahara S., Ito Y., Tadakoro M., Anai K., Kaneda Y., Yamaguchi N., Effects of tapering of long-term benzodiazepines on cognitive function in patients with schizophrenia receiving a second-generation antipsychotic, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2012, *36*, 300-306.

[22] Persona K., Madej K., Knihnicki P., Piekoszewski W., Analytical methodologies for the determination of benzodiazepines in biological samples, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2015, *113*, 239-264.

[23] Sternbach L.H., The benzodiazepine story, J. *Med. Chem.* 1979, *22*, 1–7.

[24] Salamone S.J., Forensic Science: Benzodiazepines and GHB. Detection and Pharmacology, 1st ed., Humana Press, Totowa (NJ), 2001.

[25] López-Muñoz F., Álamo C., Historia de la psicofarmacología (Volumen 2), Médica Panamericana, 2007.

[26] Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (OEDT). https://europa.eu/european-union/about-eu/agencies/emcdda_es (acceso mayo 2021).

[27] Schifano F., Orsolini L., Duccio Papanti G., Corkery J.M., Novel psychoactive substances of interest for psychiatry, *World Psychiatry* 2015, *14*, 15-26.

[28] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, European report 2016: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2016. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2637/TDAT16001ENN.pdf (acceso mayo 2021).

[29] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, European report 2017: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2017. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/4541/TDAT17001ENN.pdf (acceso mayo 2021).

[30] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, European report 2018: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2018.

https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/8585/20181816_TDAT18001ENN_PDF.pdf (acceso mayo 2021).

[31] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, European report 2019: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2019. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11364/20191724_TDAT19001ENN_PDF.pdf (acceso mayo 2021).

[32] Moosmann B., King L.A., Auwärter V., Designer benzodiazepines: a new challenge, *World Psychiatry* 2015, *14*, 248.

[33] Vikingsson S., Wohlfarth A., Andersson M., Gréen H., Roman M., Josefsson M., Kugelberg F.C., Kronstrand R., Identify Metabolites of Meclonazepam by High-Resolution Mass Spectrometry Using Human Liver Microsomes, Hepatocytes, a Mouse Model, and Authentic Urine Samples, *APSS J*. 2017, *19*, 736-742.

[34] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction and Europol, EMCDDA-Europol 2007 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/503/2007_Implementation_report_281403.pdf (acceso mayo 2021).

[35] Pettersson Bergstrand M., Helander A., Beck O., Development and application of a multi-component LC-MS/MS method for determination of designer benzodiazepines in urine, *J. Chromatogr. B* 2016, *1035*, 104-110.

[36] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction and Europol, EMCDDA-Europol 2011 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/689/EMCDDA-Europol_Annual_Report_2011_2012_final_335568.pdf (acceso mayo 2021).

[37] Corkery J.M., Schifano F., Ghodse A.H., Phenazepam abuse in the UK: an emerging problem causing serious adverse health problems, including death, *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp*. 2012, *27*, 254-261.

[38] Meng L., Zhu B., Zheng K., Fu S., Ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of 4 designer benzodiazepines in urine samples by gas chromatogrpahy-triple quadrupole mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 2017, *1053*, 9-15.

[39] Moosmann B., Auwärter V., Designer Benzodiazepines: Another Class of New Psychoactive Substances, en: Maurer H., Brandt S. (eds), New Psychoactive Substances. Handbook of Experimental Pharmacology, Springer, 2018.

[40] Greenblatt H.K., Greenblatt D.J., Designer Benzodiazepines: A review of Published Data and Public Health Significance, *Clin. Pharmacol. Drug Dev*. 2019, *8*, 266-269.

[41] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction and Europol, EMCDDA-Europol 2012 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/734/EMCDDA-Europol_2012_Annual_Report_final_439477.pdf (acceso mayo 2021).

[42] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction and Europol, EMCDDA-Europol 2013 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/814/TDAN14001ENN_475519.pdf (acceso mayo 2021).

[43] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction and Europol, EMCDDA-Europol 2014 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA. https://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_240380_EN_TDAN15001ENN.pdf (acceso mayo 2021).

[44] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction and Europol, EMCDDA-Europol 2015 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2880/TDAS16001ENN.pdf (acceso mayo 2021).

[45] Gunja N., The Clinical and Forensic Toxicology of Z-drugs, *J. Med. Toxicol*. 2013, *9*, 155-162.

[46] Monti J.M., Warren Spence D., Buttoo K., Pandi-Perumal S.R., Zolpidem´s use for insomnia, *Asian J. Psychiatr*. 2017, *25*, 79-90.

[47] von Horn A.U., Terajewicz LaRose A., Sedatives, en: Frankenburg F.R., Addictions: Elementss, History, Treatments, and Research, 1st, Praeger, 2019.

[48] Riss J., Cloyd., Gates J., Collins S., Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics, *Acta Neurol. Scand*. 2008, *118*, 69-86.

[49] Pym L.J., Cook S.M., Rosahl T., McKernan R.M., Atack J.R., Selective labelling of diazepam-insensitive $GABA_A$ receptors *in vivo* using [^{3}H]Ro 15-4513, *Br. J. Pharmacol*. 2005, *146*, 817-825.

[50] Hevers W., Lüddens H., The Diversity of $GABA_A$ Receptors, *Mol. Neurobiol*. 1998, *18*, 35-86.

[51] Manchester K.R., Lomas E.C., Waters L., Dempsey F.C., The emergence of new psychoactive substances (NPS) benzodiazepines: A review, *Drug Test. Anal.* 2018, *10*, 37-53.

[52] Griffin III C.E., Kaye A.M., Rivera Bueno F., Kaye A.D., Benzodiazepine Pharmacology and Central Nervous System-Mediated Effects, *Ochsner J*. 2013, *13*, 214-223.

[53] Luethi D., Liechti M.E., Designer drugs: mechanism of action and adverse effects, *Arch. Toxicol*. 2020, *94*, 1085-1133.

[54] Drover D.R., Comparative Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Short-acting Hypnosedatives Zaleplon, Zolpidem and Zopiclone, *Clin. Pharmacokinet*. 2004, *43*, 227-238.

[55] Atkin T., Comai S., Gobbi G., Drugs for Insomnia beyond Benzodiazpenines: Pharmacology, Clinical Applications, and Discovery, *Pharmacol. Rev*. 2018, *70*, 197-245.

[56] Drummer O.H., Methods for the measurement of benzodiazepines in biological samples, *J. Chromatogr. B* 1998, *713*, 201-225.

[57] Olkkola K.T., Ahonen J., Midazolam and Other Benzodiazepines, En: Schüttler J., Schwilden H. (eds.), Modern Anesthetics. Handbook of Experimental Pharmacology, Springer, 2008.

[58] Mohsin N.A., Qadir M.I., Recent Structure Activity Relationship Studies of 1,4-Benzodiazepines, *Open J. Chem*. 2015, *1*, 8-12.

[59] Pavlic M., Libiseller K., Grubwieser P., Schubert H., Rabl W., Medicolegal aspects of tetrazepam metabolism, *Int. J. Legal Med*. 2007, *121*, 169-174.

[60] Baumann A., Lohmann W., Schubert B., Oberacher H., Karst U., *J. Chromatogr. A* 2009, *1216*, 3192-3198.

[61] Schubert B., Pavlic M., Libiseller K., Oberacher H., Unraveling the metabolic transformation of tetrazepam to diazepam with mass spectrometric methods, *Anal. Bioanal. Chem*. 2008, *392*, 1299-1308.

[62] Huppertz L. Bisel P., Westphal F., Franz F., Auwärter V., Moosmann B., Characterization of the four designer benzodiazepines clonazolam, deschloroetizolam, flubromazolam, and meclonazepam, and identification of their in vitro metabolites, *Forensic Toxicol*. 2015, *33*, 388-395.

[63] Wohlfarth A., Vikingsson S., Roman M., Andersson M., Kugelberg F., Green H., Kronstrand R., Looking at flubromazolam metabolism from four different angles: metabolite profiling in human liver chromosomes, human hepatocytes, mice and authentic human urine samples with liquid chromatography high-resolution mass spectrometry, *For. Sci. Int*. 2017, *274*, 55-63.

[64] Cornett E.M., Novitch M.B., Brunk A.J., Davidson K.S., Menard B.L., Urman R.D., Kaye A.D., New benzodiazepines for sedation, *Best Prac. Res. Clin. Anaesthesiol*. 2018, *32*, 149-164.

[65] Katselou M., Papoutsis I., Nikolaou P., Spiliopoulou C., Athanaselis S., Metabolites replace the parent drug in the drug arena. The cases of fonazepam and nifoxipam, *Forensic Toxicol*. 2017, *35*, 1-10.

[66] Skov L., Dollerup Holm, K.M., Stybe Johanse S., Linnet K., Concentrations of Alprazolam, Bromazepam, Chlordiazepoxide, diazepam, and their Metabolites and a Review of the Literature, *J. Anal. Toxicol*. 2016, *40*, 529-536.

[67] Tomková J., Švidrnoch M., Maier V., Ondra P., Analysis of selected designer benzodiazepines by ultra high performance liquid chromatography with high-resolution time-of-flight mass spectrometry and the estimation of their partition coefficients by micellar electrokinetic chromatography, *J. Sep. Sci*. 2017, *40*, 2037-2044.

[68] Brettell T.A., Forensic Science Applications of Gas Chromatography, en: Grob R.L., Barry E.F., Modern Practice of Gas Chromatography, 4nd ed., John Wiley & Sons, 2004.

[69] Escohotado A., Historia general de las drogas: completada por el apéndice Fenomenología de las drogas, 8ª ed., Espasa Calpe, 2008.

[70] Flórez J., Fármacos analgésicos opioides, en: Flórez Beledo J., Armijo Simón J.A., Mediavilla Martínez Á. (eds), Farmacología humana, Elsevier, 2015.

[71] Kerrigan S., Goldberger B.A., Opioids, en: Levine B., Principles of Forensic Toxicology, 4nd ed. Washington, 2013.

[72] Luch A., Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Volume 1: Molecular Toxicology, 1st ed., Birkhäuse Basel, 2009.

[73] Villanueva E., Medicina Legal y Toxicología, 6ª ed., Masson, 2005.

[74] Rook E.J., van Ree J.M., van den Brink W., Hillebrand M.J.X., Huitema A.D.R., Hendriks V.M., Beijnen J.H., Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of High Doses of Pharmaceutically Prepared Heroin, by Intravenous or by Inhalation Route in Opioid-Dependent Patients, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. 2006, *98*, 86-96.

[75] Moody D.E, Fang W.B., Lin S.N., Weyant D.M., Strom S.C., Omiecinski C.J., Effect of Rfampin and Nelfinavir on the Metabolism of Methadone and Buprenorfine in Primary Cultures of Human Hepatocytes, *Drug Metab. Dispos*. 2009, *37*, 2323-2329.

[76] Liu B., Hong J.S., Neuroprotective effect of naloxone in inflammation-mediated dopaminergic neurodegeneration. Dissociation from the involvement of opioid receptors, en: Wang J.Q.(ed), Drugs of Abuse. Methods in Molecular Medicine, Humana Press, 2003.

[77] Camí J., Ayesta F.J., Farmacodependencias, en: Flórez Beledo J., Armijo Simón J.A., Mediavilla Martínez Á. (eds), Farmacología humana, Elsevier, 2015.

[78] Goldstein R.A., DesLauriers C., Burda A.M., Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity_A review, *Dis. Mon*. 2009, *55*, 6-38.

[79] Isenschmid D.S., Cocaine, en: Levine B., Principles of Forensic Toxicology, 4nd ed. Washington, 2013.

[80] Casey Laizure S., Mandrell T., Gades N.M., Parker R.B., Cocaethylene metabolism and interaction with cocaine and ethanol: role of carboxylesterases, *Drug Metab. Dispos*. 2003, *31*, 16-20.

[81] Renner U.D., Oertel R., Kirch W., Use of Scopolamine, *Ther. Drug Monit*. 2005, *27*, 655-665.

[82] Flórez J., González A.M., Fármacos antagonistas muscarínicos, en: Flórez Beledo J., Armijo Simón J.A., Mediavilla Martínez Á. (eds), Farmacología humana, Elsevier, 2015.

[83] Chen H., Marín-Sáez J., Romero-González R., Garrido Frenich A., Simultaneous determination of atropine and scopolamine in buckwheat and related products using modified QuEChERS and liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Food Chem*. 2017, *218*, 173-180.

[84] German C.L., Fleckenstein A.E., Hanson G.R., Bath salts and synthetic cathinones: An emerging designer drug phenomenon, *Life Sci*. 2014, *97*, 2-8.

[85] Drogas Emergentes, Informes de la Comisión Clínica. Ministerio de Sanidad y Política Social, 2008. https://pnsd.sanidad.gob.es/fr/profesionales/publicaciones/catalogo/catalogoPNSD/publicaciones/pdf/InformeDrogasEmergentes.pdf (acceso mayo 2021).

[86] Mercolini L., Protti M., Biosampling strategies for emerging drugs of abuse: towards the future of toxicological and forensic analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2016, *130*, 202-219.

[87] Zawilska J.B., Wojcieszak J., Designer cathinones: An emerging class of novel recreational drugs, *For. Sci. Int*. 2013, *231*, 42-53.

[88] Coppola M., Mondola R., Synthetic cathinones; chemistry, pharmacology and toxicology of a new class of designer drugs of abuse marketed as "bath salts" or "plant food", *Toxicol. Letters* 2012, *211*, 144-149.

[89] Valente M.J., Guedes de Pinho P., Bastos M.L., Carvalho F., Carvalho M., Khat and synthetic cathinones: a review, *Arch. Toxicol*. 2014, *88*, 15-45.

[90] DEA, 21 USC, Section 811, 2016. https://www.deadiversion.usdoj.gov/21cfr/21usc/811.htm (acceso mayo 2021).

[91] Council Framework Decision 2004/757/JHA of 25 October 2004 laying down minimum provisions on the constituent elements of criminal acts and penalties in the field of illicit drug trafficking. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32004F0757&from=EN (acceso mayo 2021).

[92] Directive (EU) 2017/2103 of the European Parliament and of the Council of 15 November 2017 amending Council Framework Decision 2004/757/JHA in order to include new psychoactive substances in the definition of "drug" and repealing Council Decision 2005/387/JHA. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32017L2103&from=es (acceso mayo 2021).

[93] Regulation (EC) No 273/2004 of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004 on drug precursors. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:02004R0273-20210113&from=EN (acceso mayo 2021).

[94] Regulation (EU)2017/2101 of the European Parliament and of the Council of 15 November 2017 amending Regulation (EC) No 1920/2006 as regards information exchange on, and an early warning system and risk assessment procedure for, new psychoactive substances. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32017R2101&from=es (acceso mayo 2021).

[95] World Health Organization (WHO), 2020. https://www.who.int/health-topics/drugs-psychoactive#tab=tab_1 (acceso mayo 2021).

[96] Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito, Los tratados de fiscalización internacional de drogas: convención Única de 1961 sobre Estupefacientes enmendada por el Protocolo de 1972 de Modificación de la Convención Única de 1961 sobre Estupefacientes. Convenio sobre Sustancias Sicotrópicas de 1971. Convención de las Naciones Unidas contra el Tráfico Ilícito de Estupefacientes y Sustancias Sicotrópicas de 1988, Oficina de las Naciones Unidad, Viena, 2014. https://www.unodc.org/documents/commissions/CND/Int_Drug_Control_Conventions/Ebook/The_International_Drug_Control_Conventions_S.pdf (acceso mayo 2021).

[97] Comisión Global de Política de Drogas, La Clasificación de Sustancias Psicoactivas. Cuando se dejó atrás a la Ciencia, 2019. https://www.globalcommissionondrugs.org/wp-content/uploads/2019/06/2019Report_ESP_web.pdf (acceso mayo 2021).

[98] Álvarez Y., Farré M., Farmacología de los opioides, *Adicciones* 2005, *17*, 21-40.

[99] Lizasoin I., Moro M.A., Lorenzo P., Cocaína: aspectos farmacológicos, *Adicciones* 2002, *14*, 57-64.

[100] Ullrich S.F., Hagels H., Kayser O., Scopolamine: a journey from the field to clinics, *Phytochem. Rev*. 2017, *16*, 333-353.

[101] Winek C.L., Wahba W.W., Winek C.L., Winek Balzer T., Drug and chemical blood-level data 2001, *For. Sci. Int*. 2001, *122*, 107-123.

[102] Sáiz J., Duc Mai T., López López M., Bartolomé C., Hauseer P.C., Gracía-Ruiz C., Rapid determination of scopolamine in evidence of recreational and predatory use, *Sci. Justice* 2013, *53*, 409-414.

[103] Lugo-Vargas A.F., Chaves-Silva D.C., Quevedo-Buitrago W.G., Martínez-Suárez J.F., Catinonas sintéticas: una revisión del panorama actual y las estrategias de detección analítica, *Rev. Toxicol*. 2020, *37*, 31-40.

[104] Janssen P.A.J., Eddy N.B., Compounds Related to Pethidine—IV. New Genaral Chemical Methods of Increading the Analgesic Activity of Pethadine, *J. Med. Chem.* 1952, *2*, 31-45.

[105] Armenian P., Vo K.T., Barr-Walker J., Lynch K.L., Fentanyl, fentanyl analogs and novel synthetic opioids: a comprehensive review, *Neuropharmacology* 2018, *134*, 121-132.

[106] Van Bever W.F., Niemegeers C.J., Schellekens K.H., Janssen P.A.J., N-4-Substituted 1-(2-arylethyl)-4-piperidinyl-N-phenylpropanamides, a novel series of extremely potent analgesics with unusually high safety margin, *Arzneimittelforschung*. 1976, *26*, 1548-51.

[107] Jansen P.A.J., Van Daele G.H.P., N-(4-piperidinyl)-N-phenylamides, US Patent Application: 05/862073, 1977.

[108] Misailidi N., Papoutsis I., Nikolaou P., Dona A., Spiliopoulou C., Athanaselis S., Fentanyls continue to replace heroin in the drug arena: the cases of ocfentanil and carfentanil, *Forensic Toxicol*. 2018, *36*, 12-32.

[109] Suzuki J., El-Haddad S., A review: Fentanyl and non-pharmaceutical fentanyls, *Drug Alcohol Depend*. 2017, *171*, 107-116.

[110] Drug Enforcement Administration, Rules-2010- Final Rule: Control of Immediate Precursor Used in the Illicit Manufacture of Fentanyl as a Schedule II Controlled Substance, 2010. https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2010-06-29/pdf/2010-15520.pdf (acceso mayo 2021).

[111] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Fentanils and synthetic cannabinoids: driving greater complexity into the drug situation. An update from the EU Early Warning System (June 2018), Publications Office of the European Union,

Luxembourg, 2018. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/8870/2018-2489-td0118414enn.pdf (acceso mayo 2021).

[112] Schedules of Controlled Substances: Placement of cyclopentyl fentanyl, isobutyryl fentanyl, para-chloroisobutyryl fentanyl, para-methoxybutyryl fentanyl, and valeryl fentanyl into Schedule I. Drug Enforcement Administration (DEA). https://www.deadiversion.usdoj.gov/fed_regs/rules/2020/fr0130.htm (acceso mayo 2021).

[113] Marchei E., Pacifici R., Mannocchi G., Marinelli E., Busardó F.P., Pichini S., New synthetic opioids in biological and non-biological matrices: a review of current analytical methods, *Trends Anal. Chem*. 2018, *102*, 1-15.

[114] Vardanyan R.S., Hruby V.J., Fentanyl-related compounds and derivatives: current status and future prospects for pharmaceutical applications, *Future Med. Chem*. 2014, *6*, 385-412.

[115] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA-Europol Joint Report on a new psychoactive substance: N-(1-phenethylpiperidin-4-yl)-N-phenylacrylamide (acrylfentanyl), Joint Reports, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2017. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/3873/TI_PUBPDF_TDAS17001ENN_PDFWEB_20170221105322.pdf (acceso mayo 2021).

[116] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA-Europol Joint Report on a new psychoactive substance: N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]cyclopropanecarboxamide (cyclopropylfentanyl), Joint Reports, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2018. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/7926/20181014_TDAS18001ENN_PDF.pdf (acceso mayo 2021).

[117] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA-Europol Joint Report on a new psychoactive substance: N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]furan-2-carboxamide (furanylfentanyl), Joint Reports, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2017. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/4682/JOINT_REPORT_furanylfentanyl_web.pdf (acceso mayo 2021).

[118] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA-Europol Joint Report on a new psychoactive substance: N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]tetrahydrofuran-2-carboxamide (tetrahydrofuranylfentanyl; THF-F), Joint Reports, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2017. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/5487/2017.4968_TDAS17008ENN_PDFWEB.pdf (acceso mayo 2021).

[119] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA-Europol Joint Report on a new psychoactive substance: 2-methoxy-N-phenyl-N-[1-(2-phenylehtyl)piperidin-4-yl]acetamide (methoxyacetylfentanyl), Joint Reports, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2018. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/7925/20181015_TDAS18002ENN_PDF.pdf (acceso mayo 2021).

[120] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA–Europol Joint Report on a new psychoactive substance: N-(4-fluorophenyl)-N-(1-phenethylpiperidin-4-yl)isobutyramide(4-fluoroisobutyrylfentanyl; 4F-iBF), Joint Reports, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2017. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/5482/2017.4967_TDAS17007ENN_PDFWEB.pdf (acceso mayo 2021).

[121] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA-Europol Joint Report on a new psychoactive substance: methyl 1-(2-phenylethyl)-4-[phenyl(propanoyl)amino]piperidine-4-carboxylate (carfentanil), Joint Reposts, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2017. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/6502/2017.6256_EN_04-WEB.pdf (acceso mayo 2021).

[122] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Fentanils and synthetic cannabinoids: driving greater complexity into the drug situation. An update from the EU Early Warning System (June 2018), Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2018. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/8870/2018-2489-td0118414enn.pdf (acceso mayo 2021).

[123] Pham T.D.M., Ziora Z.M., Blaskovich M.A.T., Quinolone antibiotics, *Med. Chem. Commun*. 2019, *10*, 1719-1739.

[124] Emmerson A.M., Jones A.M., The quinolones: decades of development and use, *J. Antimicrob. Chemother*. 2003, *51*, 13-20.

[125] Azanza J.R., Sábada B., Mediavilla A., Quinolonas. Sulfamidas. Trimetoprima. Cotrimoxazol. Nitrofurantoína, en: Flórez Beledo J., Armijo Simón J.A., Mediavilla Martínez Á. (eds), Farmacología humana, Elsevier, 2015.

[126] Dodd-Butera T., Broderick M., Ciprofloxacin, en: Wexler P. (ed), Encyclopedia of Toxicology, 3rd ed, Academic Press, 2014.

[127] Chander Sharma P., Jain A., Jain S., Pahwa R., Shahar Yar M., Ciprofloxacin: review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects, *J. Enzyme Inhib. Med*. 2010, *25*, 577-589.

[128] King D.E., Malone R., Lilley S.H., New Classification and Update on the Quinolone Antibiotics, *Am. Fam. Physician*. 2000, *61*, 2741-2748.

[129] Blondeau J.M., Fluoroquinolones: Mechanism of Action, Classification, and Development of Resistance, *Surv. Ophthalmol*. 2004, *49*, 73-78.

[130] Feria M., Fármacos analgésicos-antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos. antiartríticos, en: Flórez Beledo J., Armijo Simón J.A., Mediavilla Martínez Á. (eds), Farmacología humana, Elsevier, 2015.

[131] Shen T.Y., Windholz T.B., Rosegay A., Witzel B.E., Wilson A.N., Willett J.D., Holtz W.J., Ellis R.L., Matzuk A.R., Lucas S., Stammer C.H., Holly F.W., Sarett L.H., Risley E.A., Nuss G.W., Winter C.A., Non-steroid anti-inflammatory agents, *J. Am. Chem. Soc*. 1963, *85*, 488–9.

[132] Altman R., Bosch B., Brune K., Patrignani P., Young C., Advances in NSAID Development: Evolution of Diclofenac Products Using Pharmaceutical Technology, *Drugs* 2015, *75*, 859-877.

[133] Brune K., Hinz B., The Discovery and Development of Antiinflammatory Drugs, *Arthritis Rheum*. 2004, *50*, 2391-2399.

[134] Kuritzky L., Samraj G.P., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of low back pain, *J. Pain Res*. 2012, *5*, 579-590.

[135] Skopp G., Preanalytic aspects in postmortem toxicology, *For. Sci. Int*. 2004, *124*, 75-100.

[136] Moeller M.R., Steinmeyer S., Kraemer T., Determination of drugs of abuse in blood, *J. Chromatogr. B* 1998, *713*, 91-109.

[137] Jones A.W., Urine as a Biological Specimen for Forensic Analysis of Alcohol and Variability in the Urine-to-Blood Relationship, *Toxicol. Rev*. 2006, *25*, 15-35.

[138] Rose C., Parker A., Jefferson B., Cartmell E., The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol*. 2015, *45*, 1827-1879.

[139] Gjerde H., Leere Øiestad E., Chistophersen A.S., Using biological samples in epidemiological research on drugs of abuse, *Nor. Epidemiol*. 2011, *21*, 5-14.

[140] Martín Velasco A.I., Carón Lucena E., Sangre, en: Gal Iglesias, B., López Gallardo M., Martín Velasco A.I. (eds), Bases de la fisiología, 2ª ed., Editorial Tebar, 2007.

[141] Sánchez Martínez P.M., La saliva como fluido diagnóstico, *Ed. Cont. Lab Clin*. 2012-20113, *16*, 93-108.

[142] Humphrey S.P., Williamson R.T., A review of saliva: Normal composition, flow, and function, *J. Prosthet. Dent*. 2001, *85*, 162-169.

[143] Elmongy H., Abdel-Rehim M., Saliva as an alternative specimen to plasma for drug bioanalysis: A review, *Trends Anal. Chem*. 2016, *83*, 70-79.

[144] López Jornet P., Fisiología Salival, en: Almerich Silla J.M., Saliva y Salud Dental, Sociedad Española de Epidemiología y Salud Pública Oral (SESPO), Promolibro, Valencia, 1998.

[145] Nieuw Amerongen A., Ligtenberg A.J.M., Veerman E.C.I., Implications for Diagnostics in the Biochemistry and Physiology of Saliva, *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2007, *1098*, 1-6.

[146] Bosker W.M., Huestis M.A., Oral Fluid Testing for Drugs of Abuse, *Clin. Chem*. 2009, *55*, 1910-1931.

[147] Bévalot F., Cartiser N., Bottinelli C., Fanton L., Guitton J., Vitreous humor analysis for the detection of xenobiotics in forensic toxicology: a review, *Forensic Toxicol*. 2016, *34*, 12-40.

[148] Montefusco-Pereira C.V., de Matos Alves Pinto L., El humor vítreo como fluido biológico de importancia clínica en ciencias forenses, *Acta Bioquím. Clín. Latinoam*. 2016, *50*, 27-35.

[149] Pawliszyn J., Lord H.L., Handbook of Sample Preparation, 1st ed., Wiley & Sons, 2010.

[150] Cela R., Lorenzo R.A., Casais C., Técnicas de Separación en Química Analítica, 1ª ed., Síntesis, 2002.

[151] Pawliszyn J., Comprehensive Sampling and Sample Preparation, Elsevier, 2012.

[152] Valcárcel M., Gómez A., Técnicas analíticas de separación, 1ª ed., Reverté, 2003.

[153] Ahmadi M., Elmongy H., Madrakian T., Abdel-Rehim M., Nanomaterials as sorbents for simple preparation in bioanalysis: A review, *Anal. Chim. Acta* 2017, *958*, 7-21.

[154] Kabir A., Furton K.G., Malik A., Innovations in sol-gel microextraction phases for solvent-free sample preparation in analytical chemistry, *Trend Anal. Chem*. 2013, *45*, 197-208.

[155] Jain R., Singh R., Applications of dispersive liquid-liquid micro-extraction in forensic toxicology, *Trend anal. Chem*. 2016, *75*, 227-237.

[156] Abdel-Rehim M., New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 2004, *801*, 317-321.

[157] Yang L., Said R., Abdel-Rehim M., Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review, *J. Chromatogr. B* 2017, *1043*, 33-43.

[158] Pereira J., Câmara J.S., Colmsjö A., Abdel-Rehim M., Microextraction by packed sorbent: an emerging, selective and high-throughput extraction technique in bioanalysis, *Biomed. Chromatogr*. 2014, *28*, 839-847.

[159] Fontanals N., Borrull F., Marcé R.M., Overview of mixed-mode ion-exchange materials in the extraction of organic compounds, *Anal. Chim. Acta* 2020, *1117*, 89-107.

[160] Abdel-Rehim M., Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial, *Anal. Chim. Acta* 2011, *701*, 119-128.

[161] Pereira J.A.M., Gonçalves J., Porto-Figueira P., Figueira J.A., Alves V., Perestrelo R., Medina S., Câmara J.S., Current trends on microextraction by packed sorbent-fundamentals, application fields, innovative improvements and future applications, *Analyst* 2019, *144*, 5048.

[162] Rosado T., Gallardo E., Vieira D.N., Barroso M., New miniaturized clean-up precedure for hair samples by means of microextraction by packed sorbent: determination of cocaine and metabolites, *Anal. Bioanal. Chem*. 2020, *412*, 7963-7976.

[163] Da Cunha K.F., Costalonga Rodrigues L., Huestis M.A., Costa J.L., Miniaturized extraction method for analysis of synthetic opioids in urine by microextraction with packed sorbent and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Chromatogr. A* 2020, *1624*, 461241.

[164] Sorribes-Soriano A., Sánchez-Martínez S., Arráez-González R., Esteve-Turrillas F.A., Armenta S., Methylone determination in oral fluid using microextraction by packed sorbent coupled to ion mobility spectrometry, *Microchem. J*. 2020, *153*, 104504.

[165] Prata M., Ribeiro A., Figueirinha D., Rosado T., Oppolzer D., Restolho J., Araújo A.R.T.S., Costa S., Barroso M., Gallardo E., Determination of opiates in whole blood using microextraction by packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 2019, *1602*, 1-10.

[166] Rocchi R., Simeoni M.C., Montesano C., Vannutelli G., Curini R., Sergi M., Compagnone D., Analysis of new psychoactive substances in oral fluids by means of microextraction by packed sorbent followed by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Drug Test. Anal*. 2018, *10*, 865-873.

[167] Rosado T., Gonçalves A., Margalho C., Barroso M., Gallardo E., Rapid analysis of cocaine and metabolites in urine using microextraction in packed sorbent and GC/MS, *Anal. Bioanal. Chem*. 2017, *409*, 2051-2063.

[168] Fernández P., González M., Regenjo M., Ares A.M., Fernández A.M., Lorenzo R.A., Carro A.M., Analysis of drugs of abuse in human plasma using microextraction by packed sorbents and ultra-high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 2017, *1485*, 8-19.

[169] Montesano C., Simeoni M.C., Curini R., Sergi M., Lo Sterzo C., Compagnone D., Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with LC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem*. 2015, *407*, 3647-3658.

[170] Moreno I., Barroso M., Martinho A., Cruz A., Gallardo E., Determinatioon of ketamine and its majr metabolite, norketamine, in urine and plasma samples using microextraction by packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 2015, *1004*, 67-78.

[171] Vlčkvá H., El-Beqqali A., Nováková L., Solich P., Abdel-Rehim M., Determination of amphetamine and methadone in human urine by microextraction by packed sorbent coupled directly to mass spectrometry: An alternative for rapid clinical and forensic analysis, *J. Sep. Sci*. 2014, *37*, 3306-3313.

[172] Sergi M., Montesano C., Odoardi S., Mainero Rocca L., Fabrizi G., Compagnone D., Curini R., Micro extraction by packed sorbent coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cannabinoids in oral fluids, *J. Chromatogr. A* 2013, *1301*, 139-146.

[173] Jagerdeo E., Abdel-Rehim M., Screening of cocaine and its metabolite in human urine samples by direct analysis in real-time source coupled to time-of -flight mass spectrometry after online precocentration utilizing microextraction by packed sorbent, *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. 2009, *20*, 891-899.

[174] Miyaguchi H., Iwata Y.T., Kanamori T., Tsujikawa K., Kuwayama K., Inoue H., Rapid identification and quantification of methamphetamine and amphetamine in hair by gas chromatography/mass spectrometry coupled with micropulverized extraction, aqueous acetylation and microextraction by packed sorbent, *J. Chromatogr. A* 2009, *1216*, 4063-4070.

[175] Rezaee M., Assadi Y., Hosseini M.R.M., Aghaee E., Ahmadi F., Berijani S., Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 2006, *1116*, 1-9.

[176] Sajid M., Alhooshani K., Dispersive liquid-liquid microextraction based binary extraction techniques prior to chromatographic analysis: A review, *Trend Anal. Chem*. 2018, *108*, 167-182.

[177] Al-Saidi H.M., Emara A.A.A., The recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration and determination of inorganic analytes, *J. Saudi Chem. Soc*. 2014, *18*, 746-761.

[178] Dmitrienko S.G., Apyari V.V., Tolmacheva V.V., Gorbunova M.V., Dispersive Liquid-Liquid Microextraction of Organic Compounds: An Overview of Reviews, *J. Anal. Chem*. 2020, *75*, 1237-1251.

[179] He Y., Concheiro-Guisan M., Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology, *Biomed. Chromatogr*. 2019, *33*, 4444.

[180] Custodio-Mendoza J.A., Aja-Macaya J., Valente I.M., Rodrigues J.A., Almeida P.J., Lorenzo R.A., Carro A.M., Determination of malondialdehyde, acrolein and four other products of lipid peroxidation in edible oils by Gas-Diffusion Microextraction combined with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, *J. Chromatogr. A* 2020, *1627*, 461397.

[181] Mercieca G., Odoardi S., Mestria S., Cassar M., Strano-Rossi S., Application of ultrasound-assisted liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography and mass spectrometry for the rapid determination of synthetic cannabinoids and metabolites in biological samples*, J. Sep. Sci*. 2020, *43*, 2858-2868.

[182] Wang Z., Hsieh M.M., Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with field-amplified capillary electrophoresis for sensitive and quantitative determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in biological fluids, *Anal. Bioanal. Chem*. 2020, *412*, 5113-5123.

[183] Fernández P, Regenjo M., Ares, A., Fernández A.M., Lorenzo R.A., Carro A.M., Simultaneous determination of 20 drugs of abuse in oral fluid using ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction, *Anal. Bioanal. Chem*. 2019, *411*, 193-203.

[184] Vicenti F., Montesano C., Celluci L., Gregori A., Fanti F., Compagnone D., Curini R., Sergi M., Combination of pressurized liquid extraction with dispersive liquid liquid micro extraction for the determination of sixty drugs of abuse in hair, *J. Chromatogr. A* 2019, *1605*, 360348.

[185] Xu F., Liu L., Simultaneous determination of free methamphetamine, pethidine, ketamine and tramadol in urine by dispersive liquid-liquid microextraction combined with GC-MS, *Forensic Sci. Res*. 2019, *4,* 188-194.

[186] Alahyari E., Stareh M., Shekari A., Roozbehani G., Soltaninejad K., Analysis of opioids in postmortem urine samples by dispersive liquid-liquid microextraction and high performance liquid chromatography with photo diode array detection, *Egypt. J. Forensic Sci*. 2018, *8*, 13.

[187] Mercieca G., Odoardi S., Cassar M., Strano Rossi S., Rapid and simple procedure for the determination of cathinones, amphetamines-like stimulants ant other new psychoactive substances in blood and urine by GC-MS, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2018, *149*, 494-501.

[188] Martins A.F., dos Santos J.B., Todeschini B.H., Saldanha L.F., da Silva D.S., Reichert J.F., Souza D.M., Occurrence of cocaine and metabolites in hospital effluent- A risk evaluation and development of a HPLC method using DLLME, *Chemosphere* 2017, *170*, 176-182.

[189] Meng L., Zhu B., Zheng K., Fu S., Ultrasound-assited low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of 4 designer benzodiazepines in urine samples by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 2017, *1053*, 9-15.

[190] Lin Z., Li J., Zhang X., Qiu M., Huang Z., Rao Y., Ultrasound-assited dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of seven recreational drugs in human whole blood using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 2017, *1046*, 177-184.

[191] Fernández P., Taboada V., Regenjo M., Morales L., Alvarez I., Carro A.M., Lorenzo R.A., Optimization of ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction of six antidepressants in human plasma using experimental design, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2016, *124*, 189-197.

[192] Leal Cunha R., Araujo Lopes W., Pereira P.A.P., Determination of free (unconjugated) amphetamine-type stimulants in urine samples by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography coupled to mass spectrometry (DLLME-GC-MS), *Microchem. J*. 2016, *125*, 230-235.

[193] Gardner M.A., Sampsel S., Jenkins W.W., Owens J.E., Analysis of fentanyl in urine by DLLME-GC-MS, *J. Anal Toxicol*. 2015, *39*, 118-125.

[194] Olędzka I., Kulińska Z., Prahl A., Bączek T., Simultaneous separation of eight benzodiazepines in human urine using field-amplified sample stacking micellar electrokinetic chromatography, *J. Anal. Toxicol*. 2015, *39*, 436-443.

[195] Meng L., Zhang W., Meng P., Zhu B., Zheng K., Comparison of hollow fiber liquid-phase microextraction and ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of drugs of abuse in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 2015, *989*, 46-53.

[196] Fisichella M., Odoardi S., Strano-Rossi S., High-throughput dispersive liquid/liquid microextraction (DLLME) method for the rapid determination of drugs of abuse, benzodiazepines and other psychotrpic medications in blood samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and application to forensic cases, *Microchem. J*. 2015, *123*, 33-41.

[197] Fernández P., Regenjo M., Bermejo A.M., Fernández A.M., Lorenzo R.A., Carro A.M., Analysis of drugs of abuse in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography, *J. Appl. Toxicol*. 2015, *35*, 418-425.

[198] Fernández P., Regenjo M., Fernández A.M., Lorenzo R.A., Carro A.M., Optimization of ultrasound-assited dispersive liquid-liquid microextraction for ultra performance liquid chromatography determination of benzodiazepines in urine and hospital wastewater, *Anal. Methods* 2014, *6*, 8239-8246.

[199] Fernández P., González C., Pena M.T., Carro A.M., Lorenzo R.A., A rapid ultrasound-assited dispersive liquid-liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples, *Anal. Chim. Acta* 2013, *767*, 88-96.

[200] Airado-Rodríguez D., Cruces-Blanco C., García-Campaña A.M., Dispersive liquid-liquid microextraction prior to field-amplified simple injection for the sensitive analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine, phencyclidine and lysergic acid diethylamide by capillary electrophoresis in human urine, *J. Chromatogr. A* 2012, *1267*, 189-197.

[201] Moradi M., Yamini Y., Baheri T., Analysis of abuse drugs in urine using surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Sep. Sci*. 2011, *34*, 1722-1729.

[202] Kabir, A., Furton K.G., Fabric Phase Sorptive Extractor (FPSE). U.S. Patent US 20140274660 A1, 18 September 2014.

[203] Kabir A., Furton K.G., Fabric phase sorptive extraction: a new generation, green sample preparation approach, en: Poole C.F. (ed.), Handbooks in Separation Science-Solid-Phase Extraction, Elsevier, 2020.

[204] Kazantzi V., Anthemidis A., Fabric Sol-gel Phase Sorptive Extraction Technique: A Review, *Separations* 2017, *4*, 20.

[205] Kabir A., Mesa R., Jurmain J., Furton K.G., Fabric Phase Sorptive Extraction Explained, *Separations* 2017, *4*, 21.

[206] Jiménez-Holgado C., Chrimatopoulos C., Stathopoulos V., Sakkas V., Investigating the utility of fabric phase sorptive extraction and HPLC-UV-Vis/DAD to determine antidepressant drugs in environmental aqueous samples, *Separations* 2020, *7*, 39.

[207] Ruan X., Xing L., Peng J., Li S., Song Y., Sun Q., A simplified fabric phase sorptive extraction method for the determination of amphetamine drugs in water samples using liquid chromatography-mass spectrometry, *RSC Adv*. 2020, *10*, 10854.

[208] Tartaglia A., Kabir A., D´Ambrosio F., Ramundo P., Ulusoy S., Ulusoy H.I., Merone G.M., Savini F., D´Ovidio C., De Grazia U., Furton K.G., Locatelli M., Fast off-line FPSE-HPLC-PDA determination of six NSAIDs in saliva samples, *J. Chromatogr. B* 2020, *1144*, 122082.

[209] Alampanos V., Kabir A., Furton K.G., Samanidou V., Fabric phase sorptive extraction for simultaneous observation of four penicillin antibiotics from human blood serum prior to high performance liquid chromatography and photo-diode array detection, *Microchem J*. 2019, *149*, 103964.

[210] Zilfidou E., Kabir A., Furton K.G., Samanidou V., An improved fabric phase sorptive extraction method for the determination of five selected antidepressant drug residues in human blood serum prior to high performance liquid chromatography with diode array detection, *J. Chromatogr. B* 2019, *1125*, 121720.

[211] Lioupi A., Kabir A., Furton K.G., Samanidou V., Fabric phase sorptive extraction for the isolation of five common antidepressants from human urine prior to HPLC-DAD analysis, *J. Chromatogr. B* 2019, *1118-1119*, 171-179.

[212] Locatelli M., Tinari N., Grassadonia A., Tartaglia A., Macerola D., Piccolantonio S., Sperandio E., D´Ovidio C., Carradori S., Ulusoy H.I., Furton K.G., Kabir A., FPSE-HPLC-DAD method for the quantification of anticancer drugs in human whole blood, plasma, and urine, *J. Chromatogr. B* 2018, *1095*, 204-213.

[213] Kabir A., Furton K.G., Tinari N., Grossi L., Innose D., Macerola D., Tartaglia A., Di Donato V., D´Ovidio C., Locatelli M., Fabric phase sorptive extraction-high performance liquid chromatography-photo diode array detection method for simultaneous monitoring of three inflammatory bowel disease treatment drugs in whole blood, plasma and urine, *J. Chromatogr. B* 2018, *1084*, 53-63.

[214] Locatelli M., Kabir A., Innosa D., Lopatriello T., Furton K.G., A fabric phase sorptive extraction-high performance liquid chromatography-photo diode array detection method for the determination of twelve azole antimicrobial drug residues in human plasma and urine, *J. Chromatogr. B* 2017, *1040*, 192-198.

[215] Samanidou V., Kaltzi I., Kabir A., Furton K.G., Simplifying sample preparation using fabric phase sorptive extraction technique for the determination of benzodiazepines in blood serum by high-performance liquid chromatography, *Biomed. Chromatogr*. 2016, *30*, 829-836.

[216] Racamonde I., Rodil R., Quintana J.B., Sieira B.J., Kabir A., Furton K.G., Cela R., Fabric phase sorptive extraction: a new sorptive microextraction technique for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs from environmental water samples, *Anal. Chim. Acta* 2015, *865*, 22-30.

[217] Pacheco-Fernández I., Allgaier-Díaz D.W., Mastellone G., Cagliero C., Díaz Díaz D., Pino V., Biopolymers in sorbent-based microextraction methods, *Trends Anal. Chem*. 2020, *125*, 115839.

[218] Brown M., Cellulose Structure and Biosynthesis: What is in Store for the 21st Century?, *Polym. Chem*. 2004, *42*, 487-495.

[219] Medronho B., Andrade R., Vivod V., Ostlund A., Miguel M.G., Lindman B., Voncina B., Velente A.J.M., Cyclodextrin-grafted cellulose: Physico-chemical characterization, *Carbohydr. Polym*. 2013, *93*, 324-330.

[220] Heinze T., New ionic polymers by cellulose functionalization, *Macromol. Chem. Phys*. 1998, *199*, 2341-2364.

[221] Hellström P., Heijnesson-Hultén A., Paulsson M., Håkansson H., Germgård U., The effect of Fenton chemistry on the properties of microfibrillated cellulose, *Cellulose* 2014, *21*, 1489-1503.

[222] Vismara E., Melone L., Gastaldi G., Cosentino C., Torri G., Surface functionalization of cotton cellulose with glycidyl methacrylate and its application for the adsorption of aromatic pollutants from wastewaters, *J. Hazard. Mater*. 2009, *170*, 798-808.

[223] Sun L., Yang S., Qian X., An X., Cyclodextrin and cellulose combination product developed by click chemistry: fascinating design for inclusion of ciprofloxacin, *Cellulose* 2020, *27*, 5955-5970.

[224] Alvarez-Lorenzo C., García-González C.A., Concheiro A., Cyclodextrins as versatile building blocks for regenerative medicine, *J. Control. Release* 2017, *268*, 269-281.

[225] Jansook P., Ogawa N., Loftsson T., Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications, *Int. J. Pharm.* 2018, *535*, 272-284.

[226] Kurkov S.V., Loftsson T., Cyclodextrins, *Int. J. Pharm*. 2013, *453*, 167-180.

[227] Dodziuk H., Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods and applications, Wiley-VCH, Weinheim, 2006.

[228] Crini G, Fourmentin S., Fenyvesi E., Torri G., Fourmentin M., Morin-Crini N., Cyclodextrins, from molecules to applications, *Environ. Chem. Lett*. 2018, *16*, 1361-1375.

[229] Liu L., Guo Q.X., The driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem*. 2002, *42*, 1-14.

[230] Gentili A., Cyclodextrin-based sorbents for solid phase extraction, *J. Chromatogr. A* 2020, *1609*, 460654.

[231] Tian B., Hua S., Tian Y., Liu J., Cyclodextrin-based adsorbents for the removal of pollulants from wastewater: a review, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020, 28, 1317-1340.

[232] Stuart B., Chapter 7: Separation Techniques, en: Ando D.J. (ed), Analytical Techniques in the Sciences, John Wiley & Sons, 2013.

[233] Lembke P., Chapter 12: Liquid Chromatography, en: Günzler H., Williams A. (eds), Handbook of Analytical Techniques, John & Wiley Sons, 2001.

[234] Huber L., George S.A., Diode array detection in HPLC, en: Cazes J. (ed), Chromatographic Science Series, Marcel Dekker, 2002.

[235] Mbughuni M.M., Jannetto P.J., Langman L.J., Mass spectrometry applications for toxicology, *eJIFCC* 2016, *27*, 272-287.

[236] Dass C., Chapter 5: Hyphenated separation techniques, en: Dass C. (ed), Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry, John & Wiley Sons, 2007.

[237] Linscheid M., Chapter 20: Mass spectrometry, en: Günzler H., Williams A. (eds), Handbook of Analytical Techniques, John & Wiley Sons, 2001.

[238] Pitt J.J., principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry, *Clin. Biochem. Rev*. 2009, *30*, 19-34.

[239] Kraemer T., Paul L.D., Bioanalytical procedures for determination of drugs of abuse in blood, *Anal. Bioanal. Chem*. 2007, *388*, 1415-1435.

[240] Peters F.T., Recent advances of liquid-chromatography-(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology, *Clin. Biochem*. 2011, *44*, 54-65.

[241] Saitman A., Chapter 13-Overview of analytical methods in drugs of abuse analysis: gas chromatography/mass spectrometry, liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry and related methods, en: Dasgupta A. (ed), Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing, Elsevier, 2019.

[242] Watson J.T., Sparkman O.D., Chapter 10: Gas Chromatography/Mass Spectrometry, en: Watson J.T., Sparkman O.D. (eds.), Introduction to Mass spectrometry:

Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation, John Wiley & Sons, 2007.

[243] Gahlaut A., Dhull V., Dahiya M., Dabur R., Analytical techniques in forensic sicence: MS & Bio-sensor based diagnostics, *Int. J. Chem. Anal. Sci*. 2014, *5*, 6-10.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO I. DETERMINACIÓN DE ANTIDEPRESIVOS

Publicaciones relacionadas con este capítulo:

- Ana M. Ares Fuentes[1], Purificación Fernández[2], Ana M. Fernández[3], Antonia M. Carro[1], Rosa A. Lorenzo[1], Microextraction by packed sorbent followed by ultra high performance liquid chromatography for the fast extraction and determination of six antidepressants in urine, *J. Sep. Sci*. 2019, *42*, 2053-2061.

  Factor de impacto (2019): 2.878
  Cuartil (2019): Q2 (posición 32/86)
  Nº citas (Web of Science): 4
  Nº citas (SCOPUS): 4
  Nº citas Google Académico: 5
  PMID: 30945416
  DOI: 10.1002/jssc.201900060

[1] *Departamento de Química Analítica, Facultad de Química e Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, La Coruña, España.*

[2] *Instituto de Medicina Legal, Servicio Toxicológico Forense, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, La Coruña, España.*

[3] *Unidad de Asistencia a las Drogodependencias, Monforte de Lemos, Lugo, España.*

Declaración de contribución de autoría:

- A.M. Ares-Fuentes: Investigación, Validación, Análisis formal, Visualización, Escritura-borrador original.

Presentación a congresos relacionados con este capítulo:

Póster: "Microextraction by packed sorbents (MEPS) as sample preparation procedure for the simultaneous determination of antidepressant drugs in human urine", XXII Congreso Español de Toxicología y VI Iberoamericano (AETOX), 28-30 junio 2017, Valencia (España). Rev. Toxicol. 34 (1), 1-82 (2017) ISSN 0212-7313.

Póster: "Aplicación de la Microextracción con Adsorbentes Empaquetados (MEPS) al Análisis de Sustancias Psicotrópicas en Matrices Biológicas", XXI Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica (SEQA), 5-7 septiembre 2017, Valencia (España). ISBN 978-84-697-4966-1.

Oral: "Técnicas de preparación de muestra en Toxicología Analítica Forense", XXII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica (SEQA), 17-19 julio 2019, Valladolid (España).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A. DETERMINACIÓN DE ANTIDEPRESIVOS EN ORINA.

1.1. INTRODUCCIÓN

La depresión es uno de los trastornos psiquiátricos más extendidos que resulta de una interacción compleja de factores sociales, psicológicos y biológicos, y afecta a más de 350 millones de personas de todas las edades del mundo. La depresión a menudo se presenta con pérdida de interés, disminución de la energía y falta de concentración, e incluso puede conducir al suicidio. Esta enfermedad se propaga tan rápidamente que es de esperar que se convierta en la segunda causa principal de discapacidad para individuos de todas las edades y sexos por 2020 [1, 2].

La depresión generalmente se trata con antidepresivos, que actualmente son la fuente más común de intoxicación por fármacos después de las benzodiacepinas. Por lo general, la intoxicación con antidepresivos resulta de la ingesta voluntaria o intento de suicidio por parte de pacientes con estado depresivo. En las últimas décadas, el uso de fármacos que modifican el estado de ánimo ha aumentado por el efecto de algunos antidepresivos como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) y los inhibidores de la recaptación de serotonina-noradrenalina (IRNS) que desplazan gradualmente a los antidepresivos tricíclicos tradicionales [2, 3].

Los antidepresivos estudiados en este capítulo actúan a través de diferentes mecanismos. Venlafaxina es un IRSN, mientras que escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina y sertralina son ISRS selectivos, y mirtazapina es un antagonista serotoninérgico específico y noradrenérgico. Estos medicamentos se usan en una variedad de combinaciones para tratar la depresión, la ansiedad, el pánico, las fobias y los trastornos obsesivos compulsivos, postraumáticos, premenstruales y disfóricos, de ahí el riesgo de interacciones mutuas. Además, los antidepresivos se detectan con frecuencia en los exámenes de toxicología de emergencias y las pruebas de abuso de drogas, así como en los casos de agresión sexual con drogas o muerte. El uso creciente de estos antidepresivos en España puede atribuirse a una incidencia cada vez mayor de trastornos del estado de ánimo, su detección diagnóstica por parte de los médicos de atención primaria y la extensión de las indicaciones terapéuticas autorizadas para estos fármacos [4].

Hasta ahora, los antidepresivos se han determinado en muestras biológicas mediante el uso de diversas técnicas que incluyen HPLC [5-8], UHPLC [8-11] y GC en combinación con diferentes tipos de detectores [12-15]. Durante muchos años, la LLE [6, 16] y la SPE [7, 17, 18] fueron las técnicas de preparación más utilizadas para extraer y preconcentrar antidepresivos de muestras biológicas. Sin embargo, en los últimos años, las versiones miniaturizadas, que incluyen DLLME [14, 15, 19, 20] y MEPS [9, 21-25], han surgido como alternativas sencillas y rápidas que reducen sustancialmente los volúmenes de disolvente y de muestra, así como, los tiempos de extracción. La MEPS permite que el procesado de muestras, la extracción y la inyección se realicen de una sola vez de manera totalmente automática y eficiente, sin pérdida de sensibilidad en relación con la SPE, conectando un dispositivo de inyección/muestreo en línea a un cromatógrafo de gases o líquidos [26].

El uso generalizado de antidepresivos ha llevado a que las clases de ISRS, IRSN y antagonistas serotoninérgicos noradrenérgicos y específicos ganen rápidamente importancia en los campos clínico y forense. Las concentraciones de estos antidepresivos terapéuticos en fluidos humanos suelen ser muy bajas, lo que complica su detección. Por

lo tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos analíticos simples, precisos, rápidos y sensibles basados en técnicas miniaturizadas para un control más riguroso de estos fármacos en matrices biológicas como la orina.

En este capítulo, se desarrolló un método nuevo, rápido, sensible y económico para la identificación y determinación de seis antidepresivos (nombrados como escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina, mirtazapina, sertralina y venlafaxina) en orina humana mediante el uso de microextracción con adsorbente empaquetado (MEPS) seguido de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento con detección de red de diodos (UHPLC-DAD). El método propuesto se utilizó para el análisis cuantitativo de estos fármacos en muestras de orina procedente de voluntarios.

1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

1.2.1. COMPUESTOS Y REACTIVOS

Los patrones comerciales de venlafaxina, fluoxetina y fluvoxamina se obtuvieron de Normon® (Madrid, España), mientras que el patrón de escitalopram fue suministrado por Lundbeck® (Valby, Dinamanca), de setralina por Pfizer® (Madrid, España) y de mirtazapina por Merck Sharp Dome® (Nueva York, Estados Unidos). Acetonitrilo, cloroformo, metanol, ácido fosfórico y dihidrógeno fosfato de potasio en grado gradiente fueron adquiridos a Merck® (Darmstadt, Alemania). Surine™ fue suministrado por Cerilliant (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se trata de un material de referencia certificado libre de creatinina, utilizado como un control negativo de orina en cromatografía líquida, química clínica, análisis de drogas en orina y análisis forense. Se obtuvo agua ultra pura de un sistema Milli-Q de Millipore (Le Mont-sur-Lausanne, Suiza).

Las disoluciones madre individuales que contenían una concentración de 1 mg/mL de cada fármaco se prepararon en metanol. Las muestras de orina se adicionaron con estándares que contenían concentraciones de 10 a 1000 ng/mL de cada analito que se prepararon por dilución sucesiva de las disoluciones madre. Todas las disoluciones se almacenaron congeladas a -20°C hasta su uso.

El sistema MEPS consistió en una jeringa analítica digital eVol® XR (100 µL) equipada con un cartucho y una aguja de inserción (BIN), y se obtuvo de SGE (Melbourne, Australia). El BIN se empaquetó con 4 mg de cada adsorbente probado (45 µm de tamaño de partícula y 60 Å de tamaño de poro): un intercambiador catiónico fuerte mixto (C_8+SCX), octadecilsilica (C_{18}) y octil-sílice (C_8). Cada adsorbente fue acondicionado pasando 100 µL de metanol cuatro veces y 100 µL de agua ultra pura cuatro veces antes del primer uso.

1.2.2. MUESTRAS DE ORINA

Los estándares de calibración se prepararon usando orina libre de drogas de adultos sanos. También se usó un control de orina sintético negativo (Surine™) en la preparación de estándares para la construcción de curvas de calibración para validar el método propuesto. Se obtuvieron muestras de orina real de voluntarios tratados con antidepresivos y almacenadas refrigeradas a 4°C o congeladas a -20°C, si los análisis se demoraban. Antes del uso, las muestras congeladas se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos. Todas las pruebas se realizaron de acuerdo con los "Principios éticos para la investigación médica en seres humanos" de la Asociación Médica Mundial [27].

1.2.3. CONDICIONES DEL UHPLC-DAD

Los análisis cromatográficos se realizaron en un sistema ACQUITY UPLC H-Class de Waters® (Milford, MA, EEUU) equipado con un detector ACQUITY UPLC PDA y una columna ACQUITY BEH Shield RP 18 (2.1 x 100 mm, 1.7 µm de tamaño de partícula). El caudal de fase móvil a través de la columna fue de 0.43 mL/min y la columna se mantuvo a una temperatura constante de 30 °C. Para la separación cromatográfica, se utilizó una fase móvil que consta de acetonitrilo (A) y tampón fosfato 1 mM a pH 3 (B), usado en modo gradiente en la siguiente secuencia: 0 min 20% A, 0.60 min 50% A, 0.68 min 50% A, 0.82 min 45% A, 0.95 min 20% A, manteniendo ese porcentaje hasta los 2.00 min. La fase móvil se pasó a través de un filtro de 0.22 µm de tamaño de poro, antes de su uso. El PDA permitió escanear el rango de longitudes de onda entre 200 y 400 nm, para obtener cromatogramas tridimensionales (longitud de onda x absorbancia x tiempo), donde la absorbancia era máxima para cada uno de los compuestos. Finalmente, la detección se realizó fijando una longitud de onda de 230 nm, la cual proporcionaba una sensibilidad adecuada para la determinación simultánea de todos los compuestos de interés. La separación cromatográfica de los seis antidepresivos llevó 1.7 minutos y el tiempo total de análisis fue sólo de 2 minutos. Se identificaron las señales cromatográficas a partir de los tiempos de retención y los espectros de absorbancia correspondientes a los analitos.

1.2.4. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS CON MEPS

En este trabajo, se mezcló un volumen de 300 µL de orina con 200 µL de tampón fosfato (50 mM, pH 7) para mejorar la interacción entre los analitos de la muestra y la fase mixta (80% C_8 + 20% SCX). Esto influye en la extracción y concentración de los analitos, garantizando una alta selectividad y sensibilidad [28]. Los analitos se concentraron pasando diez alícuotas de 100 µL a través del adsorbente MEPS en ciclos de aspiración-descarte, o *strokes*, en el mismo vial (volumen de muestreo total 1000 µL). Luego se lavó la fase con 100 µL de agua ultra pura para eliminar posibles interferentes retenidos en la fase y se secó durante 30 segundos pasando tres veces 100 µL de aire a través del sistema MEPS. Finalmente, los antidepresivos se eluyeron directamente en el vial con 50 µL de metanol (MeOH) y se inyectó una alícuota de 5 µL en el sistema UPLC-PDA.

A diferencia de la SPE, la fase en MEPS puede reutilizarse más de una vez, siguiendo una serie de lavados de la fase con diferentes disolventes o mezclas de éstos, generalmente compuestos por agua y un pequeño porcentaje de disolventes orgánicos. La vida útil de los adsorbentes MEPS se alargó lavando secuencialmente cuatro veces cada uno con 100 µL de 0.1% de ácido fórmico y 100 µL de metanol. Este paso de lavado del adsorbente también sirvió como paso de acondicionamiento para el siguiente ciclo de extracción y para evitar posibles efectos memoria de la fase. Por lo tanto, cada fase podría usarse en más de 70 extracciones. El procedimiento analítico de MEPS se representa en la **Figura 1.1**.

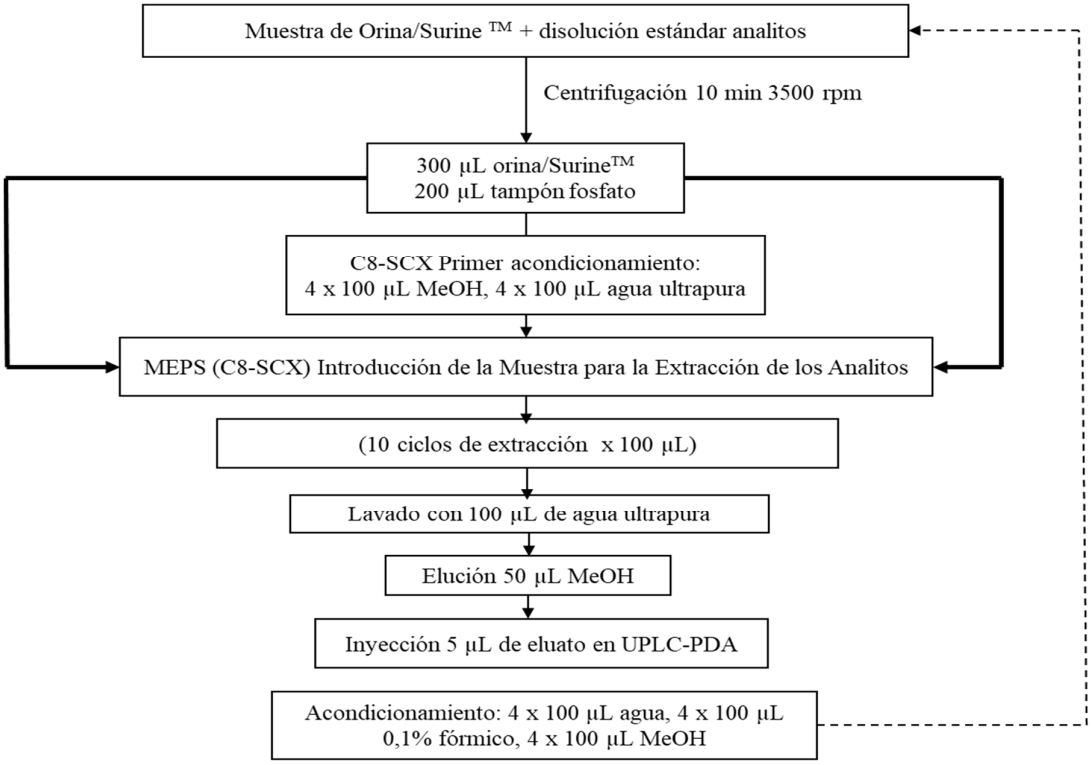


Figura 1.1. Representación esquemática de los pasos involucrados en el procedimiento MEPS.

1.2.5. VALIDACIÓN ANALÍTICA DEL MÉTODO

El método propuesto fue validado, según las directrices internacionales de la Administración Americana de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA) y la Conferencia Internacional de Armonización para Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) [29, 30], en términos de linealidad, LOD y LOQ, selectividad, precisión y exactitud (recuperación), utilizando el material de referencia certificado Surine™.

La linealidad se evaluó construyendo una curva de calibrado para cada analito, usando Surine™ en la validación y un blanco de orina sin analito en las determinaciones de muestra, adicionado con cada compuesto con concentraciones en el rango de 25-1000 ng/mL (calibrado de adición estándar). Se realizaron tres réplicas por nivel de concentración y las áreas de señal cromatográfica resultantes se usaron para cuantificar los analitos.

Se consideró como LOD y LOQ de cada antidepresivo las concentraciones más bajas con una relación señal-ruido de 3.3 y 10, respectivamente.

La precisión, como % RSD, se evaluó mediante el uso de muestras de control de calidad (QC) utilizando Surine™ con adición a tres niveles de concentración (50, 250 y 500 ng/mL). La precisión intra-día se determinó mediante el uso de cinco replicados por nivel de concentración en el mismo día, y la precisión inter-día mediante el análisis de muestras QC en los tres niveles de concentración anteriores por duplicado diariamente durante tres días consecutivos. La exactitud, en términos de porcentaje de recuperación, se evaluó mediante el uso de cuatro replicados de muestras QC de Surine™ por nivel de concentración.

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras biológicas se caracterizan por ser matrices complejas, que normalmente requieren un tratamiento previo para acondicionarlas antes de su paso a través del adsorbente de MEPS, evitando su obstrucción y extendiendo su reutilización. Este pretratamiento implica distintas etapas como: la dilución de la muestra para reducir su viscosidad, la precipitación de proteínas para evitar que se obstruya la fase, o el ajuste del pH de la muestra para reducir la ionización de ácidos y bases débiles, particularmente en los adsorbentes de intercambio iónico. En este trabajo, se evitó el bloqueo del cartucho MEPS eliminando previamente las macropartículas no deseadas de las muestras [9]. Para ello, se recogieron muestras de orina humana de voluntarios sanos, se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos y se almacenaron a 4°C hasta su análisis. No se requirió ningún otro tratamiento previo adicional de la muestra de orina, lo cual es una ventaja del método propuesto.

1.3.1. OPTIMIZACIÓN DEL DISOLVENTE DE ELUCIÓN Y LAVADO

El procedimiento MEPS fue optimizado para obtener la máxima eficiencia de extracción atendiendo a los factores más influyentes (por ejemplo, tipo y volumen de disolventes y de muestra o número de ciclos de extracción), de acuerdo con las recomendaciones publicadas [9, 31, 32] y la experiencia previa del grupo de investigación [27]. En primer lugar, se estudió el disolvente de elución y de lavado más adecuado, y se seleccionó utilizando muestras de orina adicionadas con un estándar que contenía una mezcla de antidepresivos a una concentración de 0.5 y 2 µg/mL, respectivamente. El disolvente de elución debe ser un disolvente orgánico o una mezcla capaz de eliminar eficazmente los analitos del adsorbente retenidos después de la etapa de carga de muestra [32]. Se evaluaron diferentes disolventes considerando un volumen de 100 µL: acetonitrilo, metanol, y mezclas binarias que incluyen cloroformo/isopropanol (80:20, v/v), agua MilliQ/acetonitrilo (75:25, v/v), y acetonitrilo/tampón fosfato 1 mM (pH 3) (20:80, v/v) (condiciones iniciales de la fase móvil). Los ensayos se realizaron por triplicado en combinación con una jeringa MEPS empaquetada con adsorbente C_8+SCX dentro del BIN. La mezcla compuesta por cloroformo/isopropanol de polaridad media es utilizada en SPE para eluir compuestos retenidos en adsorbentes no polares, como C_8 o C_{18} [33]. Sin embargo, como se puede observar en la **Figura 1.2**, la mezcla no consiguió extraer ninguno de los analitos de interés. Posiblemente, esto es debido al carácter básico de los antidepresivos (pKa > 8) y al emplear una fase mixta, que contiene un adsorbente no polar y un intercambiador de cationes. La mezcla formada por acetonitrilo/agua (de mayor polaridad) tampoco es adecuada para la elución de fluoxetina, mientras que el resto de los disolventes estudiados aseguraron una elución completa de los antidepresivos seleccionados. La mezcla formada por las condiciones iniciales de la fase móvil fue el segundo disolvente que mejores señales cromatográficas proporcionó de los compuestos estudiados, excepto para mirtazapina, que resultó ser mejor la elución con acetonitrilo puro. Sin embargo, metanol resultó ser el mejor disolvente de elución al asegurar la elución completa de todos los antidepresivos y proporcionando las mejores respuestas cromatográficas de todos ellos. Por ello, se seleccionó metanol como disolvente de elución.

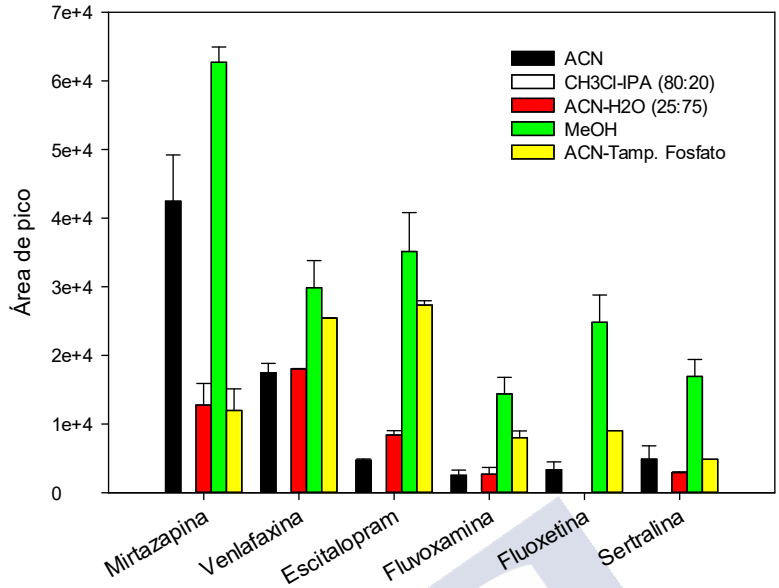


Figura 1.2. Disolventes de elución en la extracción de ATD en muestras de orina (n=3).

En el procedimiento de MEPS, la etapa de lavado de la fase antes de la elución de los analitos ayuda a eliminar posibles interferencias no deseadas y débilmente retenidas en la fase. Con ello, se asegura un aumento significativo en la eficiencia de extracción de los analitos. Como se mencionó anteriormente, los antidepresivos estudiados tienen un carácter básico (pKa 8-14), y su extracción se basa en interacciones hidrofóbicas primarias e interacciones secundarias iónicas. Por ello, se suele utilizar pequeños volúmenes de agua con 5-10% de disolvente orgánico para eluir este tipo de componentes no deseados [26]. En este trabajo, el efecto de incluir una etapa de lavado adicional después de la carga de la muestra, pero antes del secado se investigó usando un volumen de 100 µL de varios disolventes de lavado que incluyen 0.1% ácido fórmico, agua Milli-Q, 5% MeOH y 5% NH_4OH, o sin disolvente (es decir, sin etapa de lavado). Como se puede observar en la **Figura 1.3**, sin una etapa de lavado se obtuvieron los mejores resultados para la mayoría de los antidepresivos, excepto para mirtazapina y fluoxetina. Sin embargo, observando los cromatogramas obtenidos se puede observar que aún existen compuestos interferentes que podrían obstaculizar la cuantificación de los compuestos. Por otro lado, utilizando agua Milli-Q como disolvente de lavado se eliminaba la mayoría de las especies potencialmente interferentes, posiblemente debido a que los compuestos endógenos encontrados en la orina son solubles en agua. Además, resultó ser el mejor disolvente de lavado para mirtazapina, escitalopram y sertralina. Un disolvente alcalinizado (5% NH_4OH) es óptimo para venlafaxina, mientras que, con fluvoxamina y fluoxetina, es mejor utilizar un disolvente acidificado (0.1% HCOOH). Finalmente, se estableció una etapa de lavado con agua Milli-Q.

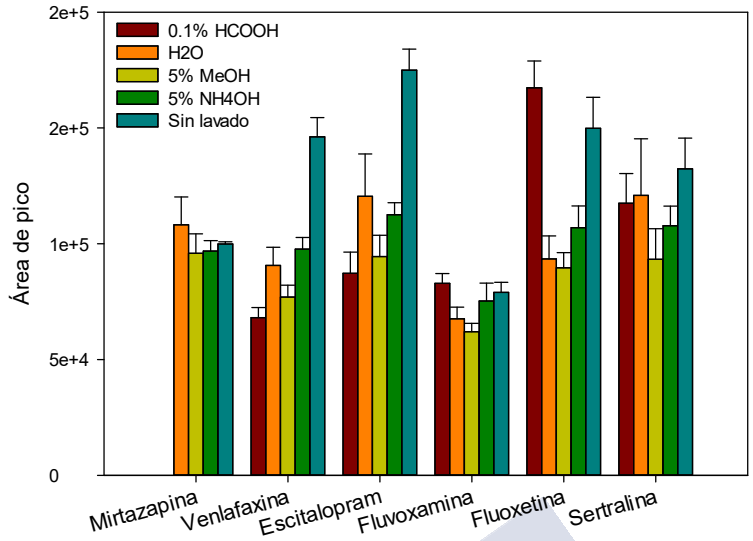


Figura 1.3. Disolventes de lavado en la extracción de ATD en muestras de orina (n=3).

Una vez que se seleccionaron los disolventes de elución y de lavado más adecuados, las condiciones del procedimiento MEPS se optimizaron mediante el uso de un diseño de experimentos.

1.3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño de *screening* asimétrico $2^2 3^3 4^1$//16 para examinar la influencia de otros factores del procedimiento MEPS. El objetivo principal de la utilización de esta herramienta quimiométrica era identificar los factores verdaderamente influyentes en el rendimiento de MEPS con un número de experimentos reducido [34, 35]. El diseño inicial permitió evaluar la influencia de seis variables en sólo 16 experimentos (dos factores a dos niveles cada uno, tres factores en tres niveles cada uno y un factor en cuatro niveles). Las variables consideradas fueron: volumen de muestra (100 o 300 µL), tiempo de secado (0.5 o 3 min), volumen de eluyente (50, 100 o 500 µL), número de *strokes* (2,4 o 8), tipo de fase (C_8, C_{18} o C_8+SCX) y pH (2, 4, 7 o 9), tal como se recoge en la **Tabla 1.1**.

Tabla 1.1. Parámetros de MEPS evaluados utilizando diseño de *screening* asimétrico.

Factor	Unidad	Nº niveles	Nivel
Volumen de muestra	µL	2	100 300
Tiempo de secado	min	2	0.5 3
Volumen de elución	µL	3	50 100 500

Tabla 1.1. Parámetros de MEPS evaluados utilizando diseño de *screening* asimétrico (*continuación*).

Factor	Unidad	Nº niveles	Nivel
Nº strokes		3	2 4 8
Fases		3	C_8 C_{18} C_8+SCX
pH		4	2 4 7 9

Los resultados se generaron y evaluaron utilizando el software estadístico *NemrodW*® [36]. Los gráficos de Pesos Delta y Efectos Totales proporcionaron información significativa para la interpretación de los resultados. De hecho, los gráficos de Pesos Delta permiten visualizar los efectos relativos de cada analito en la respuesta ante un cambio en una variable. La longitud de las barras es proporcional a la importancia del efecto. Si el efecto es positivo, la barra se dirige a la derecha; si es negativo, la barra se dirige hacia la izquierda. Las líneas verticales discontinuas representan límites de significación estadística. Si las barras exceden los límites, el cambio del factor es estadísticamente significativo sobre la respuesta considerada. Ninguno de los efectos mostró significancia estadística, pero en los gráficos de Efectos Totales se mostraron los efectos de todos los niveles de cada factor sobre la respuesta (la longitud de cada barra es proporcional al efecto en la respuesta). Se muestra como ejemplo los resultados obtenidos para fluvoxamina en la **Figura 1.4**. Aunque el volumen de elución (factor b_3) no ha sido estadísticamente significativo, la longitud de la barra en el gráfico de Pesos Delta es lo suficientemente grande como para entender que produce un efecto negativo importante sobre la respuesta cuando en lugar de utilizar 50 µL, se utiliza 500 µL. Paralelamente, en el gráfico de Efectos Totales se muestra una barra mucho mayor para este factor en el nivel de 50 µL, lo que se traduce en una mayor respuesta para ese nivel de ese factor.

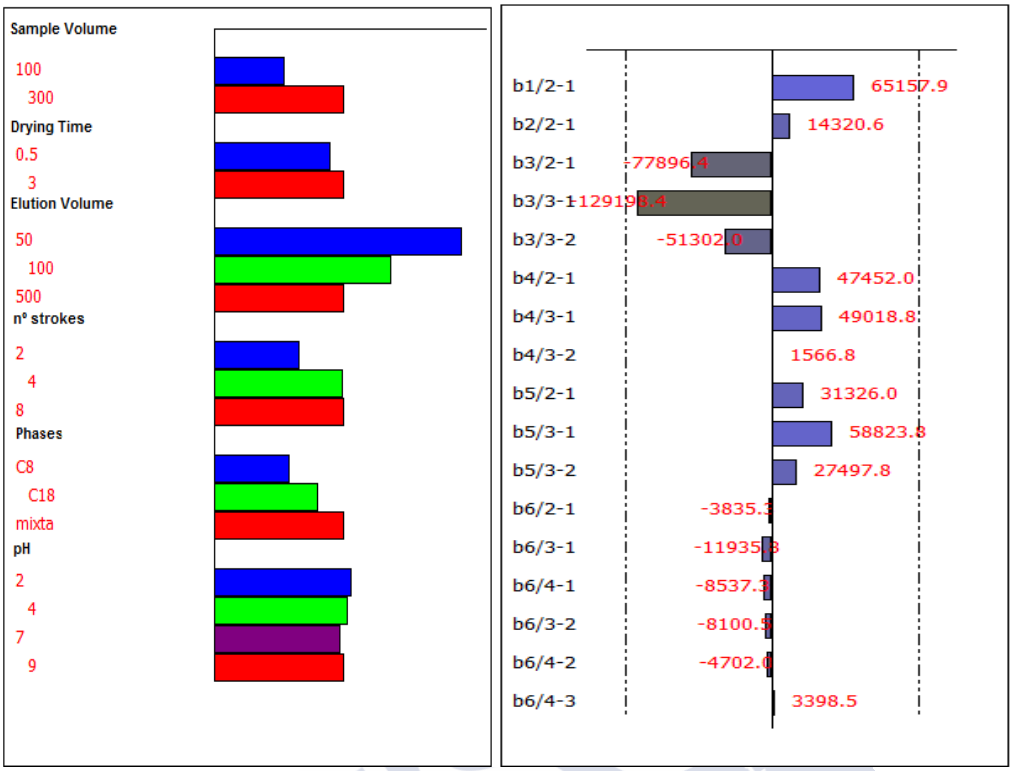


Figura 1.4. Gráficos de Pesos Delta (a) y Efectos Totales (b) para fluvoxamina.

En el caso de fluvoxamina, un volumen de muestra de 300 µL, un volumen de elución de 50 µL, una fase mixta (80% C_8- 20% SCX) y de 4 a 8 ciclos de extracción (*strokes*) serían las condiciones determinantes para obtener la mejor respuesta. El resto de los factores no parecen influyentes. De este modo, el diseño de *screening* permitió fijar ciertas condiciones que condujeron a la mejor extracción simultánea de los antidepresivos considerados: 300 µL de muestra, 50 µL de volumen de elución, una fase mixta (80% C_8- 20% SCX) y una etapa de secado de 0.5 min. Por razones prácticas, se utilizó el nivel más bajo del factor tiempo de secado (0.5 min) porque, aunque no era determinante, un tiempo de secado más largo (hasta 3 min) tuvo un impacto similar en la eficiencia de extracción. Sin embargo, los resultados en cuanto al número de ciclos de extracción (*strokes*) y el pH fueron ambiguos. A excepción de mirtazapina y fluoxetina, que se extrajeron de una manera más eficiente con un medio neutro a alcalino y ácido, respectivamente, todos los demás antidepresivos se extrajeron con una eficacia similar a cualquier pH. El mejor número de *strokes* fue cuatro para mirtazapina, venlafaxina y escitalopram, y ocho para fluoxetina, mientras que fluvoxamina y sertralina se extrajeron de manera similar y eficiente con cuatro y ocho *strokes*. Basándose en estos resultados, el pH y el número de *strokes* se establecieron a partir de un diseño de optimización de superficie de respuesta (diseño central compuesto) [34, 35].

El diseño central compuesto utilizado con un total de 11 experimentos, se construyó a partir de un diseño factorial completo más cuatro experimentos en posición axial a una distancia α=1.414 del centro del dominio y tres puntos centrales para estimar el error experimental y evaluar la precisión (**Tabla 1.2**). El software *NemrodW*® se utilizó para generar y evaluar el diseño. Se consideraron dos factores en cinco niveles diferentes cada uno (pH 2, 3, 6, 9 y 10, y un número de *strokes* de 2, 3, 6, 9 y 10). Los 11 experimentos

se realizaron en una secuencia aleatoria para evitar los posibles efectos de otras variables no incluidas en el diseño [36].

Tabla 1.2. Parámetros para la optimización de la preparación de muestra usando un diseño central compuesto.

Variables	Niveles				
	-α	-1	0	+1	+α
pH	2	3	6	9	10
Strokes	2	3	6	9	10

Los resultados del análisis se evaluaron utilizando el siguiente modelo polinomial de segundo orden en *NemrodW*®:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_{11} + b_{22}X_{22} + b_{12}X_1X_2$$

donde Y es la función de respuesta calculada (el área de pico obtenida por el análisis UHPLC-DAD de cada antidepresivo), y X_1 y X_2 representa los dos factores. El término constante b_0 es la respuesta media para todas las pruebas experimentales; b_1, b_2 y b_{12} son los coeficientes estimados para los efectos de los factores individuales y su interacción; y b_{11} y b_{22} son los coeficientes para los términos cuadráticos.

Los coeficientes anteriores se calcularon mediante regresión lineal y se validaron mediante análisis de varianza (**Tabla 1.3**). El número de *strokes* (b_1) fue estadísticamente significativo al nivel de confianza del 95% para fluvoxamina y fluoxetina, y también lo fue el pH (b_2) al nivel de confianza del 99% para mirtazapina, venlafaxina y escitalopram. La eficiencia de MEPS aumentó con un número de *strokes* elevado y la disminución del pH para fluvoxamina y fluoxetina. Sin embargo, la extracción de mirtazapina y escitalopram fue más favorable con un número bajo de *strokes* y un pH alto. Sertralina exhibió una doble dependencia: se extrajo eficientemente con un pH bajo y una gran cantidad de ciclos de extracción, pero también con un pH alto y un pequeño número de ciclos. En la **Figura 1.5** se observa el diferente efecto de los factores estudiados sobre dos antidepresivos, venlafaxina (**Figura 1.5a**) y sertralina (**Figura 1.5b**).

Tabla 1.3. Resultados ANOVA: significancia (%) de los coeficientes estimados para cada analito usando CCD.

Coefic.	Mirtazapina	Venlafaxina	Escitalopram	Fluvoxamina	Fluoxetina	Sertralina
b_0	**0.0246**	**0.197**	**0.481**	**0.0944**	**0.199**	**0.448**
b_1	32.1	23.4	20.7	**3.51**	**3.55**	19.6
b_2	**0.298**	**0.742**	**0.647**	56.9	95.9	17.1
b_{11}	11.3	**2.49**	**0.401**	**1.30**	**0.489**	**2.03**
b_{22}	57.8	12.9	**1.40**	23.0	29.5	16.6
b_{12}	**3.04**	39.1	**4.19**	6.2	8.9	13.3

Por esta razón, se utilizó un algoritmo basado en funciones de deseabilidad para buscar unas condiciones óptimas de compromiso sin experimentación adicional. La superficie de respuesta de deseabilidad global (ver **Figura 1.5c**) presenta dos zonas de condiciones aceptables correspondientes a la optimización numérica (zonas rojas en la gráfica): dos ciclos de extracción a pH 10 o diez ciclos a cualquier pH.

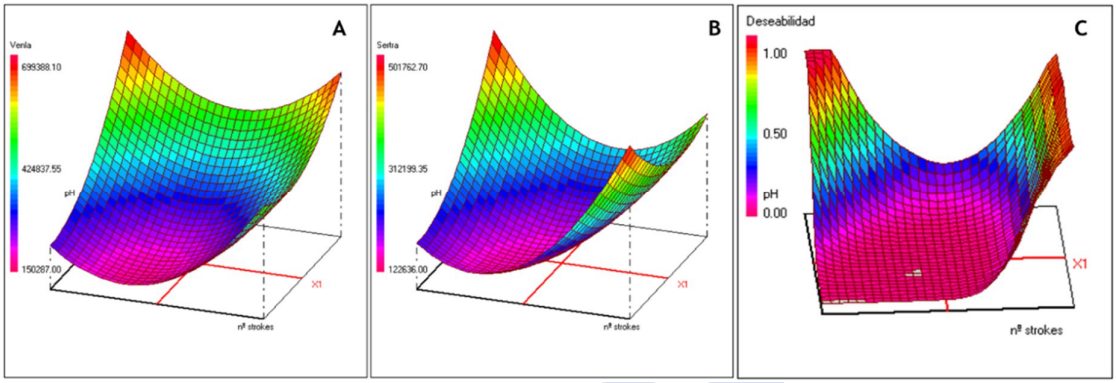


Figura 1.5. Superficie de respuesta para venlafaxina (A) y sertralina (B). Gráfico 3D de deseabilidad para muestras de orina (C).

Por lo tanto, se realizaron tres experimentos en las condiciones marcadas por esas dos zonas óptimas (pH neutro y 10 *strokes*, y pH 10 y 2 *strokes*). Según los resultados, los 10 ciclos de extracción a pH 7 proporcionaron mejores respuestas, tal como se muestra en la **Figura 1.6**. Los antidepresivos que tenían pKa> 9, se encuentran en la forma ionizada al pH de las muestras de orina (entorno a pH 6) y por lo tanto retenidos por el adsorbente mixto (80% C_8 + 20% SCX) a través de interacciones iónicas. Como excepción, mirtazapina (pKa 6.67) se ionizó sólo parcialmente y se retuvo a través de interacciones de fase inversa [37]. Las condiciones óptimas finales seleccionadas para el procedimiento MEPS fueron las siguientes: 300 µL de muestra, diez ciclos de extracción, pH 7, una fase mixta (80% C_8 + 20% SCX), 0.5 min de secado y 50 µL de MeOH como disolvente de elución.

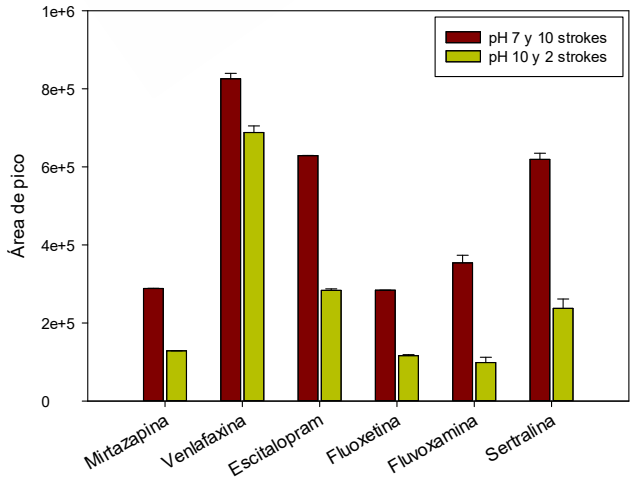


Figura 1.6. Estudio de las condiciones óptimas en los dos máximos obtenidos de las funciones de deseabilidad (n=3).

1.3.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO MEPS-UHPLC-DAD

Los antidepresivos se identificaron a partir de sus tiempos de retención y datos espectrales (**Tabla 1.4**). La técnica cromatográfica (UHPLC-DAD) resultó satisfactoriamente específica para los analitos, los cuales se separaron eficientemente de los componentes de la orina. Se analizó un blanco de orina sin analito para identificar los compuestos endógenos de la matriz, y el cromatograma resultante se comparó con los de las demás muestras de orina adicionadas con los antidepresivos. Como se puede ver en la **Figura 1.7**, no se observó interferencia o efecto memoria en el tiempo de retención. Por lo tanto, el método propuesto fue efectivo para el propósito previsto, extraer y determinar selectivamente los analitos. Además, el tiempo de análisis fue menor a 1.8 min.

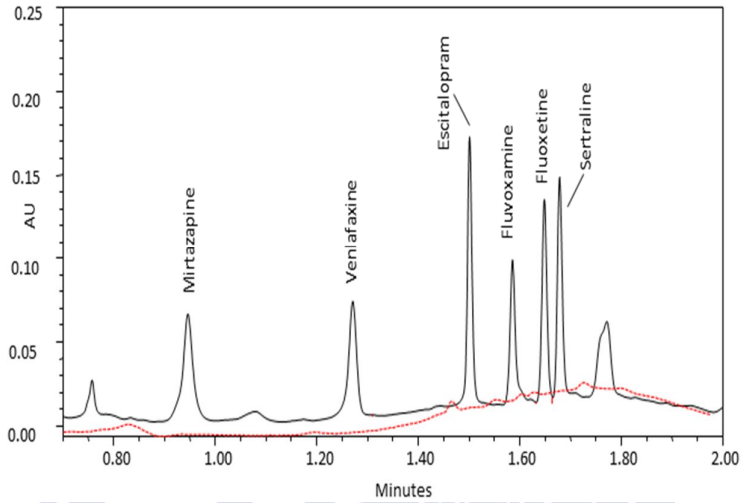


Figura 1.7. Cromatogramas MEPS-UPLC-PDA obtenidos de un blanco de orina (*línea punteada roja*) y orina adicionada con los antidepresivos a un nivel de concentración de 2 µg/mL.

La linealidad se evaluó a partir de curvas de calibración para Surine^{TM} o muestras de orina blanco (sin analitos) adicionadas con los analitos a concentraciones en el rango de 25-1000 ng/mL. Como se puede ver en la **Tabla 1.4**, la linealidad fue satisfactoria y los coeficientes de determinación oscilaron entre 0.993 y 0.997. La pendiente de una curva de calibración es una medida de sensibilidad de un método analítico. Por estos motivos, la sensibilidad más baja fue la de escitalopram y la más alta la de mirtazapina. Los LOD variaron de 0.5 ng/mL para fluoxetina a 7 ng/mL para sertralina, y LOQs de 1.5 ng/mL para fluoxetina a 21 ng/mL para sertralina. Sin embargo, todas las curvas de calibración se construyeron en el mismo rango de concentración aceptable para una matriz biológica como la orina. Existían escasos datos previos de determinación de estos analitos en orina. Por ejemplo, fluoxetina se determinó por MEPS-LC-UV con un LOD de 80 ng/mL, mayor que el obtenido en este trabajo [38]. Por el contrario, el LOD obtenido para mirtazapina (0.7 ng/mL) es similar al publicado por Rani *et al.* [39] utilizando un método también basado en MEPS-LC-UV en muestras de sangre y orina.

La precisión se evaluó en muestras QC de Surine^{TM} adicionadas con los antidepresivos a tres niveles de concentración diferentes. Como se puede observar en la **Tabla 1.4**, los %RSD nunca superaron el 15.1%, que es un valor aceptable en las guías de validación utilizadas, y similar a los suministrados en estudios que utilizan DLLME [20], MEPS [38] o microextracción en fase sólida dispersiva (D-µSPE) [40] en combinación con LC-UV, o SPME en combinación con LC-MS [41].

Como se puede ver en la **Tabla 1.5**, la exactitud del método propuesto también fue aceptable. Por lo tanto, las recuperaciones de analitos oscilaron entre 80 y 126% y fueron similares o mejores que otros publicados por otros autores [25, 38, 39, 42, 43]. Por ejemplo, las recuperaciones obtenidas son similares con las obtenidas por Rosado *et al*. [44] usando GC-MS después de SPE con un cartucho Strata^{TM} X, pero mejor que los de un método propuesto y publicado por Murtada *et al*. [45] y basado en nano partículas híbridas magnéticas como adsorbente para SPE, seguido de la separación de los ATD mediante electroforesis capilar (CE).

La presencia de efectos matriciales (EM) se verificó utilizando la siguiente ecuación [46]:

$$Efecto\ Matriz = \left(\frac{Pendiente\ Fase\ Móvil - Pendiente\ orina}{Pendiente\ Fase\ Móvil}\right) x\ 100$$

donde *Pendiente Fase Móvil* es la pendiente de la curva de calibración de patrón externo preparado en fase móvil y *Pendiente Orina* es la pendiente de la curva de calibrado de adición estándar para cada antidepresivo en orina. Un efecto matricial superior al 10% se considera sustancial. El efecto matriz varió de 29% para la mirtazapina a 77% para la sertralina (**Tabla 1.4**) y, por lo tanto, requirió la utilización de la calibración de adición estándar para la determinación simultánea de los analitos.

Tabla 1.4. Validación analítica del método MEPS-UHPLC-DAD en muestras de orina.

Compuesto	pKa	tR (min)	$\lambda_{máx}$ (nm)	Regresión lineal (25-1000 ng/mL)		R^2	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Precisión Intra-día RSD (%) (n=5)			Precisión Inter-día RSD (%) (n=6)			EM (%)
				Ordenada	Pendiente				A	B	C	A	B	C	
Mirtazapina	6.67	0.89	291.4	295	19062	0.993	0.7	2.1	5.2	5.5	4.7	9.5	15.1	8.8	29.4
Venlafaxina	8.91	1.23	224.0	1463	32856	0.993	4.6	13.8	8.4	7.5	8.7	8.7	8.4	7.3	73.9
Escitalopram	9.78	1.49	238.1	1670	49908	0.997	1.8	5.4	7.6	5.2	10.5	8.6	11.7	9.7	55.1
Fluvoxamina	8.86	1.58	251.1	86	19913	0.996	3.8	11.4	11.4	9.8	11.5	13.2	10.8	8.3	61.3
Fluoxetina	9.80	1.64	226.4	623	33757	0.997	0.5	1.5	9.8	14.1	12.8	9.8	9.4	9.4	73.7
Sertralina	9.85	1.67	365.1	1200	29688	0.996	7.0	21.0	6.8	9.4	10.7	6.4	7.8	10.2	77.3

A: QC Bajo (50 ng/mL); B: QC Intermedio (250 ng/mL); C: QC Alto (500 ng/mL), tR: Tiempo de Retención; R^2: Coeficiente de determinación; RSD: Desviación Relativa Estándar; LOD: Límite de Detección; LOQ: Límite de Cuantificación; EM: Efecto Matriz.

Tabla 1.5. Recuperaciones medias obtenidas para los seis antidepresivos mediante MEPS-UHPLC-DAD.

Compuesto	Recuperación Media (% ± SD) (n=4)		
	QC Bajo 50 ng/mL	QC Intermedio 250 ng/mL	QC Alto 500 ng/mL
Mirtazapina	92 ± 4	107 ± 5	98 ± 3
Venlafaxina	80 ± 5	102 ± 5	98 ± 9
Escitalopram	92 ± 8	112 ± 6	102 ± 11
Fluvoxamina	115 ± 2	95 ± 7	102 ± 11
Fluoxetina	126 ± 0	98 ± 13	104 ± 10
Sertralina	122 ± 6	93 ± 5	98 ± 15

SD: Desviación Estándar.

1.3.4. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES

El método propuesto MEPS-UHPLC-DAD fue validado para análisis toxicológicos forenses al aplicarlo a seis muestras de orina de voluntarios consumidores de antidepresivos o muestras de orina post-mortem, tratadas como se describe en la *sección 1.2.4*. Las muestras se analizaron por duplicado debido a la cantidad limitada de muestra disponible, excepto una de ellas. Según los resultados, dos muestras fueron negativas para los seis antidepresivos y cuatro fueron positivas para uno o más antidepresivos. Dos de las muestras positivas contenían venlafaxina en concentraciones de 0.405 ± 0.06 y 0.515 ± 0.05 µg/mL. El método propuesto permite que este antidepresivo se cuantifique en concentraciones por debajo de su nivel tóxico (20 µg/mL) y letal (50-125 µg/mL) en la orina, valores tabulados en Repetto *et al*. [47]. En la **Figura 1.8** se muestra el cromatograma correspondiente a la muestra positiva 1. Se determinó escitalopram en concentraciones de 0.108 a 0.623 ± 0.06 µg/mL en otras dos muestras. El método propuesto permitió determinar los analitos objeto de estudio en muestras reales, lo que demuestra su utilidad para los análisis toxicológicos forenses de rutina y el control de la dosis de antidepresivos.

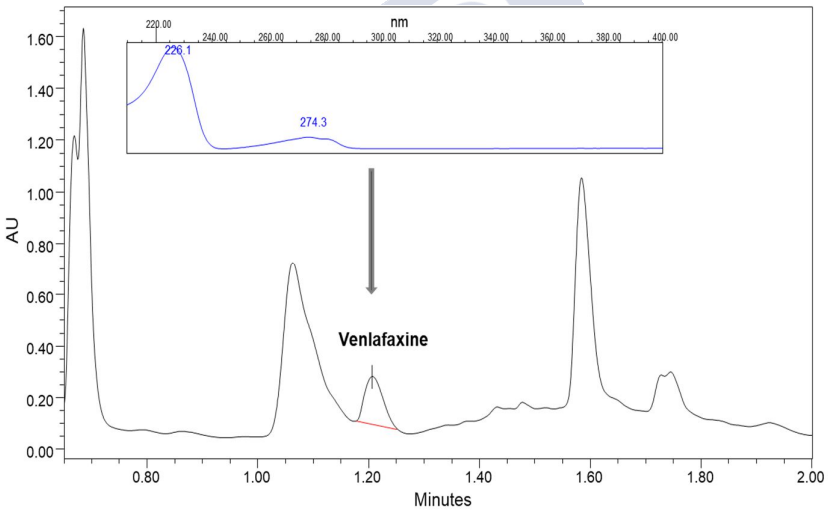


Figura 1.8. Cromatograma de una muestra de orina conteniendo 0.405 ± 0.06 µg/mL de venlafaxina (n=2).

1.4. CONCLUSIONES

En este trabajo, se utilizó un procedimiento selectivo de MEPS en combinación con UHPLC-DAD para desarrollar un método eficaz para la extracción y determinación de los antidepresivos mirtazapina, venlafaxina, escitalopram, fluvoxamina, fluoxetina y sertralina en muestras de orina humana. El uso de un adsorbente mixto (C_8 + SCX) en MEPS permitió determinar bajas concentraciones de antidepresivos en una matriz biológica de disponibilidad, a veces, limitada y tan compleja como la orina. El método propuesto utiliza un bajo volumen de muestra (300 µL de orina) y disolvente de elución (50 µL de metanol). Además, la extracción se realiza en un tiempo inferior a 15 minutos y el análisis cromatográfico en tan sólo 1.8 minutos. A diferencia de los cartuchos SPE convencionales que deben desecharse después de un solo uso, la fase MEPS se puede limpiar y acondicionar para reutilizar hasta 70 veces. El procedimiento MEPS se optimizó con dos diseños experimentales, y el método propuesto se validó de acuerdo con

las directrices internacionales, como FDA e ICH. La precisión fue excelente, y la recuperación y otros parámetros relacionados con la calidad fueron satisfactorios. El método propuesto se utilizó con éxito para cuantificar los analitos en muestras de orina de seis pacientes sometidos a tratamiento con antidepresivos. Según los resultados obtenidos, el método puede usarse para la determinación rutinaria de estos fármacos a concentraciones terapéuticas en muestras de orina. Además, podría adaptarse para el análisis de otras matrices biológicas como plasma o sangre.

1.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] World Health Organization. Mental Health Atlas 2014. WHO Library. 2015.

[2] Hammen, C., Risk Factors for Depression: An Autobiographical Review. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 2018, *14*, 1-28.

[3] Cohen, Z.D., DeRubeis, R.J., Treatment Selection in Depression. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 2018, *14*, 209-236.

[4] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Utilización de medicamentos antidepresivos en España durante el periodo 2000-2013. https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/informes.htm. Publication 14/01/2015 (acceso mayo 2021).

[5] Roemmelt, A.T., Steuer, A.E., Kraemer, T., Liquid chromatography, in combination with a quadrupole time-of- flight instrument, with sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra acquisition: validated quantification of 39 antidepressants in whole blood as part of a simultaneous screening and quantification procedure. *Anal. Chem.* 2015, *87*, 9294-9301.

[6] Park, S., Park, C-S., Lee, S.J., Cha, B., Cho, Y.A., Song, Y., Yu, E-a., Kim, G-S., Jin, J.S., Abd El-Aty, A.M., El-Banna, H.A., Hacimüftüoglu, A., Shim, J-H., Shin, S.C., Development and validation of a high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for simultaneous determination of bupropion, quetiapine and escitalopram in human plasma. *Biomed. Chromatogr.* 2015, *29*, 612-618.

[7] Petrides, A.K., Moskowitz, J., Johnson-Davis, K.L., Jannetto, P., Langman, L., Clarke, W., Marzinke, M., The development and validation of a turbulent flow-liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the simultaneous quantification of citalopram, sertraline, bupropion and hydroxybupropion in serum. *Clin. Biochem*. 2014, *47*, 73-79.

[8] Zare, F., Ghaedi, M., Daneshfar, A., Ionic-liquid-based surfactant-emulsified microextraction procedure accelerated by ultrasound radiation followed by high-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of antidepressant and antipsychotic drugs, *J. Sep. Sci*. 2015, *38*, 844-851.

[9] Alves, G., Rodrigues, M., Fortuna, A., Falcão, A., Queiroz, J., A critical review of microextraction by packed sorbent as a sample preparation approach in drug bioanalysis. *Bioanalysis* 2013, *5*, 1409–1442.

[10] Chambers, E.E., Woodcock, M.J., Wheaton, J.W., Pekol, T.M., Diehl, D.M., Systematic development of an UPLC–MS/MS method for the determination of tricyclic antidepressants in human urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014, *88*, 660-665.

[11] Zhang, L.Q., Wu, P.G., Jin, Q., Hu, Z.Y., Wang, J.L., Multi-residue analysis of sedative drugs in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2018, *1072,* 305–314.

[12] Pietracci, E., Bermejo, A.M., Álvarez, I., Cabarcos, P., Balduini, W., Tabernero, M.J., Simultaneous determination of new-generation antidepressants in plasma by gas chromatography–mass spectrometry. *Forensic. Toxicol.* 2013, *31*, 124-132.

[13] Papoutsis, I., Khraiwesh, A., Nikolaou, P., Pistos, C., Spiliopoulou, C., A fully validated method for the simultaneous determination of 11 antidepressants drugs in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Ana.l* 2012, *70*, 557-562.

[14] Nabil, A.A.A., Nouri, N., Farajzadeh, M.A., Determination of three antidepressants in urine using simultaneous derivatization and temperature-assisted dispersive liquid liquid microextraction followed by gas chromatography–flame ionization detection. *Biomed. Chromatogr*. 2015, *29*, 1094-1102.

[15] Seidi, S., Yamini, Y., Rezazadeh, M., Combination of electromembrane extraction with dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatographic analysis as a fast and sensitive technique for determination of tricyclic antidepressants. *J. Chromatogr. B* 2013, *913*, 138-146.

[16] Vlase, L., Imre, S., Leucuta, S., Determination of fluoxetine and its N-desmethyl metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Talanta* 2005, *66*, 659-663.

[17] Saracino, M.A., Mercolini, L., Flotta, G., Albers, L.J., Merli, R., Raggi, M.A., Simultaneous determination of fluvoxamine isomers and quetiapine in human plasma by means of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 2006, *843*, 227-233.

[18] Saber, A.L., On-line solid phase extraction coupled to capillary LC-ESI-MS for determination of fluoxetine in human blood plasma. *Talanta* 2009, *78*, 295-299.

[19] Ito, R., Ushiro, M., Takahashi, Y., Saito, K., Ookubo, T., Iwasaki, Y., Nakazama, H., Improvement and validation the method using dispersive liquid–liquid microextraction with in situ derivatization followed by gas chromatography–mass spectrometry for determination of tricyclic antidepressants in human urine samples. J. Chromatogr. B 2011, *879*, 3714-3720.

[20] Fernández, P., Taboada, V., Regenjo, M, Morales, L., Alvarez, I., Carro, A.M., Lorenzo, R.A., Optimization of ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction of six antidepressants in human plasma using experimental design. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016, *124*, 189-197.

[21] Wózniakiewicz, M., Wietecha-Posłuszny, R., Moos, A., Wieczorek, M., Knihnicki, P., Kóscielniak, P., Development of microextraction by packed sorbent for toxicological analysis of tricyclic antidepressant drugs in human oral fluid. *J. Chromatogr. A* 2014, *1337*, 9-16.

[22] Wietecha-Posluzny, R., Garbacik, A., Wozniakiewicz, M., Moos, A., Wieczorek, M., Koscielniak, P., Application of microextraction by packed sorbent to isolation of psychotropic drugs from human serum. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, *402*, 2249-2257.

[23] De Souza, I.D., Domingues, D.S., Queiroz, M.E.C., Hybrid silica monolithic for microextraction by packed sorbent to determine drugs from plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 2015,*140*, 166-175.

[24] Chaves, A.R., Leandro, F.Z., Carris, J.A., Queiroz, M.E.C., Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection. *J. Chromatogr. B* 2010, *878*, 2123–2129.

[25] Magalhães, P., Alves, G., Llerena, A., Falcão, A., Therapeutic Drug Monitoring of fluoxetine, norfluoxetine and paroxetine: A new tool based on microextraction by packed sorbent coupled to liquid chromatography. *J. Anal. Toxicol.* 2017, *41*, 631–638.

[26] Abdel-Rehim, M., Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial. *Anal. Chim. Acta* 2011, *701*, 119-128.

[27] Williams, J.R., The Declaration of Helsinki and Public Health". *Bull, World Health Organ*. 2008, *86*, 650–651.

[28] Fernández, P., González, M., Regenjo, M., Ares, A.M., Fernández, A.M., Lorenzo, R.A., Carro, A.M., Analysis of drugs of abuse in human plasma using microextraction by packed sorbent and ultra high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2017, *1485*, 8-19.

[29] Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2018 Silver Spring, Maryland. USA. http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm (acceso mayo 2021).

[30] ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva. Switzerland. 2005. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf (acceso mayo 2021).

[31] Yang, L., Said, R., Abdel-Rehim, M., Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review. *J. Chromatogr. B* 2017, *1043*, 33–43.

[32] Moein, M.M., Abdel-Rehim, A., Abdel-Rehim, M., Microextraction by packed sorbent (MEPS). *Trac-Trends Anal Chem* 2015, *67*, 34–44.

[33] Wietecha-Posłuszny, R., Garbacik, A., Woźniakiewicz, M., Moos A., Wieczorek M., Kościelniak P., Application of microextraction by packed sorbent to isolation of psychotropic drugs from human serum. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, *402*, 2249–2257.

[34] Lewis, G.A., Mathieu, D., Phan-Tan-Luu, R., Pharmaceutical Experimental Design. Marcel Dekker, New York. 1999.

[35] Ryan, T.P., Modern experimental design. 1st ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 2007.

[36] Mathieu, D., Noni, J., Phan-Tan-Luu, R. (2011). NemrodW®. Version 2011, LPRAI, Marseille. France.

[37] Simpson, N.J.K., Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications. 1st ed. CRC Press. New York. 2000.

[38] Alves, V., Gonçalves, J., Conceiçao, C., Teixeiram H.M., An improved analytical strategy combining microextraction by packed sorbent combined with ultra-high pressure liquid chromatography for the determination of fluoxetine, clomipramine and their active metabolites in human urine. *J. Chromatogr. A* 2015, *1408*, 30-40.

[39] Rani, S., Kumar, A., Malik, A.K., Singh, B., Quantification of tricyclic and nontricyclic antidepressants in spiked plasma and urine samples using microextraction in packed syringe and analysis by LC and GC-MS. *Chromatographia* 2011, *74*, 235–242.

[40] Asgharinezhad, A.A., Karami, S., Ebrahimzadeh, H., Shekari, N., Jalilian, N., Polypyrrole/magnetic nanoparticles composite as an efficient sorbent for dispersive micro-solid-phase extraction of antidepressant drugs from biological fluids. *Int. J. Pharm.* 2015, *494*, 102-112.

[41] Zheng, M.M., Wang, S.T., Hu, W.K., Feng, Y.Q., In-tube solid-phase microextraction based on hybrid silica monolith coupled to liquid chromatography–mass spectrometry for automated analysis of ten antidepressants in human urine and plasma. *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 7493–7501.

[42] Porto, C.E.D., Maia, P.P., de Freitas, D.F., Araujo, R.C.C., de Siqueira, M.E.P.B., Martins, I., dos Santos-Neto, A.J., Liquid-phase microextraction for simultaneous chromatographic analysis of three antidepressant drugs in plasma. *Quim. Nova* 2012, *35*, 72-76.

[43] Bagheri, H., Banihashemi, S., Zandian, F.K., Microextraction of antidepressant drugs into syringes packed with a nanocomposite consisting of polydopamine, silver nanoparticles and polypyrrole. *Microchim. Acta* 2016, *183*,195–202.

[44] Rosado, T., Gonçalves, A., Martinho, A., Alves, G., Duarte, A.P., Domingues, F., Silvestre, S., Granadeiro, L.B., Oliveira, V., Leitao, C., Gallardo, E., Simultaneous quantification of antidepressants and metabolites in urine and plasma samples by GC–MS for therapeutic drug monitoring. *Chromatographia* 2017, *80*, 301–328.

[45] Murtada, K., de Andrés, F., Ríos, A., Zougagh, M., Determination of antidepressants in human urine extracted by magnetic multiwalled carbon nanotube poly (styrene-co-divinylbenzene) composites and separation by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2018, *39*, 1808–1815.

[46] Peters, F.T., Remane, D., Aspects of matrix effects in applications of liquid chromatography–mass spectrometry to forensic and clinical toxicology—a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, *403*, 2155–2172.

[47] Repetto, M-R., Repetto, M., Tabla de concentraciones de xenobióticos en fluidos biológicos humanos como referencia para el diagnóstico toxicológico (versión 2015). In: "Ampliación de Toxicología de Postgrado 15", M. Repetto (ed.). CD-ROM. Ilustre Colegio Oficial de Químicos. Sevilla, 2015.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO II. DETERMINACIÓN DE BENZODIACEPINAS

Publicaciones relacionadas:

- Ana M. Ares-Fuentes[1], R.A. Lorenzo[1], P. Fernández[2], A.M. Carro[1], An analytical strategy for designer benzodiacepines and *Z*-hypnotics determination in plasma samples using ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry after microextraction by packed sorbent, *J. Pharma. Biomed. Anal.* 2021, *194*, 113779.

  Factor de impacto (2019): 3.209
  Cuartil (2019): Q2 (posición 26/86)
  Nº citas (Web of Science): 1
  Nº citas (SCOPUS): 1
  Nº citas Google Académico: 1
  PMID: 33279303
  DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113779

[1] *Departamento de Química Analítica, Facultad de Química e Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España.*

[2] *Instituto de Ciencias Forenses, Servicio de Toxicología Forense, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España.*

Declaración de contribución de autoría:

- A.M. Ares-Fuentes: Investigación, Validación, Análisis formal, Visualización, Escritura-borrador original.

Presentación a congresos relacionados con este capítulo:

Póster: "Experimental designs for the optimization of microextraction by packed sorbent (MEPS) of benzodiazepines in human plasma", 52nd EUROTOX, 4-7 septiembre 2016, Sevilla (España). Toxicology Letters 258 (2016) S123-S123.

Póster: "Determination of Z-Drugs in Human Plasma Using Microextraction by Packed Sorbent-Ultra Performance Liquid Chromatography", 19th International Symposium on Advances in Extraction Technologies (ExTech), 27-30 junio 2017, Santiago de Compostela (España).

Póster: "Aplicación de la Microextracción con Adsorbentes Empaquetados (MEPS) al análisis de sustancias psicotrópicas en matrices biológicas", XXI Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica (SEQA), 5-7 septiembre 2017, Valencia (España).

Póster: "Optimization of Microextraction by Packed Sorbent (MEPS) for new psychoactive substances and Z-drugs in human plasma samples by UPLC-MS/MS", XXIV Encontro Luso-Galego de Química, 21-23 noviembre 2018, Oporto (Portugal). ISBN 978-989-8124-24-1.

Póster: “Fast separation and quantification of designer benzodiazepines and Z-hypnotics in plasma using microextraction by packed sorbent (MEPS) and UPLC-MS/MS”, 14th XIV Reunión de la Sociedad Española de Farmacéutica y Tecnología Farmacéutica, 23-25 enero 2019, Santiago de Compostela (España).

B. DETERMINACIÓN DE BENZODIACEPINAS EN PLASMA

2.1. INTRODUCCIÓN

Las BZD son una clase de fármacos extensamente recetados en todo el mundo. Estos compuestos son utilizados como ansiolíticos, hipnóticos, anticonvulsivantes y relajantes musculares por su buena tolerancia y eficacia, especialmente a corto plazo. La primera benzodiacepina se sintetizó a finales de la década de 1950 y se comercializó a principios de la década de 1960. En la actualidad, se dispone de una gran cantidad de derivados de benzodiacepinas [1]. Las BZD están formadas por un núcleo común formado por un anillo de benceno y un anillo de diacepina unido en el carbono 5 a otro anillo de benceno, que puede ser reemplazado por otros heterociclos (**Tabla 2.1**). Las diferentes sustituciones en el anillo de las benzodiacepinas provocan cambios en el espectro y la potencia farmacológica, así como en las propiedades farmacocinéticas que influyen en la distribución y la duración del efecto [2, 3]. En la actulidad, el consumo no médico de BZD es un problema importante y apremiante a nivel mundial, junto al consumo de drogas de abuso. El uso crónico e indiscriminado puede conducir a la adicción y al síndrome de abstinencia cuando se suprime abruptamente. El uso indebido de BZD se ha asociado con uno de los grandes grupos de la población en general, como los ancianos y las mujeres. Por otro lado, debido a su amplia disponibilidad, las BZD son drogas médicas involucradas en casos de intoxicación detectados en Europa, junto con el alcohol, el cannabis y los opioides. Pueden causar somnolencia, depresión respiratoria, coma o incluso la muerte. Según la Red Europea por Drogas (Euro-DEN), las BZD se encuentran entre los compuestos más comúnmente relacionados con la ingesta y el registro de intoxicaciones en Europa [1, 2, 4]. Por estas razones, es importante desarrollar metodología rápida y sensible para la determinación de estos compuestos para su uso en controles toxicológicos forenses y clínicos.

La cromatografía líquida (LC) es la técnica de separación más utilizada para analizar benzodiacepinas en diferentes tipos de matriz (biológica y no biológica). Algunos detectores acoplados a LC incluyen, detector UV [5-13], DAD [14, 15] o MS [16-22]. Otra alternativa incluye la cromatografía de gases (GC) utilizando un detector de ionización de llama [23] o MS como sistema de detección [24, 25].

La preparación de la muestra es el paso más importante en un proceso analítico, ya que tiene un efecto directo sobre los resultados obtenidos. Las técnicas de extracción tradicionales incluían LLE [15] y SPE [5, 6, 18-21, 23, 24] para el aislamiento de BZD en muestras biológicas. También se aplicaron otros procedimientos de extracción no clásicos, como MAE [27]. En los últimos años se han desarrollado diferentes técnicas de microextracción siguiendo las tendencias de miniaturización, simplificación y automatización. En este contexto, algunas técnicas de microextracción incluyen: SPME [26], DLLME [5, 8, 11, 14, 17, 23], microextracción en fase líquida de fibra hueca (HF-LPME) [28] y MEPS [9, 11, 16]. La MEPS es una técnica miniaturizada basada en la SPE tradicional, desarrollada por Abdel-Rehim *et al*. en 2004 [29]. Como en SPE, MEPS combina los pasos de limpieza, concentración y extracción de muestras utilizando los mismos adsorbentes que SPE convencional. Sin embargo, MEPS usa menos cantidades de adsorbente, empaquetado directamente en un cartucho pequeño. Por lo tanto, los volúmenes de disolvente y muestra también se reducen considerablemente (de mililitros a microlitros). Además, la fase se puede reutilizar hasta varias veces dependiendo de la naturaleza de la muestra y se puede conectar en línea a GC o LC [29-31]. Este

procedimiento se ha utilizado para determinar diferentes fármacos, como drogas de abuso [32, 33], antidepresivos [34], anestésicos locales [35] o fármacos antiepilépticos [36, 37] en muestras biológicas.

En este trabajo se decribe la determinación simultánea de siete benzodiacepinas (alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam, lorazepam, lormetazepam y tetrazepam) en plasma humano utilizando MEPS y cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a un detector de red de diodos (UHPLC-DAD). Las condiciones de extracción se optimizaron utilizando un diseño de cribado (*screening*) asimétrico y un diseño de superficie de respuesta Doehlert combinado con funciones de deseabilidad. Los parámetros de calidad del método optimizado fueron evaluados, y finalmente se aplicó el método para determinar siete benzodiacepinas en muestras de plasma procedentes de individuos intoxicados.

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1. COMPUESTOS Y REACTIVOS.

Las disoluciones de los patrones comerciales de benzodiacepinas fueron obtenidas a Cerilliant® (Round Rock, TX, Estados Unidos). Los disolventes de grado HPLC acetonitrilo y metanol, cloroformo, 2-propanol, y los reactivos hidróxido sódico y dihidrógeno fosfato de potasio fueron adquiridos en Merck® (Darmstadt, Alemania). El agua ultrapura se consiguió mediante un sistema Milli-Q proporcionado por Millipore (Bedford, MA, Estados Unidos). Una jeringa digital e-Vol® XR (100 µL) empaquetada con el adsorbente y la aguja insertada (BIN) fueron comprados a SGE (Melbourne, Australia). Cada BIN contiene 4 mg de adsorbente estudiado (45 µm de tamaño de partícula y 60 Å de tamaño de poro): una fase octil-sílice (C_8), una fase octadecil-sílice (C_{18}) y una fase mixta (M_1) compuesta por 80% C_8 y 20% intercambiador catiónico fuerte (SCX).

Las disoluciones madre individuales de cada benzodiacepina fueron preparadas en metanol en concentraciónes de 1 y 0.1 mg/mL. Las disoluciones de trabajo que contenían todos los compuestos en concentraciones 1 y 10 µg/mL se prepararon a partir de diluciones sucesivas de las disoluciones madre. Para construir las curvas de calibrado y llevar a cabo la optimización del método, se prepararon mezclas de los patrones a partir de las disoluciones de trabajo en el rango de concentraciones de 0.01-10 µg/mL. Las muestras de control de calidad (QC) preparadas a partir de plasma humano libre de drogas se enriquecieron con tres concentraciones de las BZD diferentes: nivel bajo (0.02 µg/mL), nivel medio (0.2 µg/mL) y nivel alto (2 µg/mL). Todas las disoluciones de almacenaron a -20 °C.

2.2.2. MUESTRAS DE PLASMA

Para la calibración de adición estándar se prepararon patrones utilizando plasma libre de fármacos y drogas procedentes de excedentes del Centro de Transfusión de Galicia (Santiago de Compostela, España). Se obtuvieron muestras de plasma real de personas intoxicadas con BZD y otras drogas de abuso. Las muestras de sangre total real recibidas se centrifugaron a 4000 rpm (2836 *x g*) durante 10 min para obtener la fracción de plasma. Las muestras de plasma se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Todos los estudios se llevaron a cabo siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki [38].

2.2.3. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS CON MEPS.

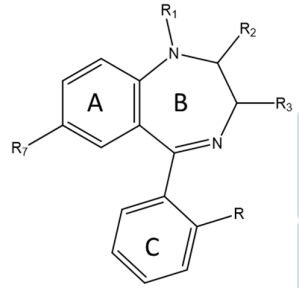
Antes de llevar a cabo el procedimiento de extracción, se adicionaron 200 µL de metanol a 300 µL de muestra de plasma para precipitar proteínas y otros componentes endógenos del plasma, y se centrifugó durante 5 min a 4000 rpm (2836 *x g*). Se tomaron 300 µL de sobrenadante y se añadieron 200 µL de tampón fosfato 0.05 M (pH 7) para modular la interacción entre los analitos y la fase adsorbente, mejorando así la sensibilidad.

El procedimiento de MEPS se realizó con una jeringa semiautomática eVol® cargada con una jeringa de 100 µL con un BIN que contenía 4 mg de adsorbente C_{18}. Primeramente, el adsorbente se acondicionó con 100 µL de metanol seguido de 100 µL de agua. Después, se aspiró una alícuota de 100 µL de la muestra de plasma enriquecida y se expulsó en el mismo vial. Esta operación se realizó en un total de ocho ciclos (volumen de muestreo total de 800 µL) para concentrar los analitos. La fase se secó con 100 µL de aire tres veces. Los compuestos se eluyeron directamente en un vial de LC con 50 µL de metanol. Finalmente, para aumentar la vida útil del adsorbente y evitar posibles efectos de arrastre, se lavó la fase cuatro veces con 100 µL de agua, seguidamente, otras cuatro veces con 100 µL de disolución de ácido fórmico (0.1%, v/v) y finalmente, cuatro veces más con 100 µL de metanol. Cada adsorbente se utilizó en más de 70 extracciones.

2.2.4. CONDICIONES DEL UHPLC-DAD

El análisis cromatográfico se realizó utilizando un sistema Waters® ACQUITY UPLC H-Class acoplado a un detector ACQUITY-PDA. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Waters ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (100 x 2.1 mm, 1.7 µm) termostatizada a 30 °C y con un flujo de 0.4 mL/min. Para dicha separación se utilizó un sistema de disolvente binario que constaba de acetonitrilo (A) y tampón fosfato 1 mM a pH 6 (B). Se empleó un programa de elución en gradiente: 0 min 34% A, 1.5 min 46% A, 2.23 min 60% A, 3.17 min 60% A, 4 min 40% A y 4.5 min 34% A. Una alícuota de 5 µL de la muestra se inyectó utilizando un muestreador automático. El detector PDA funcionó dentro de un rango de 190-800 nm, con una resolución óptica de 1.2 nm. Se eligió una longitud de onda de 230 nm para detectar los analitos y obtener la mejor sensibilidad. Los tiempos de retención, así como los espectros de absorbancia UV característicos para la absorbancia máxima de cada benzodiacepina, se utilizaron para confirmar la identidad de los compuestos estudiados. En la **Tabla 2.1** se presenta información de interés de las BZD estudiadas.

Tabla 2.1. Tiempos de retención (tR), pKa y niveles terapéutico y tóxico de las BZD estudiadas.



Estructura química de las BZD.

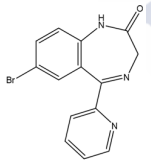
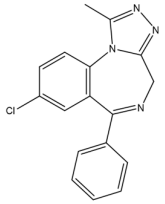
Compuesto	Estructura química	Nombre comercial [a]	tR (min)	pKa (25 °C) [b]	Nivel terapéutico Nivel tóxico (μg mL^{-1})
Bromazepam		Lexatin®	1.5	11.39 ± 0.70	0.08-0.26 0.3-0.4
Alprazolam		Trankimazin®	2.1	2.37 ± 0.40*	0.002-0.07 0.04-0.6

Tabla 2.1. Tiempos de retención (tR), pKa y niveles terapéutico y tóxico de las BZD estudiadas *(continuación)*.

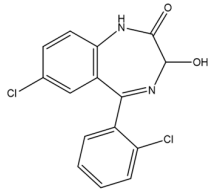
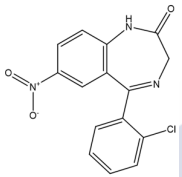
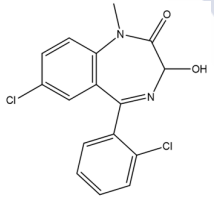
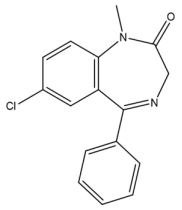
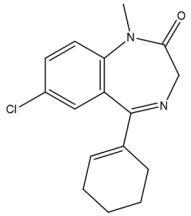
Compuesto	Estructura química	Nombre comercial [a]	tR (min)	pKa (25 °C) [b]	Nivel terapéutico Nivel tóxico (μg mL^{-1})
Lorazepam		Orfidal®	2.2	10.80 ± 0.70	0.01-0.2 0.3-0.6
Clonazepam		Rivotril®	2.4	11.21 ± 0.70	0.004-0.08 0.1-0.6
Lormetazepam		Loramet® Aldosomnil® Noctamid®	2.7	11.60 ± 0.40	0.001-0.025 -
Diazepam		Valium® Aneurol® Ansium® Stesolid® Tepazepan®	3.1	3.40 ± 0.10*	0.02-4 3-20

Tabla 2.1. Tiempos de retención (tR), pKa y niveles terapéutico y tóxico de las BZD estudiadas *(continuación)*.

Compuesto	Estructura química	Nombre comercial [a]	tR (min)	pKa (25 °C) [b]	Nivel terapéutico Nivel tóxico (μg mL^{-1})
Tetrazepam		Myolastan®	3.6	4.10 ± 0.10*	0.05-0.6 -

tR: tiempo de retención (min). a: nombres comerciales registrados por la Agencia Española de Medicamentos (AEMPS). b: *SciFinder® database* (CAS). * pKa (básico) de *SciFinder® database* (CAS).

2.2.5. VALIDACIÓN ANALÍTICA DEL MÉTODO

La validación del método propuesto se llevó a cabo de acuerdo con las guías internacionales, como FDA e ICH [39, 40]. Para ello, la metodología ha sido validada en términos de linealidad, límites de detección y cuantificación, selectividad, precisión intra- e inter-día, exactitud (recuperación) y efecto matriz.

Se construyó una curva de calibración para cada benzodiacepina utilizando muestras de plasma libre de fármaco, enriquecidas con disoluciones estándar en el rango de concentraciones entre 1 y 10 µg/mL para determinar la linealidad. El ensayo se realizó por triplicado para cada nivel de concentración. Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de cada benzodiacepina en plasma se establecieron como las concentraciones más bajas con relaciones señal-ruido de 3 y 10, respectivamente. La precisión se evaluó utilizando muestras QC a concentraciones bajas, medias y altas (0.02, 0.2 y 2 µg/mL) con cuatro replicados en el mismo día para determinar la precisión intra-día y con cuatro replicados diarios durante cinco días diferentes para la precisión inter-día. La precisión se expresó como desviación estándar relativa (%RSD). La exactitud, en términos de recuperación (%), se determinó utilizando las muestras QC seleccionadas por triplicado. El efecto matriz se estudió calculando la relación entre la pendiente de la curva de calibrado en la fase móvil (b_1) y la pendiente de la curva de calibrado de adición estándar para cada benzodiacepina en plasma (b_2) utilizando la siguiente ecuación:

$$efecto\ matriz = \left(\frac{b1-b2}{b1}\right)\ x\ 100$$

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN

Se evaluaron diferentes parámetros que afectan a la eficacia de extracción de las benzodiacepinas utilizando MEPS. Uno de los parámetros más importantes es la selección del tipo de fase, que es fundamental para retener los analitos durante el paso de muestra y obtener altas recuperaciones en MEPS. Otro parámetro importante en MEPS es el disolvente de elución, que debe tener la capacidad de desplazar los analitos del lecho adsorbente. Además, el ajuste del pH de la muestra tiene un papel importante en la extracción de compuestos ionizables. La etapa de secado de la fase mejora el rendimiento de la extracción al eliminar las trazas de disolvente de lavado de la fase. Finalmente, el número de ciclos de extracción (*strokes*) conduce a recuperaciones elevadas [30].

El estudio de todos estos parámetros influyentes utilizando el método de un factor de cada vez (*one-variable-at-a-time*, OVAT) supone un tiempo experimental excesivo. Por esta razón, se utilizó una herramienta quimiométrica, como el diseño experimental que permite el estudio de factores, para lograr la mejor efectividad y sensibilidad del procedimiento de extracción [41, 42]. Previamente, se llevó a cabo una prueba univariante para seleccionar el disolvente de elución apropiado.

4.1.1.1.OPTIMIZACIÓN DEL DISOLVENTE DE ELUCIÓN

El mejor disolvente de elución debe eluir la cantidad máxima de analito utilizando el volumen más pequeño de disolvente. Basándose en la experiencia previa del grupo con la técnica SPE, se han evaluado cinco tipos de disolventes o mezcla de ellos para la extracción de benzodiacepinas en plasma. Los disolventes estudiados fueron: acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH), mezcla de cloroformo/2-propanol (4:1, v/v), acetonitrilo/agua (34:66, v/v) y las condiciones iniciales de la fase móvil (agua/tampón fosfato 1 mM (pH

6), 34:66, v/v). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado utilizando 100 µL de cada disolvente de elución y una fase C_{18}. Los resultados obtenidos (**Figura 2.1**) mostraron que una mezcla formada por cloroformo/2-propanol (4:1, v/v) proporciona una mala recuperación para el bromazepam. Las mezclas de ACN/agua (34:66, v/v) y la fase móvil mostraron áreas bajas de pico cromatográfico en la extracción. Utilizando ACN y MeOH como eluyentes, se obtienen valores aceptables para todas las BZD. Sin embargo, los valores presentan mayor variabilidad para el ACN. En consecuencia, se eligió el metanol como el mejor disolvente de elución para los siguientes ensayos.

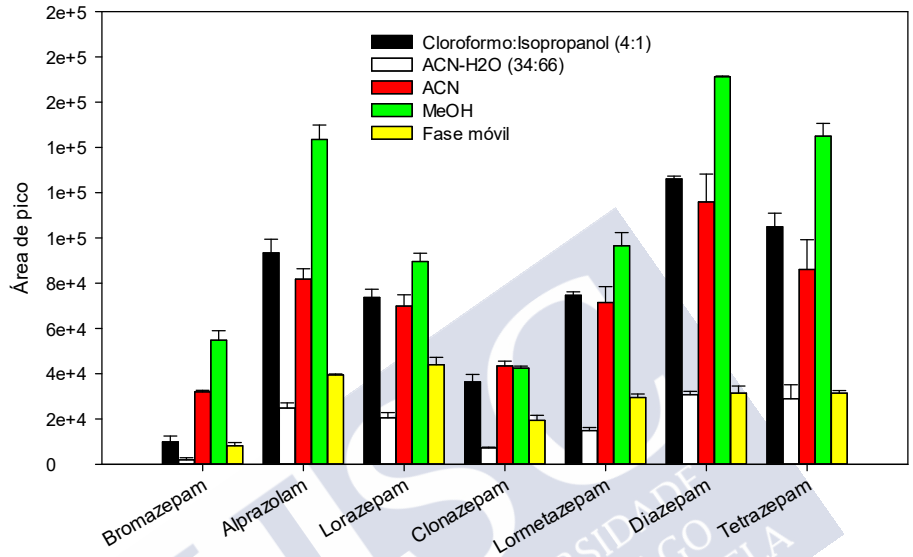


Figura 2.1. Estudio del disolvente de elución para las BZD en plasma (n=3).

4.1.1.2.DISEÑO EXPERIMETAL

Se evaluaron simultáneamente siete variables (volumen de muestra, tiempo de secado, volumen de lavado, volumen de elución, número de *strokes*, naturaleza de la fase y pH) en un diseño de cribado (*screening*) asimétrico para obtener las mejores condiciones operativas. Este tipo de diseño experimental permite el estudio de estos siete factores a diferentes niveles en solo dieciséis experimentos (**Tabla 2.2**).

Tabla 2.2. Dominio experimental del diseño de *screening* y estrategia experimental.

Factor	Nº de niveles	Niveles	Nº Exp	Orden aleatorio	Volumen de muestra (µL)	Tiempo de secado (min)	Volumen de lavado (µL)	Volumen de elución (µL)	Nº *strokes*	Fases	pH
Volumen de muestra (µL)	2	100	1	8	100	0.5	0	50	2	C_8	2
		300	2	12	100	0.5	0	100	4	C_{18}	6
Tiempo de secado (min)	2	0.5	3	9	100	0.5	0	500	8	M_1	8
		3	4	13	100	0.5	0	50	2	C_8	10
Volumen de lavado (µL)	2	0	5	16	300	0.5	100	50	4	M_1	10
		100	6	10	300	0.5	100	100	2	C_8	8
		50	7	4	300	0.5	100	500	2	C_8	6
Volumen de elución (µL)	3	100	8	11	300	0.5	100	50	8	C_{18}	2
		500	9	7	100	3	100	50	8	C_8	6
		2	10	14	100	3	100	100	2	M_1	2
Nº *strokes*	3	4	11	3	100	3	100	500	2	C_{18}	10
		8	12	5	100	3	100	50	4	C_8	8
		C8	13	2	300	3	0	50	2	C_{18}	8
Fases	3	C18	14	15	300	3	0	100	8	C_8	10
		M1	15	6	300	3	0	500	4	C_8	2
pH	4	2, 6, 8, 10	16	1	300	3	0	50	2	M_1	6

Los resultados se generaron y evaluaron mediante el programa informático *NemrodW*®. Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) presentan significación estadística ($\alpha<0.05$) para todas las benzodiacepinas, excepto para alprazolam. Los resultados se pueden interpretar gráficamente utilizando los gráficos Pesos Delta y Efectos Totales. Las longitudes de las barras en los gráficos de Pesos Delta son proporcionales a la magnitud relativa del efecto en la respuesta cuando la variable cambia de nivel. El efecto es negativo si las barras se disponen hacia la izquierda y es positiva cuando las barras se disponen hacia la derecha. Las líneas punteadas verticales representan los umbrales de significación estadística. El efecto es estadísticamente significativo si la barra de efectos sobrepasa la línea (para un nivel de confianza del 95%). La longitud de la barra en los gráficos de Efectos Totales es proporcional a la importancia del efecto de cada nivel del factor en la respuesta analítica. La **Figura 2.2** muestra como ejemplo estos gráficos para bromazepam.

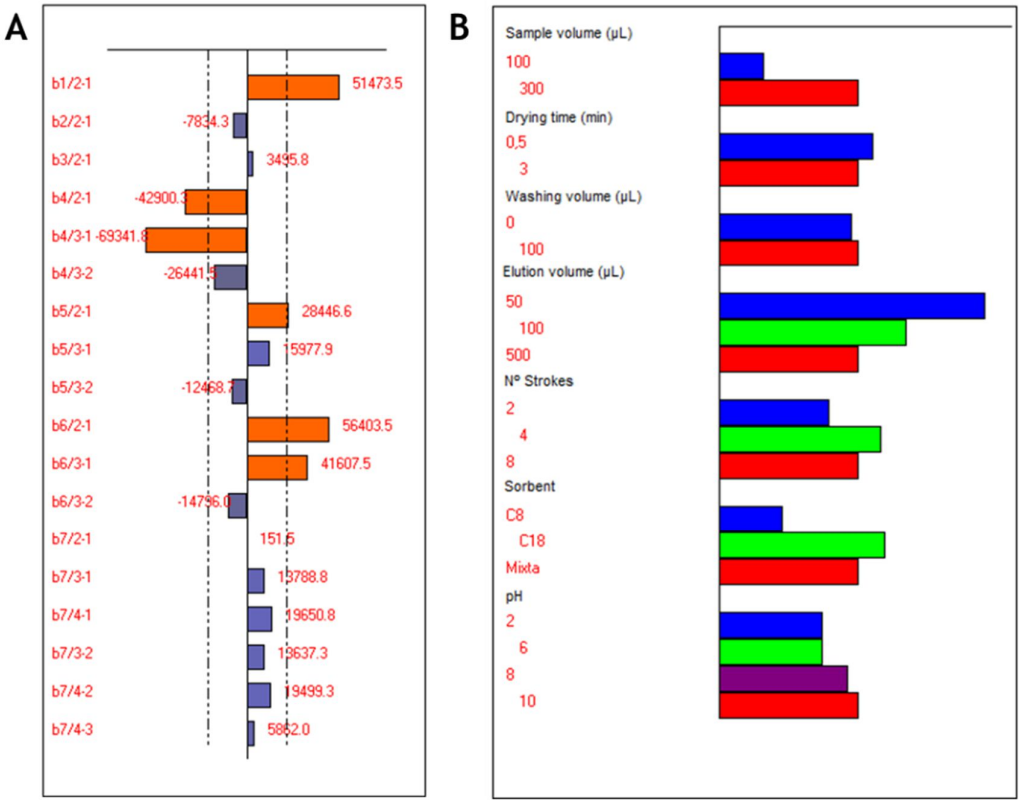


Figura 2.2. Gráficos Pesos Delta (A) y Efectos Totales (B) para bromazepam.

El tiempo de secado (b_2) y el volumen de disolvente de lavado (b_3) no fueron estadísticamente significativos para ninguna de las benzodiacepinas estudiadas. Por este motivo, se eligió un período de tiempo corto de 0.5 minutos para secar el adsorbente y se eliminó la etapa de lavado. El volumen de la muestra (b_1) y el volumen de elución (b_4) fueron estadísticamente significativos para todas las benzodiacepinas, excepto para alprazolam. Los mejores resultados de extracción se obtuvieron para un volumen de muestra alto (300 µL) y un volumen de elución bajo (50 µL). La naturaleza del adsorbente (b_6) fue estadísticamente significativa para bromazepam, lorazepam, clonazepam, lormetazepam, diazepam y tetrazepam. Los valores de extracción

presentaron un comportamiento similar para todos los compuestos cuando se utilizó una fase C_{18} o, en menor medida, una fase M_1 en lugar de la fase C_8. Por tanto, se utilizó una fase C_{18} para extraer estas benzodiacepinas en plasma. Sin embargo, el pH (b_7) y el número de *strokes* (b_5) tuvieron un comportamiento diferente en función de cada compuesto. Los ciclos fueron estadísticamente significativos para bromazepam, lormetazepam, diazepam y tetrazepam. Con cuatro ciclos de extracción fue suficiente para extraer bromazepam, mientras que para el resto de BZD fueron necesarios 8 *strokes*. El pH no fue estadísticamente significativo para ninguna benzodiacepina. Se observó un comportamiento dual a pH alto y bajo (pH 10 y 2) para casi todos los compuestos, excepto tetrazepam y bromacepam (preferiblemente un pH alcalino). Debido a los resultados de este diseño, se han podido fijar los siguientes factores: 300 µL de volumen de muestra, 0.5 min de tiempo de secado (3 x 100 µL de aire), sin etapa de lavado, un volumen de elución con MeOH de 50 µL y una fase C_{18}.

El pH y el número de ciclos se optimizaron simultáneamente mediante un diseño de superficie de respuesta (diseño *Doehlert*), estudiando los dos factores a 3 y 5 niveles, respectivamente, en 9 experimentos y tres puntos centrales. En ambos diseños, los experimentos se realizaron de forma aleatoria para evitar la influencia de factores no controlados (**Tabla 2.3**).

Tabla 2.3. Estrategia experimental para el diseño experimental Doehlert.

Experiencias	Orden aleatorio	Nº *strokes*	pH
1	6	8	6
2	4	2	6
3	7	7	10
4	9	4	2
5	3	7	2
6	8	4	10
7	5	5	6
8	2	5	6
9	1	5	6

Los resultados, analizados mediante el software estadístico *NemrodW*®, han permitido obtener los coeficientes del modelo polinomial cuadrático para cada BZD:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^{2} b_i x_i + \sum_{i=1}^{2} b_{ii} x_{ii}^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=1}^{2} b_{ij} x_i x_j$$

donde x_i es el factor e y es la respuesta obtenida para cada analito (área de pico). Los coeficientes polinomiales estimados se representan como: b_0 es el término de intersección, b_i es el efecto principal para cada parámetro, b_{ii} es el término cuadrático y

representa la curvatura de la superficie de respuesta, mientras que $b_{ij(i\neq j)}$ es es efecto de interacción entre factores *i* y *j*.

Los coeficientes estimados del modelo se calcularon mediante regresión lineal de mínimos cuadrados y fueron validados por ANOVA. La magnitud de los coeficientes indica que el número de *strokes* (b_1) fue estadísticamente significativo ($\alpha<0.05$) para todas las respuestas, excepto para clonazepam; mientras que el pH (b_2) fue solo estadísticamente significativo ($\alpha<0.05$) para alprazolam. Los efectos cuadráticos del pH (b_{22}) fueron estadísticamente significativos ($\alpha<0.05$) para alprazolam y diazepam, mientras que los efectos cuadráticos del número de strokes (b_{11}) y la interacción (b_{12}) no fueron estadísticamente significativos (**Tabla 2.4**).

Tabla 2.4. Coeficientes del modelo para el diseño Doehlert.

Coefic.	Bromazepam	Alprazolam	Lorazepam	Clonazepam	Lormetazepam	Diazepam	Tetrazepam
b_0	**0.0686**	**0.0162**	**0.0397**	**0.191**	**0.0398**	**< 0.01**	**0.0139**
b_1	**0.529**	**0.186**	**0.414**	3.50	**0.424**	**0.0383**	**0.178**
b_2	25.9	**1.60**	57.9	86.6	97.1	15.1	43.2
b_{11}	43.9	44.1	82.8	79.1	49.7	74.8	85.8
b_{22}	78.9	**3.47**	15.7	48.0	24.1	**3.52**	88.3
b_{12}	15.7	20.4	97.6	83.2	84.7	71.4	96.6

*Los valores en negrita fueron estadísticamente significativos.

La **Figura 2.3** muestra algunas superficies de respuesta proporcionadas por el modelo para tres benzodiacepinas. Las mejores respuestas se obtuvieron para un nivel alto de *strokes* para cada benzodiacepina, mientras que el valor del pH varió. Como se puede ver en la **Figura 2.3a**, se requiere un valor de pH bajo y un alto número de *strokes* para la extracción de bromazepam. Sin embargo, se necesitan valores altos de pH y *strokes* para obtener la mejor respuesta para alprazolam (**Figura 2.3b**), y cualquier pH sería adecuado para una buena extracción de tetrazepam utilizando un número alto de ciclos de extracción (**Figura 2.3c**). La estrategia de decisión multicriterio, utilizada para la optimización de estos dos factores hace uso de funciones de deseabilidad (basadas en funciones matemáticas Derringer). Sirven para obtener las condiciones óptimas para estos factores sin más experimentación. La función de deseabilidad asigna valores entre 0 (d_i=0, valor indeseable) y 1 (d_i=1, valor de respuesta ideal) para cada respuesta o extracción de cada analito (Y_i). Las funciones de deseabilidad individuales se combinan, utilizando la media geométrica para obtener la deseabilidad global (D). Las **Figuras 2.3d** y **2.3e** muestran la variación desde las zonas donde la deseabilidad global es cero hasta donde vale 1 (zona roja en el gráfico 3D) que corresponde al área con los valores óptimos (D=100%). La deseabilidad máxima se corresponde con valores óptimos de 8 *strokes* y un pH 7.

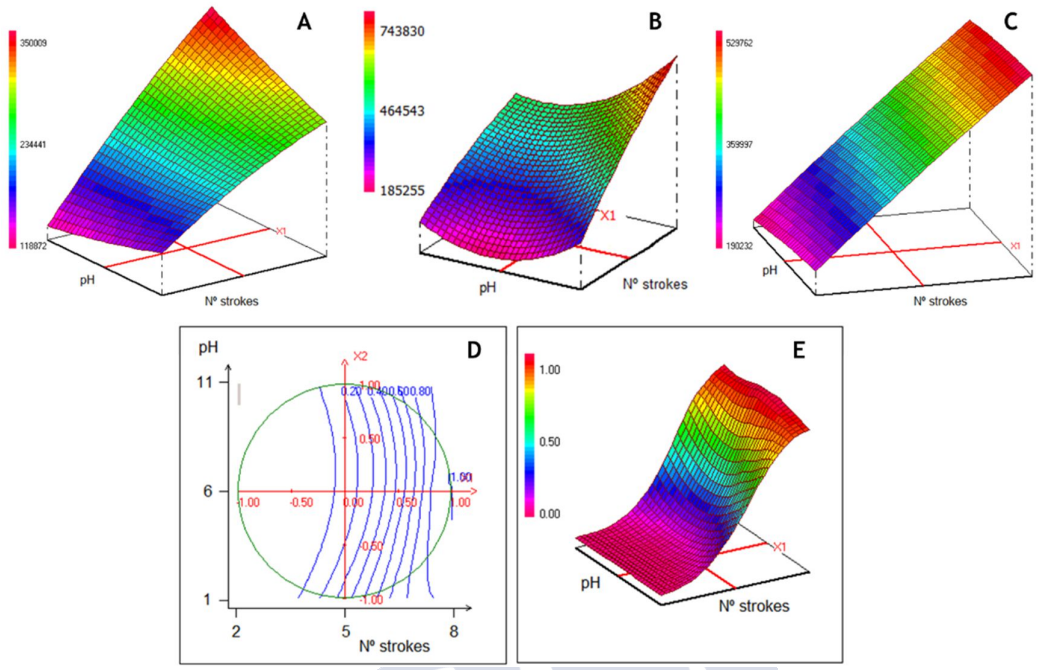


Figura 2.3. Gráficos de superficie de respuesta para bromazepam (A), alprazolam (B) y tetrazepam (C), y basadas en funciones de deseabilidad 2D (D) y 3D (E).

2.3.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

El método analítico propuesto se evaluó y validó siguiendo las directrices internacionales de FDA e ICH [16, 33], en términos de: selectividad, linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión intra- e inter-día, recuperación, y efecto matriz; utilizando muestras de plasma libre de fármacos, enriquecidas con disoluciones estándar de BZD. La selectividad se evaluó analizando seis muestras de plasma blanco procedentes de diferentes fuentes y comparando la respuesta con una muestra de plasma enriquecida a un nivel de 1 µg/mL. La **Figura 2.4** presenta un cromatograma de una muestra de plasma blanco y una muestra de plasma adicionado.

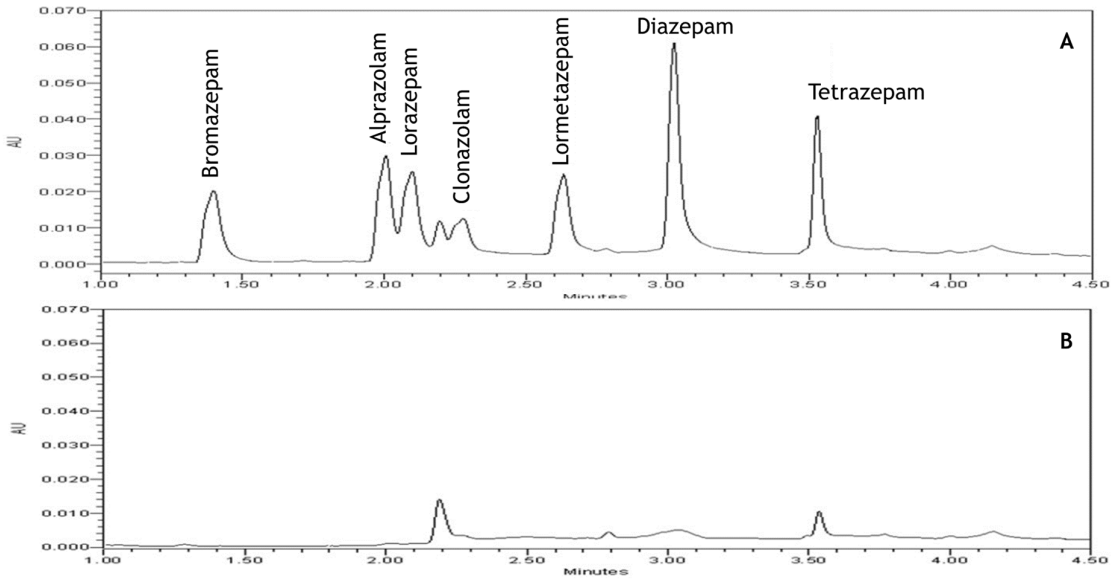


Figura 2.4. Cromatogramas de una muestra de plasma adicionada (1 µg/mL) (A) y una muestra de plasma blanco (B).

La linealidad se evaluó construyendo curvas de calibrado de adición estándar para cada analito a partir de muestras de plasma con adición en un rango de concentración de 0.01 a 10 µg/mL. Estas concentraciones cubren un amplio rango desde niveles terapéuticos hasta posibles niveles letales según Moffat *et al.* [43], Molina *et al.* [44] y Repetto *et al*. [45]. Cada nivel de concentración se inyectó por triplicado. Los valores de la ordenada en el origen, la pendiente y el coeficiente de determinación (R^2) se utilizaron para evaluar la linealidad. Para todas las BZD, las curvas de calibración fueron lineales en el rango descrito y los coeficientes de determinación fueron superiores a 0.994 (**Tabla 2.5**). Los valores de LOD variaron de 0.5 a 4.7 ng/mL y los LOQ variaron de 1.3 a 9.3 ng/mL. Los LOQ obtenidos fueron superiores a los encontrados por De Souza *et al*. [16], que utilizaron un adsorbente basado en monolito de sílice híbrido de cianopropilo sintetizado en un procedimiento MEPS-UHPLC-MS/MS. Sin embargo, los valores obtenidos en este trabajo están dentro del rango terapéutico para las BZD y fueron similares a los encontrados por otros autores después de realizar las etapas de precipitación de proteínas y dilución [17] o de emplear DLLME [22], combinadas con UHPLC-MS/MS para el análisis de BZD en muestras de sangre y orina. Además, los LOQ fueron ligeramente mejores que los encontrados en muestras de manchas de sangre seca [20] o en agua superficial [21] después de aplicar un método basado en SPE-UHPLC-MS/MS y en muestras de plasma después de utilizar microextracción líquido-líquido asistida por aire (AALLME)- LC-UV [12]. Por otro lado, los LOQ de este trabajo fueron más bajos que los valores publicados previamente para la determinación de BZD utilizando MEPS en bebidas [9, 11], DLLME en plasma [14], LLE en suero [15] o SPE en líquido pericárdico [24]. El efecto matriz para cada uno de los compuestos fue calculado mediante la ecuación de la *sección 2.2.5*. Se considera que existe un efecto matriz si el resultado es mayor del 10%. En la **Tabla 2.5** se recogen los valores obtenidos. Salvo bromazepam y clonazepam, el resto de benzodiacepinas estudiadas tienen un efecto matriz en mayor o menor grado, observándose un pronunciado efecto matriz para diazepam. La precisión intra- e inter-día se estudió a tres niveles mediante

replicados de cuatro análisis consecutivos el mismo día y cuatro análisis por día durante cinco días, respectivamente. Los resultados, expresados como %RSD, se muestran en la **Tabla 2.5**. Los valores de precisión intra-día variaron entre 3.4 y 12.2%, y los valores de precisión inter-día variaron entre 3.7 y 13%. Todos los resultados fueron inferiores al nivel de 15% recomendado en las guías de validación. La recuperación se evaluó a tres niveles de concentración (0.02, 0.2 y 2 μg/mL) por triplicado. Los valores oscilaron entre 64% y 116%, aproximándose al 100% de recuperación en la mayor parte de los casos (**Tabla 2.5**). Las recuperaciones están de acuerdo con los valores previamente publicados por Mashayekhi *et al*. [5], donde se utiliza una extracción doble (DLLME-SPE) para determinar las BZD en plasma y orina. Además, los valores de recuperación fueron superiores a los publicados por Magrini *et al.* [9] y Pergiovanni *et al*. [11] usando MEPS-LC-UV o por Fisichella *et al*. usando DLLME-LC-MS/MS [17].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2.5. Validación del método analítico.

Compuesto	Rango lineal (µg/mL)		R^2	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Efecto Matriz (%)	Precision (n=4)			Exactitud (n=3)
	Pendiente	Ordenada en el origen					Nivel (µg/mL)	Intra-día (%RSD)	Inter-día (%RSD)	% Recuperación ± SD
Bromazepam	93711	-7814	0.998	2.8	5.5	9.2	0.02	7.4	10.0	91 ± 15
							0.2	7.6	3.7	100 ± 7
							2.0	8.2	9.6	76 ± 6
Alprazolam	111095	6704	0.999	3.5	5.5	13.0	0.02	6.5	10.2	91 ± 11
							0.2	8.2	7.6	98 ± 12
							2.0	9.8	8.1	108 ± 8
Lorazepam	110003	102	0.999	0.5	1.3	12.2	0.02	8.9	10.7	66 ± 15
							0.2	6.4	7.1	82 ±4
							2.0	8.1	10.2	106 ±8
Clonazepam	51187	8056	0.994	4.7	9.2	8.0	0.02	8.4	11.8	100 ±17
							0.2	7.0	8.3	64 ± 9
							2.0	3.4	11.4	88 ± 3
Lormetazepam	104307	365	0.999	4.5	9.3	10.8	0.02	8.2	12.6	108 ±14
							0.2	9.6	13.0	116 ± 7
							2.0	10.2	10.2	115 ± 12
Diazepam	222001	-258	0.998	2.3	5.6	62.3	0.02	8.1	10.2	95 ± 8
							0.2	6.7	12.7	98 ± 6
							2.0	7.6	8.2	113 ± 9
Tetrazepam	104800	555	0.997	1.0	2.7	11.2	0.02	11.1	12.3	113 ± 7
							0.2	9.9	8.0	104 ± 8
							2.0	12.2	11.6	114 ± 14

2.3.3. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES

La aplicación del método validado (MEPS-UHPLC-DAD) se llevó a cabo en muestras de plasma obtenidas de consumidores de BZD en Galicia (España) (**Figura 2.5**). Se analizaron diecisiete muestras por duplicado, excepto aquellas para las que se disponía de una cantidad limitada. Siete muestras resultaron negativas para todas las benzodiacepinas estudiadas. Se detectaron BZD, pero no se cuantificaron en seis casos (<LOQ): lormetazepam (dos casos), lorazepam, diazepam (dos casos) y bromazepam. Se pudieron cuantificar cuatro casos: bromazepam (160 ng/mL), diazepam (12 ± 0.0015 ng/mL y 140 ng/mL), y alprazolam (180 ng/mL). Todas las BZD cuantificadas variaron en concentraciones terapéuticas, excepto para alprazolam que se encontró en el rango tóxico (**Tabla 2.1**) [43-45].

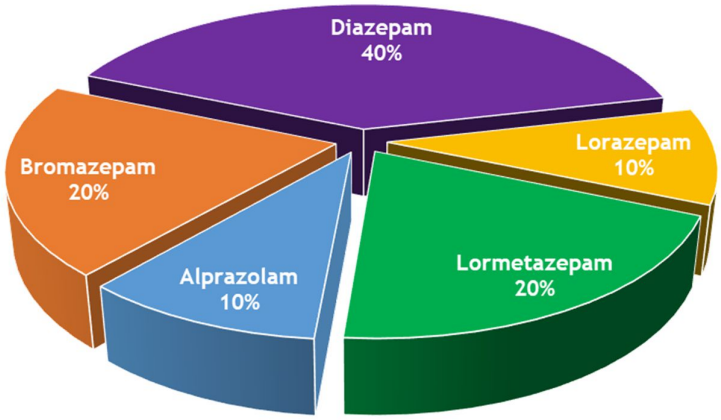


Figura 2.5. Porcentaje de casos positivos a BZD, detectadas en muestras reales de plasma.

2.4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método optimizado y validado de MEPS combinado con UHPLC-DAD para la extracción, determinación y cuantificación de BZD en muestras de plasma. Este procedimiento propuesto reduce la cantidad de muestra a utilizar (300 µL), el volumen de disolvente de elución (50 µL) y el tiempo total del procedimiento de extracción (menos de 15 minutos). La fase C_{18} se reutilizó más de 70 veces. El hecho de que se puedan utilizar volúmenes bajos de muestra y disolvente demuestra que MEPS puede considerarse una técnica rápida y respectuosa con el medio ambiente. Además, la utilización de diseño de experimentos ha permitido la optimización simultánea de los parámetros que afectan a MEPS, en un tiempo de optimización y análisis reducido. El método desarrollado se aplicó al análisis cuantitativo de muestras de plasma y es adecuado para análisis forenses, cuando se dispone de volúmenes de muestra bajos.

2.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] EMCDDA. The misuse of benzodiazepines among high-risk opioid users in Europe. En "Perspectives on Drugs" series (2018). https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2733/Misuse%20of%20benzos_POD2015.pdf (acceso mayo 2021).

[2] Persona K., Madej K., Knihnicki P., Piekoszewski W., Analytical methodologies for the determination of benzodiazepines in biological samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015, *113*, 239-264.

[3] Moshin N. A., Qadir M. I., Recent Structure Activity Relationship Studies of 1,4-Benzodiazepines, *Open J. Chem*. 2015, *1*, 008-0012.

[4] UNODC, Global Smart Update Volume 18, September 2017. https://www.unodc.org/documents/scientific/Global_SMART_Update_2017_Vol_18.pdf (acceso mayo 2021).

[5] Mashayekhi H. A., Khalilian F., Development of solid-phase extraction coupled with dispersive liquid-liquid microextraction method for the simultaneous determination of three benzodiazepines in human urine and plasma, *J. Chromatogr. Sci*. 2016, *54*, 1068-1073.

[6] Kuang H., Gan B., Guo L., Aguilar Z. P., Xu H., Determination of benzodiazepines in beef by magnetic solid phase extraction and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Letters* 2016, *49*, 499-510.

[7] Pebdani A. A., Khodadoust S., Talebianpoor M. S., Zargar H. R., Zarezade V., Preconcentration and determination of chlordiazepoxide and diazepam drugs using dispersive nanomaterial-ultrasound assisted microextraction method followed by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 2016, *1008*, 146-155.

[8] Farsimadan S., Goudarzi N., Chamjangali M. A., Bagherian G., Optimization of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets by experimental design methodologies for determination of three anti-anxiety drugs in human serum and urine samples by high performance liquid chromatography, *Microchem. J*. 2016, *128*, 47-54.

[9] Magrini L., Capiello A., Famiglini G., Palma P., Microextraction by packed sorbent (MEPS)-UHPLC-UV: A simple and efficient method for the determination of five benzodiazepines in an alcoholic beverage, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2016, *125*, 48-55.

[10] Goudarzi N., Amirnavaee M., Chamjangali M. A., Farsimadan S., Application of ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction based on solidification of floating organic droplets and high performance liquid chromatography for preconcentration and determination of alprazolam and chlordiazepoxide in human serum samples, *J. Chromatogr. Sci*. 2017, *55*, 669-675.

[11] Pergiovanni M., Cappiello A., Famiglini G., Termopoli V., Palma P., Determination of benzodiazepines in beverages using green extraction methods and capillary HPLC-UV detection, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2018, *154*, 492-500.

[12] Ghadi M., Hadjmohammadi M. R., Extraction and determination of three benzodiazepines in aqueous and biological samples by air-assisted liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography, *J. Iran Chem. Soc*. 2019, *16*, 1147-1155.

[13] Elmansi H., Belal F., Development of an eco-friendly HPLC method for the simultaneous determination of three benzodiazepines using green mobile phase, *Microchem. J*. 2019, *145*, 330-336.

[14] Fernández P., González C., Pena M. T., Carro A. M., Lorenzo R. A., A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples, *Anal. Chim. Acta* 2013, *767*, 88-96.

[15] Vosough M., Iravani N. J., Matrix-free analysis of selected benzodiazepines in human serum samples using alternating trilinear decomposition modeling of fast liquid chromatography diode array detection data, *Talanta* 2016, *148*, 454-462.

[16] De Souza I. D., Domingues D. S., Queiroz M. E. C., Hybrid silica monolith for microextraction by packed sorbent to determine drugs from plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* 2015, *140*, 166-175.

[17] Fisichella M., Odoardi S., Strano-Rossi S., High-throughput dispersive liquid/liquid microextraction (DLLME) method for the rapid determination of drugs of abuse, benzodiazepines and other psychotropic medications in blood samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and application to forensic cases, *Microchem. J*. 2015, *123*, 33-41.

[18] Zhang L., Wu P., Jin Q., Hu Z., Wang J., Multi-residue analysis of sedative drugs in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 2018, *1072*, 305-314.

[19] González-Mariño I., Castro V., Montes R., Rodil R., Lores A., Cela R., Quintana J. B., Multi-residue determination of psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs and related metabolites in wastewater by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 2018, *1569*, 91-100.

[20] Moretti M., Freni F., Tomaciello I., Vignali C., Groppi A., Visona S. D., Tajana L., Osculati A. M. M., Morini L., Determination of benzodiazepines in blood and in dried blood spots collected from post-mortem samples and evaluation of the stability over a three-month period, *Drug Test Anal*. 2019, *11*, 1403-1411.

[21] De Araujo F. G., Bauerfeldt G. F., Marqués M., Martins E. M., Development and validation of an analytical method for the detection and quantification of bromazepam, clonazepam and diazepam by UPLC-MS/MS in surface water, *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 2019, *103*, 362-366.

[22] Franco de Oliveira S. C. W. S. E., Zucoloto A. D., De Oliveira C. D. R., Hernandez E. M. M., Fruchtengarten L. V. G., De Oliveira T. F., Yonamine M., A fast and simple approach for the quantification of 40 illicit drugs, medicines, and pesticides in blood and urine samples by UHPLC-MS/MS, *J. Mass Spectrom*. 2019, *54*, 600-611.

[23] Ghobadi M., Yamini Y., Ebrahimpour B., SPE coupled with dispersive liquid-liquid microextraction followed by GC with flame ionization detection for the determination of ultra-trace amounts of benzodiazepines, *J. Sep. Sci*. 2014, *37*, 287-294.

[24] Alvarez-Freire I., Brunetti P., Cabarcos-Fernández P., Fernández-Liste A., Tabernero Duque M. J., Bermejo Barrera A. M., Determination of benzodiazepines in pericardial fluid by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2018, *159*, 45-52.

[25] Kusano M., Sakamoto Y., Natori Y., Miyagawa H., Tsuchihashi H., Ishii A., Zaitsu K., Development of "Quick-DB forensic": A total workflow from QuEChERs-dSPE method to GC-MS/MS quantification of forensically relevant drugs and pesticides in whole blood, *Forensic Sci. Int*. 2019, *300*, 125-135.

[26] Mirnaghi F. S., Monton M. R. N., Pawliszyn J., Thin-film octadecyl-silica glass coating for automated 96-blade solid-phase microextraction coupled with liquid

chromatography–tandem mass spectrometry for analysis of benzodiazepines, *J. Chromatogr. A* 2012, *1246*, 2-8.

[27] Wozniakiewicz A., Wietecha-Pósłuszny R., Wozniakiewicz M., Nowak J., Koscielniak P., Development of the MAE/UHPLC-MS-TOF method for determination of benzodiazepines in human biofluids for toxicological analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015, *108*, 97-101.

[28] De Bairros A. V., De Almeida R. M., Pantaleão L., Barcellos T., Moura e Silva S., Yonamine M., Determination of low levels of benzodiazepines and their metabolites in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction (LPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), *J. Chromatogr. B* 2015, *975*, 24-33.

[29] Abdel-Rehim M., Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial, *Anal. Chim. Acta* 2011, *701*, 119-128.

[30] Moein M. M., Abdel-Rehim A., Abdel-Rehim M., Microextraction by packed sorbent (MEPS), *Trends Anal. Chem*. 2015, *67*, 34-44.

[31] Pereira J. A. M., Gonçalves J., Porto-Figueira P., Figueira J. A., Alves V., Perestrelo R., Medina S., Câmara J. S., Current trends on microextraction by packed sorbent-fundamentals, application field, innovative improvements and future applications, *Analyst* 2019, *144*, 5048-5074.

[32] Fernández P., González M., Regenjo M., Ares A. M., Fernández A. M., Lorenzo R. A., Carro A. M., Analysis of drugs of abuse in human plasma using microextraction by packed sorbent and ultra-high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 2017, *1485*, 8-19.

[33] Ares A. M., Fernández P., Regenjo M., Fernández A. M., Carro A. M., Lorenzo R. A., A fast bioanalytical method based on microextraction by packed sorbent and UPLC-MS/MS for determining new psychoactive substances in oral fluid, *Talanta* 2017, *172*, 454-461.

[34] Ares-Fuentes A. M., Fernández P., Fernández A. M., Carro A. M., Lorenzo R. A., Microextraction by packed sorbent followed by ultra high performance liquid chromatography for the fast extraction and determination of six antidepressants in urine, *J. Sep. Sci*. 2019, *42*, 2053-2061.

[35] Daryanavard S. M., Jeppsson-Dadouna A., Andersson A., Hashemib M., Colmsjöa A., Abdel-Rehim M., Molecularly imprinted polymer in microextraction by packed sorbent for the simultaneous determination of local anesthetics: lidocaine, ropivacaine, mepivacaine and bupivacaine in plasma and urine samples, *Biomed. Chromatogr*. 2013, *27*, 1481-1488.

[36] Rani S., Malik A. K., A novel microextraction by packed sorbent–gas chromatography procedure for the simultaneous analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine, *J. Sep. Sci*. 2012, *35*, 2970-2977.

[37] Rani S., Malik A. K., Singh B., Novel micro-extraction by packed sorbent procedure for the liquid chromatographic analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine, *J. Sep. Sci*. 2012, *35*, 359-366.

[38] Williams J. R., The Declaration of Helsinki and Public Health, *Bull. World Health Organ*. 2008, *86*, 650-652.

[39] Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2018 Silver Spring, Maryland. USA. https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf (acceso mayo 2021).

[40] ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva. Switzerland. 2005. https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1__Guideline.pdf (acceso mayo 2021).

[41] Lewis G.A., Mathieu D., Phan-Tan-Lu R., Pharmaceutical experimental Design. Marcel Dekker, New York. 1999.

[42] Ryan T.P., in Modern experimental design. 1st ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 2007.

[43] Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B., Watts J. (Eds.), Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material., 4th ed., Pharmaceutical Press, London. 2011.

[44] Molina D.K., Handbook of Forensic Toxicology for Medical Examiners. Taylor and Francis Group, USA. 2010.

[45] Repetto M.R., Repetto M., Tabla de concentraciones de xenobióticos en fluidos biológicos humanos como referencia para el diagnóstico toxicológico (versión 2015). en: M. Repetto (Ed), Ampliación de Toxicología de Postgrado 15, CD-ROM, Ilustre Colegio Oficial de Químicos. Sevilla. 2015.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

C. DETERMINACIÓN DE NUEVAS BENZODIACEPINAS E HIPNÓTICOS Z EN PLASMA.

3.1. INTRODUCCIÓN

Según el Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías [1], el uso de una subclase de nuevas sustancias psicoactivas (NSP) conocidas como "benzodiacepinas de diseño" (DBZD) ha crecido de forma constante en los últimos años con la llegada de las ventas *on-line* [1-4]. El OEDT supervisa actualmente 28 nuevas DBZD. En 2017 se notificaron a la Unión Europea cerca de 3500 incautaciones de nuevas benzodiacepinas [1]. En 2016 se incautaron más de medio millón de comprimidos que contenían nuevas benzodiacepinas como diclazepam, etizolam, flubromazolam, flunitrazolam y fonazepam, casi dos tercios de la cantidad notificada en 2015 [2]. Además, algunas DBZD (por ejemplo, clonazolam, meclonazepam, flubromazolam, descloroetizolam y nifoxipam) han sido supervisados en el marco del proyecto *STRIDA* para obtener información sobre intoxicaciones relacionadas con NSP [5].

Los hipnóticos *Z* (zolpidem, zaleplon y zopiclone) se desarrollaron como alternativas a las benzodiacepinas; aunque son estructuralmente diferentes, su mecanismo de acción es similar al de BZD e implica potenciar la acción del neurotransmisor GABA [6]. Los fármacos *Z* se usan para tratar el insomnio con reducidos efectos ansiolíticos y anticonvulsivos. El consumo de hipnóticos *Z* está aumentando en todo el mundo, y el zolpidem es el fámaco *Z* más consumido en el mundo. Estos compuestos se encuentran en combinación con otros tipos de drogas de abuso y fármacos en muchos casos de intoxicación [4, 7, 8]. Su uso recurrente a largo plazo puede provocar dependencia física y psicológica.

La aparición de DBZD en el mercado, el uso combinado con cannabinoides u opioides sintéticos y la creciente automedicación con tranquilizantes y sedantes, ha planteado la necesidad de metodologías eficaces para su determinación y confirmación [4]. Debido a la falta de conocimiento sobre las propiedades farmacocinéticas, el metabolismo y la detectabilidad de las NSP, se desarrollaron métodos sensibles para la monitorización del uso de fármacos, como la cromatografía líquida y la espectrometría de masas. Por lo tanto, actualmente los métodos basados en cromatografía líquida-espectrometría de masas [9-18] superan en número a los métodos de cromatografía de gases-espectrometría de masas [19-21] para determinar DBZD y compuestos relacionados en muestras biológicas. Así, se desarrollaron diferentes estudios de metabolismo para la detección por LC-MS/MS. El Balki *et al*. [12] desarrollaron un método para caracterizar e identificar metabolitos de ocho DBZD mediante UHPLC-MS/MS. Meyer *et al*. [13] identificaron los principales metabolitos de clonazolam, meclonazepam y nifoxipam en muestras de orina mediante nano-LC-MS. Se utilizó LC-HRMS para llevar a cabo un estudio completo del metabolismo del flubromazolam en células hepáticas y la confirmación en muestras de orina humana [22]. Se han detectado algunas DBZD en sangre y orina utilizando ensayos de detección inmunoquímica, pero estos métodos necesitan confirmación mediante técnicas cromatográficas con espectrometría de masas [23]. Además, el uso de una técnica de preparación de muestra adecuada es esencial para extraer de manera eficiente la amplia gama de DBZD que se pueden encontrar en diferentes matrices biológicas y no biológicas. Las técnicas más comúnmente utilizadas para este propósito son la extracción líquido-líquido [9-11, 24-26] y la extracción en fase sólida [12, 19, 27-29]. Recientemente, ha surgido una nueva tendencia para preparar muestras de acuerdo con los principios de la Química Verde [30]

que ha llevado a la miniaturización y automatización de los procedimientos de extracción existentes [31]. La microextracción con adsorbentes empaquetados, que es la versión miniaturizada de SPE, fue desarrollada por Abdel-Rehim *et al*. en 2004 [31]. Esta técnica sigue los mismos principios que la SPE, pero utiliza cantidades mucho menores de muestra y disolvente, resultando una extracción más rápida y económica. Además, la fase adsorbente se puede reutilizar en sucesivas extracciones. La técnica MEPS se ha utilizado para extraer una amplia variedad de compuestos de diferentes matrices [32, 33], incluidas drogas de abuso en plasma [34] y fluido oral [35]; benzodiacepinas en bebidas alcohólicas; antidepresivos en plasma y orina; anfetaminas en orina y fármacos antiinflamatorios y fluoroquinolonas en plasma y orina humana [36, 37].

La identificación y cuantificación de DBZD e hipnóticos *Z* es una tarea importante en el campo de la toxicología clínica y forense debido a su presencia en el mercado de las drogas recreativas. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método rápido, sensible y selectivo utilizando MEPS y cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) para la determinación simúltanea de cinco DBZD (clonazolam, descloroetizolam, nifoxipam, flubromazolam y meclonazepam) y tres hipnóticos *Z* (zolpidem, zaleplon y zopiclone) en muestras de plasma. Estos compuestos fueron seleccionados entre las numerosas NSP para verificar la metodología propuesta y, no se han publicado estudios previos utilizando MEPS con un adsorbente polimérico para extraer este tipo de analitos (DBZD e hipnóticos *Z*) en muestras forenses.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. COMPUESTOS Y REACTIVOS

Los patrones de las DBZD (clonazolam, nifoxipam, flubromazolam, descloroetizolam y meclonazepam) fueron adquiridos en Chiron AS (Stiklestadveien, Trondheim, Noruega), mientras los hipnóticos *Z* (zolpidem, zopiclone y zaleplon), y su patrón interno (IS), zolpidem-d6, fueron obtenidos en Cerillant (Round Rock, TX, Estados Unidos). Todos estos patrones se presentan como disoluciones conteniendo una concentración de 1 mg/mL de cada compuesto (100 µg/mL de IS) en MeOH, excepto zopiclone, que fue suministrado en acetonitrilo. Las estructuras químicas y propiedades de estos compuestos se muestran en la **Tabla 3.1**. Metanol, acetonitrilo, diclorometano (DCM), 2-propanol (IPA), ácido fórmico, ácido acético, dihidrógeno fosfato potásico e hidróxido de amonio se adquirieron en Merck® (Darmstadt, Alemania). Todos los disolventes fueron de grado gradiente, y el agua ultrapura fue obtenido por un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, Estados Unidos). Los analitos se extrajeron usando una jeringa analítica digital eVol® XR (100 µL) empaquetada con tres materiales adsorbentes diferentes procedentes de SGE Analytical Science (SGE Europe, Ltd., Chester, Reino Unido): un adsorbente de modo mixto que consta de 80% de C_8 y 20% intercambiador fuerte de cationes (SCX); una fase octil-sílice (C_8), una fase octadecíl-sílice (C_{18}) y un material polimérico HyperSep Retain PEP de Thermo Fisher™ Scientific (Waltham, MA, Estados Unidos). También se utilizó una centrífuga Minicen de Orto Alresa (Ajavir, Madrid, España).

Tabla 3.1. Propiedades físico-químicas de los compuestos estudiados.

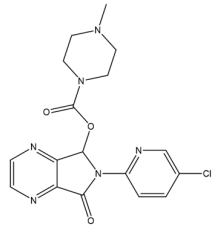
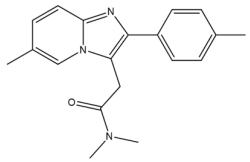
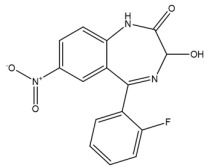
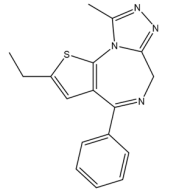
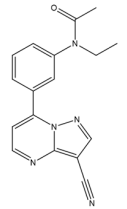
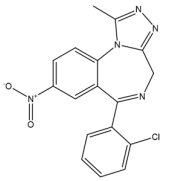
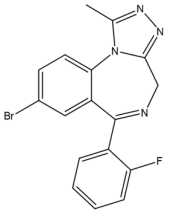
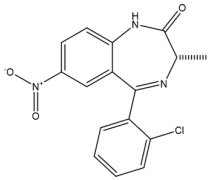
Compuesto	Número CAS	Fórmula Molecular	Peso Molecular (g/mol)	pKa(25ºC)*	log K_{ow} (25ºC)*	Estructura Química
Zopiclone	43200-80-2	$C_{17}H_{17}ClN_6O_3$	388.81	6.70±0.10	2.713±0.847	
Zolpidem	82626-48-0	$C_{19}H_{21}N_3O$	307.39	6.77±0.50	3.089±0.594	
Nifoxipam	74723-10-7	$C_{15}H_{10}FN_3O_4$	315.26	10.38±0.70	1.616±0.882	
Descloroetizolam	40054-73-7	$C_{17}H_{16}N_4S$	308.40	2.45±0.40	2.033±1.420	

Tabla 3.1. Propiedades físico-químicas de los compuestos estudiados *(continuación)*.

Compuesto	Número CAS	Fórmula Molecular	Peso Molecular (g/mol)	pKa(25ºC)*	log K_{ow} (25ºC)*	Estructura Química
Zaleplon	151319-34-5	$C_{17}H_{15}N_5O$	305.33	-1.47±0.50	1.403±0.869	
Clonazolam	33887-02-4	$C_{17}H_{12}ClN_5O_2$	353.76	1.88±0.40	0.927±1.323	
Flubromazolam	612526-40-6	$C_{17}H_{12}BrFN_4$	371.21	2.27±0.40	1.682±1.130	
Meclonazepam	58662-84-3	$C_{16}H_{12}ClN_3O_3$	329.74	11.24±0.70	3.057±0.881	

*Valor proporcionado por *SciFinder® database* (CAS).

Se prepararon disoluciones estándar individuales de los compuestos, excepto del IS, a una concentración de 100 µg/mL mediante la dilución adecuada de las disoluciones madre suministradas en MeOH o ACN. También se prepararon disoluciones intermedias mixtas (disoluciones de trabajo) que contenían todos los compuestos a una concentración de 1 y 10 µg/mL y con una concentración de 50 ng/mL de IS. Todas las disoluciones se almacenaron refrigeradas a -20°C y se utilizaron para construir curvas de calibrado y validar el método. Se prepararon de forma independiente en plasma blanco libre de analitos muestras de control de calidad (QC) de concentración baja (10 ng/mL), media (100 mg/mL) y alta (250 ng/mL), y para preparar el calibrado de adición con muestras de plasma libre de compuestos enriquecidas con diferentes adiciones (0.5, 1, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 ng/mL), a partir de las disoluciones de trabajo mediante la dilución adecuada para obtener la concentración final requerida en cada caso.

3.2.2. MUESTRAS DE PLASMA

El plasma blanco se obtuvo del Centro Gallego de Transfusiones (Santiago de Compostela, España) y se utilizó para la validación. Se obtuvieron muestras reales de casos procedentes de individuos intoxicados por sobredosis de diferentes drogas de abuso y otros fármacos, y se almacenaron a -18 °C. Las muestras de sangre total requirieron centrifugación para aislar la fracción de plasma para su análisis. Todas las pruebas se realizaron de acuerdo con los principios de la Declaración de Heilsinki. Las muestras de plasma se recogieron de acuerdo con los criterios de evaluación y la posterior autorización establecidos por el Comité de Ética en Investigación de Galicia (España) [38, 39].

3.2.3. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS CON MEPS

Las proteínas y otros posibles interferentes en el plama se eliminaron añadiendo 200 µL de MeOH a un volumen de muestra de 300 µL de plasma homogeneizado, colocando la mezcla en un tubo Eppendorf® (1.5 mL) y agitando en vórtex durante 20 s. Se adoptó esta relación volumétrica entre la muestra y el MeOH para completar la desproteinización y, al mismo tiempo, los volúmenes se adecuaron a la técnica miniaturizada de MEPS, ayudando a prolongar la vida de las fases utilizadas. La mezcla se centrifugó a 15.596 *x g* durante 5 min, después de lo cual se recogieron 300 µL de sobrenadante y se diluyeron con 200 µL de tampón fosfato (50 mM, pH 6). A continuación, los tubos se agitaron en vórtex durante 20 s y se centrifugaron a 15596 *x g* durante 5 min para evitar la oclusión de interferentes en la fase adsorbente. Se empaquetó una jeringa analítica digital eVol® XR (100 µL) equipada con un inserto de cilindro y una aguja (BIN) con 4 mg de adsorbente polimérico para MEPS. El adsorbente se acondicionó con 100 µL de MeOH, seguido de 100 µL de agua ultrapura. Luego, se cargó una alícuota de 100 µL de muestra aspirando y dispensando ocho veces para aumentar la retención de los analitos en el material adsorbente. A continuación, se lavó el adsorbente con 150 µL de una mezcla de agua/MeOH (97.5:2.5, v/v) para eliminar los interferentes potenciales retenidos en la fase, sin eluir a los analitos. A continuación, la fase adsorbente se secó durante 0.5 min aspirando y dispensando 100 µL de aire tres veces y los analitos se eluyeron dos veces con 100 µL de una mezcla ternaria de disolventes formada por DCM/IPA/NH_4OH (78:20:2, v/v/v). Finalmente, el extracto se evaporó bajo una corriente de nitrógeno y a una temperatura de 40 °C y se reconstituyó con 50 µL de fase móvil, inyectándose un volumen de 5 µL de extracto reconstituido en el sistema UPLC-MS/MS para su análisis.

3.2.4. CONDICIONES DEL UHPLC-MS/MS

Las muestras de plasma se analizaron mediante UHPLC-MS/MS. La separación cromatográfica se realizó en un sistema Waters® UPLC H-Class equipado con una columna ACQUITY UPLC™ BEH Shield RP18 (2.1 x 100 mm, 1.7 µm de tamaño de partícula). Los análisis se realizaron en la columna a temperatura de 55 °C, utilizando un flujo de 0.4 mL/min. La fase móvil binaria utilizada consistió en agua (A) y ACN (B), ambos conteniendo 0.1% de ácido fórmico. El programa de elución en gradiente se estableció de la siguiente forma: 0-3.5 min 10-70% de B. La composición del eluyente retornó a las condiciones iniciales (10% B), por lo que el tiempo de ejecución total fue de 5 minutos. La temperatura del compartimento del muestreador automático se mantuvo a 10 °C y el volumen inyectado fue de 5 µL. Como sistema de detección se utilizó un espectrómetro de masas Xevo TQD de Waters (Milforf, MA, Estados Unidos) equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) que funciona en modo de iones positivos en las siguientes condiciones óptimas: voltaje capilar 0.6 kV, temperatura de la fuente de iones 120 °C, caudal del nebulizador (N_2) 50 L/h; y el caudal y la temperatura del gas de secado (N_2) 1100 L/h y 500 °C, respectivamente. Todos los parámetros de MS/MS se optimizaron mediante la infusión de una concentración de 1 µg/mL de cada estándar individual en MeOH a una velocidad de flujo de 20 µL/min. Los demás parámetros de MS se optimizaron automáticamente y se recogen en la **Tabla 3.2**. Los datos se adquirieron utilizando el software *MassLynx*™. El detector de MS trabajó en el modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM) para todos los analitos. Los criterios de identificación utilizados fueron los tiempos de retención de los compuestos y la relación del ion cuantificador más fuerte respecto al segundo ion de transición más fuerte, utilizado como ion cualificador (**Tabla 3.2**).

Tabla 3.2. Parámetros UHPLC-MS/MS para los analitos estudiados.

Compuestos	tR (min)	CV (V)	Transcición Cuantificadora (*m/z*)	RCE% (V)	Transición Cualificadora (*m/z*)	RCE% (V)	Relación Iones
Zopiclone	1.70	18	389.01>244.4	14	389.01>111.83	56	1.2
Zolpidem	2.21	54	308.07>235.12	34	308.07>91.99	52	5.0
Nifoxipam	3.24	34	316.10>224.02	28	316.10>213.02	38	3.0
Descloroetizolam	3.41	46	309.14>255.09	22	309.14>280.16	22	5.0
Zaleplon	3.45	44	306.03>236.00	26	306.03>264.11	22	5.0
Clonazolam	3.47	50	354.10>102.92	46	354.10>280.07	36	1.7
Flubromazolam	3.66	52	371.05>223.02	26	371.05>292.10	44	1.3
Meclonazepam	4.01	48	330.09>214.01	38	330.09>238.27	40	3.5
Zolpidem-d6	2.21	26	314.18>235.19	36	314.18>92.05	52	5.0

tR: tiempo de retención; RCE: energía relativa de colisión; CV: voltaje de cono
Relación de iones: transición cuantificadora/transición cualificadora, máxima tolerancia: ± 30%

3.2.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La validación de un método analítico es un requisito importante para garantizar que se pueda utilizar para el fin previsto como es la determinación fiable de los analitos de interés [40, 41]. El método optimizado propuesto se validó siguiendo las directrices internacionales de la FDA e ICH [42, 43] en términos de linealidad, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), recuperación, precisión y efecto matriz. La linealidad del método se evaluó mediante un análisis por triplicado de patrones de calibrado, preparados con muestras de plasma blanco enriquecidas con ocho niveles de concentración diferentes (desde LOQ a 500 ng/mL) de disoluciones mezcla de patrón preparadas. Las curvas de calibración se construyeron utilizando el método de adiciones estándar y se sometieron a regresión lineal de mínimos cuadrados para calcular la relación de respuesta entre las áreas para cada analito y el IS (50 ng/mL). Se consideró que el LOD y el LOQ eran las concentraciones más bajas, teniendo en cuenta una relación señal-ruido de 3 y 10, respectivamente. Estos parámetros se obtuvieron mediante el uso de muestras de plasma blanco adicionadas con los analitos en concentraciones cercanas o inferiores a los valores esperados. La precisión se evaluó utilizando muestras de control de calidad de plasma (QC) adicionadas a tres niveles de concentración diferentes (10, 100 y 250 ng/mL). Todas las muestras QC se analizaron en el mismo día (precisión intra-día) o en días diferentes (precisión inter-día), utilizando 3 y 5 repeticiones, respectivamente, por nivel de concentración, y expresadas como desviación estándar relativa (%RSD). El efecto matriz se puede evaluar si la señal de ionización del analito aumenta o se suprime, y es una de las preguntas más complejas de responder en LC-MS. La recuperación del analito es una medida del grado en que se extrae un analito de una muestra. La denominada "eficacia del proceso" (PE) incluye la influencia de los efectos de la matriz y la recuperación (es decir, pérdidas potenciales de analito durante la preparación de la muestra y mediante la supresión o aumento de la ionización en la fuente de iones). Los efectos matriz (EM), la eficiencia de extracción (como recuperación relativa, RR) y la eficacia del proceso (PE) se estimaron de acuerdo con Matuszewski *et al.* y Kruve *et al*. [44, 45]. El proceso implicó el uso de áreas de pico cromatográfico para tres conjuntos de muestras diferentes. Por tanto, se calculó la relación de área de pico de analito respecto al IS para cada compuesto usando un conjunto de disoluciones estándar preparadas en la fase móvil (conjunto A). Luego, se estableció la relación de área entre cada estándar y el IS (adicionado después de la extracción del plasma blanco) utilizando estándares de matriz (muestras de plasma adicionadas con analitos y estándares internos después del proceso de extracción, conjunto B). Finalmente, se utilizó en conjunto C (muestras de plasma fortificadas con disoluciones estándar e IS antes del proceso de extracción) para comparar las áreas de los picos cromatográficos entre cada analito y el IS. Con estos conjuntos de muestras se puede definir:

$$EM\ (\%) = B/A \times 100$$

$$PE\ (\%) = C/A \times 100$$

$$RR\ (\%) = C/B \times 100$$

RR, EM y PE se obtuvieron mediante el uso de dos muestras QC fortificadas con los analitos a dos niveles de concentración, 10 y 250 ng/mL, en seis réplicas por nivel. Los valores del efecto matriz (EM) por debajo del 80% normalmente indican un efecto de supresión de ionización, mientras que los valores superiores al 120% indican un efecto de aumento de ionización.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN

Las principales variables que influyen en la eficiencia del proceso MEPS son el tipo de adsorbente, eluyente y su volumen, el volumen de la disolución de lavado, el número de ciclos de extracción y el pH de la muestra [33, 46, 47]. En la mayoría de los métodos publicados en los que se aplicó MEPS a muestras biológicas de interés toxicológico, los adsorbentes más utilizados fueron el C_{18} y las fases C_8/SCX de modo mixto [48]. Basándose en otras aplicaciones de MEPS realizadas por el grupo de investigación, la fase C_8/SCX de modo mixto proporciona los mejores resultados para catinonas y otras sustancias psicoactivas en fluido oral [35], opiáceos en las muestras de sangre o anfetaminas en orina [36, 49]. Por ello, en este trabajo se utilizó inicialmente una fase C_8/SCX de modo mixto y una fase polimérica (material de poliestireno DVB modificado con grupos funcionales urea) para identificar el eluyente más adecuado, ya que tiene una mayor probabilidad de éxito en la extracción de los compuestos. Se realizaron pruebas preliminares con varios disolventes de lavado de la fase y se encontró que utilizando agua con una proporción del 2.5% de MeOH era la mejor opción para evitar interferencias cromatográficas. Posteriormente, se llevó a cabo un diseño experimental basado en un enfoque multivariado eficiente para la planificación de experimentos con el fin de estudiar las variables que puedan influir en el proceso de MEPS, incluyendo varios adsorbente.

3.3.1.1.OPTIMIZACIÓN DEL DISOLVENTE DE ELUCIÓN

El disolvente de elución debe ser capaz de eluir eficazmente los analitos retenidos en la fase adsorbente a medida que la muestra pasa a través del lecho adsorbente en la etapa de carga. Se estudiaron seis mezclas de disolventes para identificar el eluyente más adecuado para las fases poliméricas y C_8/SCX de modo mixto. Todas las pruebas de MEPS se realizaron por triplicado, utilizando muestras de plasma adicionadas con los analitos a una concentración de 500 ng/mL (y el patrón interno a una concentración de 100 ng/mL). Teniendo en cuenta la experiencia de otros trabajos anteriores [35, 36], se consideraron los siguientes disolventes o mezclas: MeOH, 10% amoniaco en 90% de ACN/MeOH (1:1, v/v), ACN/NH_4OH (96:4, v/v), la fase móvil en las condiciones de gradiente inicial (ácido fórmico al 0.1% en agua/0.1% ácido fórmico en ACN, 90:10, v/v) y DCM/IPA/NH_4OH (78:20:2, v/v/v). Los resultados mostraron la mayor eficiencia de extracción con el sistema de ternario de disolventes para ambas fases, probablemente porque las condiciones ofrecidas por la combinación de dos disolventes orgánicos y una pequeña proporción de una disolución básica facilitó la extracción de los analitos de la matriz de la muestra. Los mejores resultados logrados con la mezcla de DCM/IPA/NH_4OH (78:20:2, v/v/v) para la fase polimérica se muestran en la **Figura 3.1**. El MeOH, que resultó ser el segundo mejor eluyente exhibió una eficiencia de extracción menor del 50%. Finalmente, la mezcla de fase móvil y el disolvente que contenía ácido acético al 2% en MeOH fueron los eluyentes menos eficaces. Por tanto, se estableció la disolución de DCM/IPA/NH_4OH (78:20:2, v/v/v) como disolvente de elución para las pruebas adicionales.

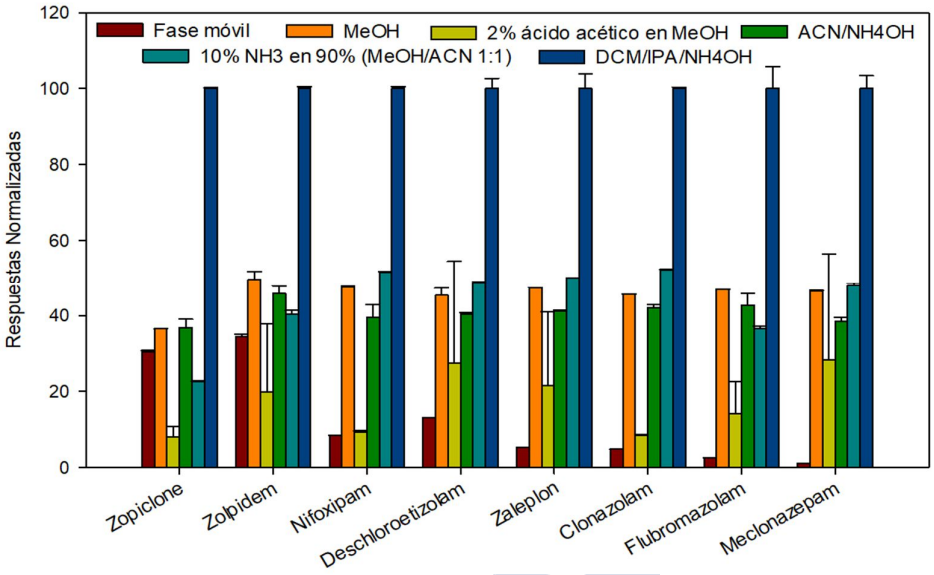


Figura 3.1. Estudio del disolvente de elución (n=3).

3.3.1.2.DISEÑO EXPERIMENTAL

La influencia de las variables experimentales en el proceso de MEPS se examinó utilizando un diseño de cribado (*screening*) asimétrico $3^3 4^2//16$ con 3 factores estudiados a 3 niveles y otros 2 factores estudiados a 4 niveles [50]. Los niveles utilizados para cada variable se muestran en la **Tabla 3.3**. Para la generación y evaluación del diseño se utilizó el software estadístico *NemrodW®*. Se realizaron un total de 16 experimentos con los siguientes factores: b_1, volumen de disolución de lavado (H_2O/MeOH, 97.5:2.5, v/v) (50, 100 y 150 µL); b_2, volumen de eluyente (50, 100 y 200 µL); b_3, número de ciclos de extracción (2, 6 y 8); b_4, fase adsorbente (C8, C18, C8/SCX de modo mixto y polimérico); y b_5, pH de la muestra (4, 6, 7 y 9).

Tabla 3.3. Condiciones experimentales para el diseño de cribado asimétrico $3^3 4^2//16$.

Nº Experiencias	Aleatorización	Volumen de lavado (µL)	Volumen de eluyente (µL)	Nº de ciclos	Fase	pH
1	9	50	50	2	C_8	4
2	2	50	100	6	C_{18}	6
3	15	50	200	8	C_8/SCX	7
4	5	50	50	2	Polimérica	9
5	3	100	50	6	C_8/SCX	9
6	16	100	100	2	Polimérica	7
7	4	100	200	2	C_8	6
8	7	100	50	8	C_{18}	4

Tabla 3.3. Condiciones experimentales para el diseño de cribado asimétrico $3^3 4^2$//16 (*continuación*).

Nº Experiencias	Aleatorización	Volumen de lavado (µL)	Volumen de eluyente (µL)	Nº de ciclos	Fase	pH
9	14	150	50	8	Polimérica	6
10	1	150	100	2	C_8/SCX	4
11	6	150	200	2	C_{18}	9
12	10	150	50	6	C_8	7
13	8	50	50	2	C_{18}	7
14	13	50	100	8	C_8	9
15	12	50	200	6	Polimérica	4
16	11	50	50	2	C_8/SCX	6

El análisis de varianza (ANOVA) mostró que los resultados para todos los analitos, excepto zopiclone y nifoxipam, fueron estadísticamente significativos (zaleplon, descloroetizolam, flubromazolam y meclonazepam con $p<0.05$, y zolpidem y clonazepam con $p<0.01$). Todos los resultados se analizaron gráficamente utilizando gráficos de Pesos Delta (basados en el método de Lenth) y Efectos Totales, dos tipos de gráficos de barras, donde la longitud de cada barra está relacionada con el efecto del nivel del factor considerado. La **Figura 3.2** ilustra la influencia de los efectos relativos de los cambios de nivel de cada factor en los resultados de MEPS para el descloroetizolam. El volumen de eluyente (b_2) fue estadísticamente significativo cuando se pasa al nivel de mayor volumen (200 µL) para zaleplon, zolpidem y clonazolam. Para el resto de analitos, los resultados sugieren que el aumento del volumen de eluyente condujo a una extracción más eficiente de los compuestos, por lo que se seleccionó un volumen de 200 µL como valor óptimo para MEPS. El número de ciclos de extracción (b_3) también ha sido estadísticamente significativo cuando se utilizan los niveles altos, causando un fuerte efecto en la extracción de todos los analitos. Un número de ciclos de 6 u 8 produce un efecto similar en los hipnóticos *Z*, mientras que un valor de 8 resultó la mejor opción para el resto de analitos. Por tanto, se toma el mayor número de *strokes* estudiado (8 ciclos de aspiración-dispensación) como el valor más adecuado para la extracción simultánea de todos los compuestos. La influencia del material adsorbente (b_4) fue estadísticamente significativo para todos los analitos, excepto zopiclone. La fase polimérica proporcionó los mejores resultados para todos los compuestos. Zopiclone se extrajo de manera similar con las fases poliméricas y C_8/SCX de modo mixto. Las DBZD y los hipnóticos *Z* estudiados tienen coeficientes de partición bajos (**Tabla 3.1**). Además, son hidrófilos y pueden estar presentes en el plasma sanguíneo y el suero. Debido a la combinación química de los adsorbentes poliméricos, tienen una afinidad de unión por compuestos ligeramente polares y también no polares. Por esta razón, la fase polimérica fue la mejor opción de adsorbente para la extracción simultánea de todos los compuestos. El pH de la muestra (b_5) tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre zolpidem (pH 6) y clonazolam (pH 4). La eficiencia de extracción para los otros analitos fue similar para ambos pH. De hecho, aunque no todos los compuestos se encontraban en forma iónica a pH 6 (véanse

los valores de pKa en la **Tabla 3.1**), las características de un adsorbente polimérico facilitó la extracción de todos ellos. Por tanto, se consideró que el pH 6 era la mejor opción para todos los analitos. El efecto del volumen de la disolución de lavado (b_1) fue estadísticamente significativo solo para zolpidem y clonazolam. Sin embargo, un volumen de 150 µL proporcionó los mejores resultados para zopiclone y nifoxipam, y resultados similares a los obtenidos con los otros volúmenes para descloroetizolam, flubromazolam y meclonazepam. Por esta razón, se tomó 150 µL como el volumen más adecuado.

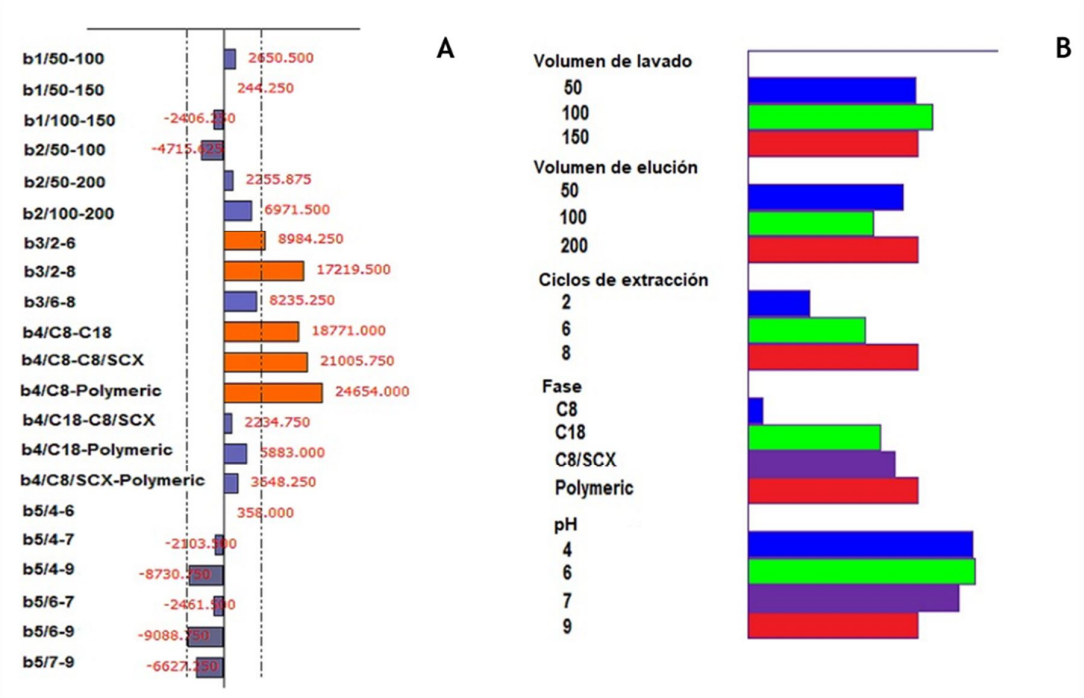


Figura 3.2. Gráficos Pesos Delta (A) y Efectos Totales (B) para descloroetizolam.

3.3.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

El método propuesto fue validado respecto a los parámetros de linealidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), precisión, exactitud, eficiencia del proceso y efecto matriz en las condiciones óptimas previamente establecidas. La **Figura 3.3** muestra los cromatogramas típicos para plasma blanco (libre de DBZD e hipnóticos *Z*) y la ausencia de picos de sustancias endógenas que podrían interferir con la cuantificación de los analitos de interés. Por tanto, se consideraron resultados satisfactorios de la especificidad del método. La linealidad se evaluó mediante la construcción de curvas de calibración que abarcan el rango de concentraciones desde LOQ hasta 500 ng/mL (ocho niveles diferentes determinados por triplicado). Dicho rango se basó en los niveles terapéuticos y las dosis tóxicas y letales de los hipnóticos *Z* [51]. Los coeficientes de determinación para los análisis de regresión variaron de 0.9932 a 0.9990. Los LOD y LOQ abarcaron los rangos de 0.5 a 5 ng/mL y 1 a 10 ng/mL, respectivamente (**Tabla 3.4**). Estos valores son más bajos que los publicados previamente para hipnóticos *Z* [11], zopiclone [16, 19, 20], nifoxipam [15] y descloroetizolam [15, 17, 24], pero similares a los del zolpidem [9, 28], zaleplon [19], descloroetizolam [10], clonazolam y meclonazepam [15], y flubromazolam [15, 17, 24].

Se realizó un estudio de validación en términos de efecto matriz, recuperación y eficiencia del proceso. Los valores del efecto matriz (EM) por debajo del 80% normalmente indican una supresión de la señal de ionización, mientras que los valores superiores al 120% indican un aumento de la señal de ionización. La determinación de los analitos estuvo sujeta a los efectos de la matriz en uno o más de los niveles de concentración estudiados, utilizando los resultados de la adición posterior a la extracción para la comparación, explicada en la *sección 3.2.5*. El efecto matriz fue aceptable para zopiclone y zolpidem, pero no para nifoxipam, flubromazolam, meclonazepam y descloroetizolam, que exhibieron una supresión de la señal de ionización; y zaleplon y clonazolam, que exhibieron un aumento en la señal de ionización. La metodología que implica el uso de la fase polimérica en el proceso de MEPS, usando IS y la calibración basada en matriz de adición estándar, se logran excelentes resultados de RR y PE, y se evitó el efecto matriz (**Tabla 3.5**). La exactitud del método propuesto se calculó en términos de recuperación y precisión, utilizando muestras de plasma QC adicionadas con los analitos a tres concentraciones diferentes (10, 100 y 250 ng/mL). La precisión, expresada como desviación estándar relativa (%RSD), fue excelente; la precisión intra-día osciló entre el 0.1 y el 6.5% y la precisión inter-día del 0.5 al 10.6% (**Tabla 3.4**). La recuperación se evaluó como la eficiencia del proceso (PE) y la recuperación relativa (RR), utilizando seis replicados de muestras QC que contienen los analitos en tres niveles de concentración diferentes. Como se puede ver en la **Tabla 3.4**, la PE osciló entre el 63% y el 117% y la RR entre el 61% y al 123%. Se publicaron recuperaciones similares anteriormente para zolpidem [9, 11, 20], zopiclone [9], zaleplon [11] y las DBZD estudiadas [15], y ligeramente superiores a las obtenidas con descloroetizolam y flubromazolam [10, 24], zolpidem [28] y zopiclone [19]. Los métodos publicados hasta el momento, utilizaron LLE o SPE como técnicas de extracción. Se publicaron pocos métodos basados en técnicas de microextracción para la determinación de DBZD. De Boeck *et al*. [16] publicaron un método basado en la DLLME utilizando líquido iónico como disolvente extractante para la cuantificación de DBZD, BZD e hipnóticos (entre las que se encontraban zopiclone y zolpidem) en sangre. Las recuperaciones de zolpidem y zopiclone fueron ligeramente inferiores a las obtenidas en este trabajo. Vårdal *et al*. [17] desarrollaron una extracción de membrana líquida artificial paralela (PALME) para la determinación rápida de DBZD, BZD e hipnóticos (entre ellos, descloroetizolam, flubromazolam, clonazolam, meclonazepam, zolpidem y zopiclone) en sangre. A pesar de ser una técnica verde, ya que solo utiliza unos 4 microlitros de disolvente, las recuperaciones son muy inferiores a las obtenidas en el trabajo presentado en esta Tesis. Meng *et al*. [21] desarrollaron una microextracción líquida-líquida dispersiva con disolvente de baja densidad asistida por ultrasonidos para la determinación de 4 DBZD (fenazepam, diclazepam, flubromazolam y etizolam) en muestras de orina. Las recuperaciones obtenidas por estos autores oscilaron entre 73.8 y 85.5%. Esta discusión de resultados muestra la escasez de técnicas de microextracción disponibles para este tipo de compuestos y, además, en ningún caso se ha desarrollado estudios con MEPS. Los valores obtenidos en el presente estudio atestiguan el buen desempeño del método propuesto cuando se utiliza en sus condiciones óptimas y la ventaja del uso de zolpidem-d6 como IS, para compensar las pérdidas de analitos en el proceso de extracción y efectos matriz, incluso en aquellos casos en los que no se disponía del correspondiente análogo marcado isotópicamente.

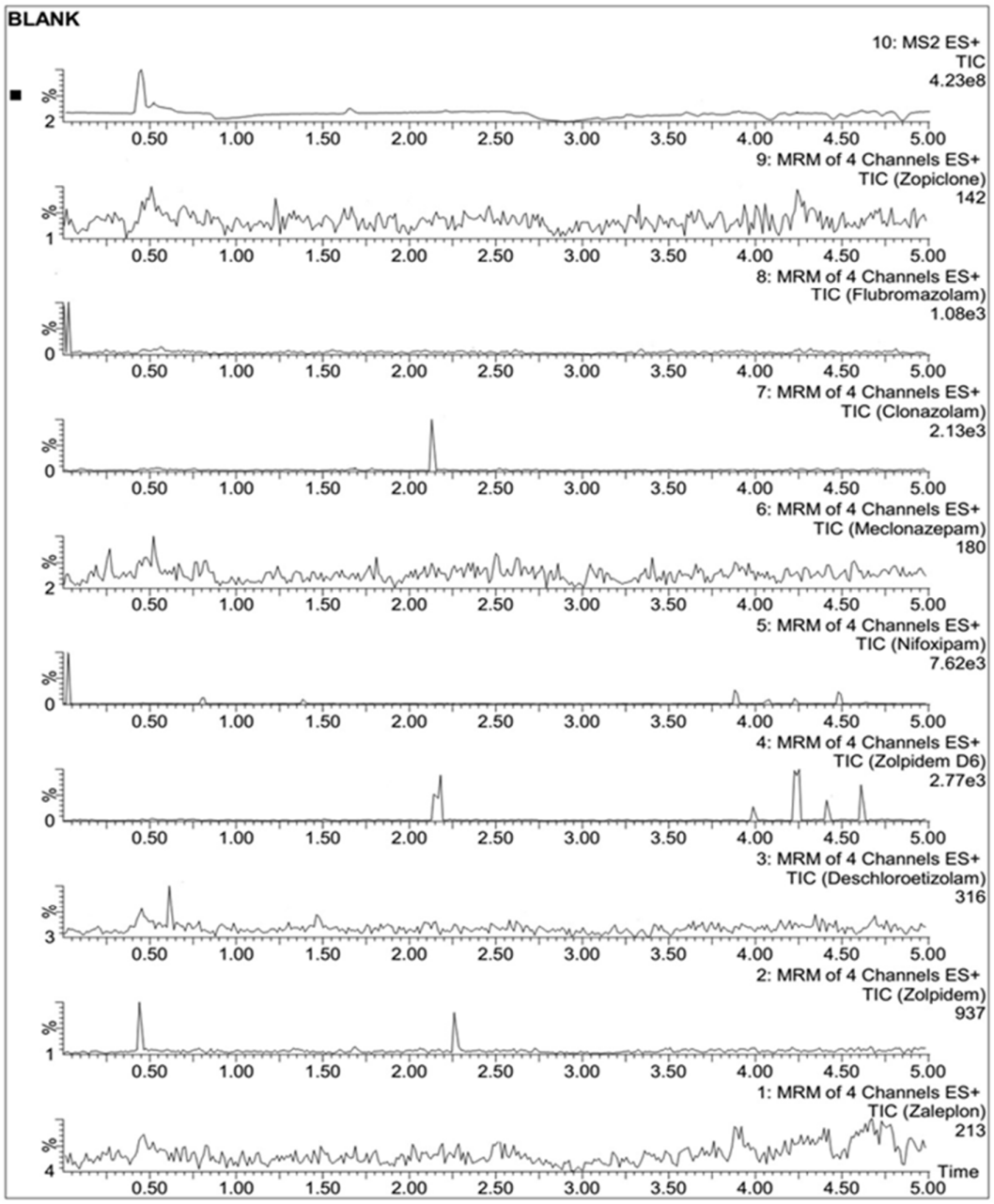


Figura 3.3. Cromatogramas de una muestra de plasma blanco (*blank*) y una muestra de plasma adicionada a una concentración de 250 ng/mL (50 ng/mL del IS) de los compuestos (*addition*).

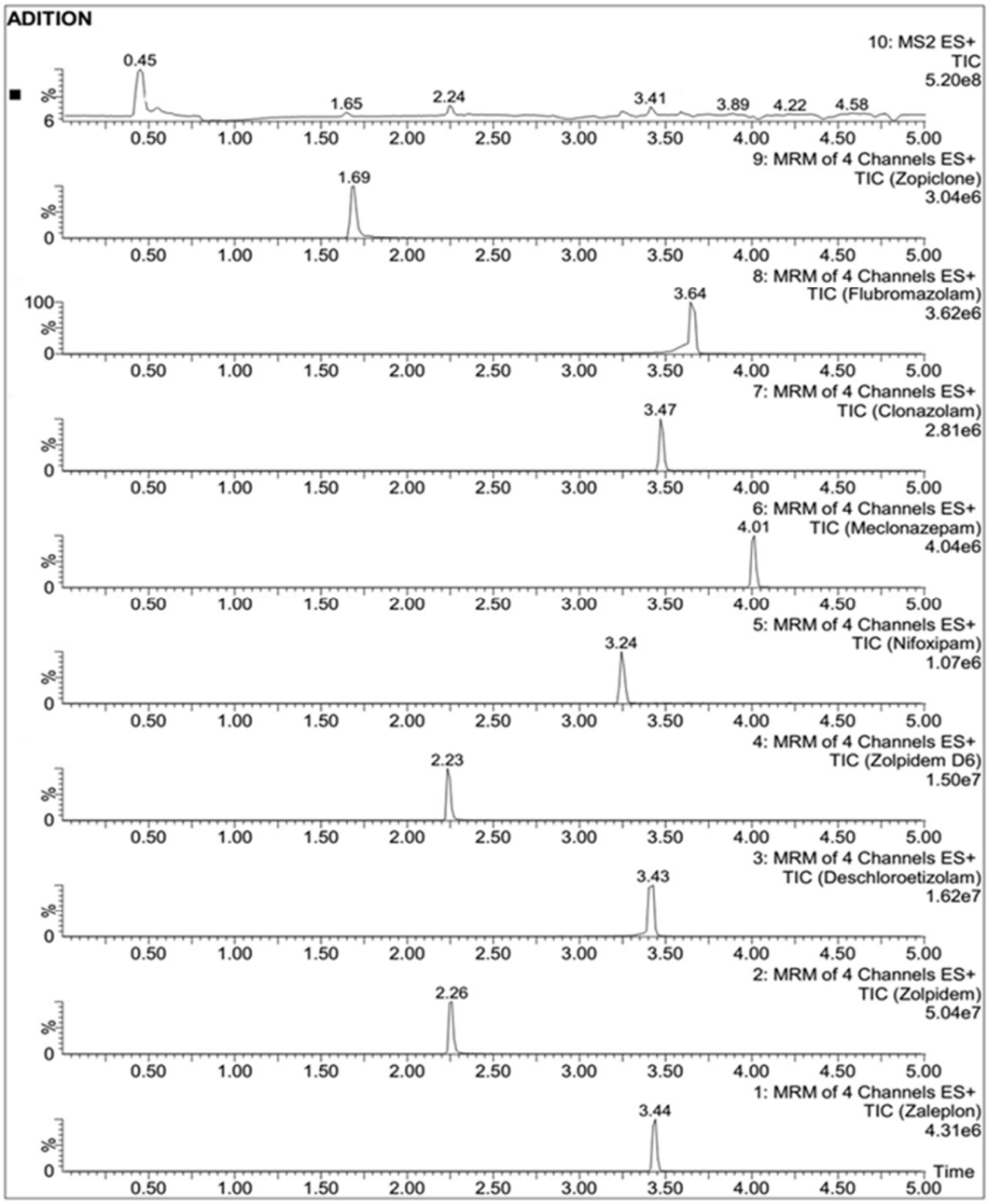


Figura 3.3. Cromatogramas de una muestra de plasma blanco (*blank*) y una muestra de plasma adicionada a una concentración de 250 ng/mL (50 ng/mL del IS) de los compuestos (*addition*).

Tabla 3.4. Validación del método: linealidad, LOD/LOQ y precisión.

Compuestos	Linealidad			LOD	LOQ	Precisión intra-día (%RSD) (n=3)			Precisión inter-día (%RSD) (n=5)		
	Pendiente	Ordenada en el origen	(R^2)	(ng/mL)	(ng/mL)	QC Bajo[a]	QC Medio[b]	QC Alto[c]	QC Bajo[a]	QC Medio[b]	QC Alto[c]
Zopiclone	0.0032	-0.0146	0.9990	0.5	1	4.9	2.0	1.6	5.4	2.1	2.8
Zolpidem	0.0401	-0.1798	0.9983	0.5	1	3.1	0.6	2.5	0.8	0.5	1.7
Nifoxipam	0.0401	-0.1798	0.9950	1	2.5	2.3	5.6	3.2	2.4	4.6	5.4
Descloroetizolam	0.0243	-0.1439	0.9964	0.5	1	2.1	1.2	2.1	4.0	3.6	2.4
Zaleplon	0.0013	0.0013	0.9981	1	2.5	4.9	2.0	1.6	5.4	2.1	2.8
Clonazolam	0.0008	-0.0034	0.9924	5	10	6.5	0.1	1.9	10.6	3.5	3.7
Flubromazolam	0.0011	-0.0046	0.9932	5	10	1.2	2.8	1.7	7.0	1.0	3.3
Meclonazepam	0.0016	-0.0108	0.9949	5	10	2.3	2.5	2.3	2.2	6.3	2.2

[a] 10 ng/mL; [b] 100 ng/mL; [c] 250 ng/mL

Tabla 3.5. Estudios de recuperación relativa (% RR) y eficacia de proceso (% PE) con la fase adsorbente polimérica.

Compuestos	% RR ± SD			%PE ± SD		
	QC Bajo[a]	QC Medio[b]	QC Alto[c]	QC Bajo[a]	QC Medio[b]	QC Alto[c]
Zopiclone	94 ± 5	65 ± 3	67 ± 1	104 ± 12	100 ± 5	117 ± 3
Zolpidem	109 ± 6	96 ± 1	92 ± 5	109 ± 6	105 ± 1	88 ± 5
Nifoxipam	90 ± 17	109 ± 13	115 ± 6	94 ± 11	100 ± 12	67 ± 6
Descloroetizolam	107 ± 11	101 ± 4	100 ± 3	92 ± 6	92 ± 4	82 ± 3
Zaleplon	123 ± 12	110 ± 8	100 ± 2	87 ± 10	81 ± 10	89± 2
Clonazolam	61 ± 8	79 ± 4	90 ± 5	117 ± 15	72 ± 4	76 ± 5
Flubromazolam	108 ± 14	83 ± 4	85 ± 1	98 ± 9	84 ± 4	113 ± 2
Meclonazepam	84 ± 10	74 ± 17	90 ± 10	86 ± 10	98 ± 15	63 ± 1

Eficiencia de extracción como recuperación relativa (%RR), y proceso de eficacia (%PE). SD: desviación estándar.

[a] 10 ng/mL; [b] 100 ng/mL; [c] 250 ng/mL.

3.3.3. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES

La aplicabilidad del método propuesto se evaluó con siete muestras de plasma procedentes de casos de sobredosis. Los resultados se muestran en la **Tabla 3.6**. El bajo volumen de muestra recogido y/o recibido por el laboratorio ha requerido que los análisis se hayan realizado por duplicado. Ninguna de las muestras contenía DBZD, pero todas contenían zolpidem en niveles por debajo del LOQ, excepto la muestra 6 que contenía este fármaco en una concentración superior a su nivel letal en plasma (2 μg/mL): 2144 ng/mL [51]. Los resultados demuestran la importancia, cada vez mayor, de contar con métodos validados para detectar y cuantificar DBZD e hipnóticos *Z*, cuyo consumo está en aumento.

Tabla 3.6. Concentraciones encontradas en las muestras analizadas en duplicado.

Muestra	Zolpidem (ng/mL)	Otras BZD detectadas
1	<LOQ	Bromazepam Lormetazepam Lorazepam Diazepam
2	<LOQ	Alprazolam Diazepam Lormetazepam
3	<LOQ	Diazepam Lormetazepam
4	<LOQ	Lorazepam Lormetazepam Diazepam
5	<LOQ	Lormetazepam Diazepam
6	2144 ± 287	Diazepam Alprazolam
7	<LOQ	Lorazepam Lormetazepam Diazepam

3.4. CONCLUSIONES

Se utilizó un procedimiento de MEPS eficiente, rápido y respetuoso con el medio ambiente en combinación con UHPLC-MS/MS para la determinación de cinco DBZD y tres hipnóticos *Z* en muestras de plasma humano. El método resultante fue validado con resultados satisfactorios. Se encontró que una fase polimérica para MEPS era la más adecuada para la extracción simultánea de los compuestos estudiados. Aunque algunos analitos estaban sujetos a efectos matriz considerables, el uso de IS y de calibración de adición estándar permitió su cuantificación precisa y exacta. La aplicación del método propuesto a muestras de sangre forense reveló la presencia de zolpidem y otras BZD. Aunque ninguna de las muestras contenía DBZD, los estudios de recuperación realizados con muestra QC demuestran que el método proporciona una herramienta analítica eficaz para su aplicación en toxicología forense para identificar y confirmar la presencia de estos fármacos que pueden pasar desapercibidos en las pruebas de detección de cannabinoides/opioides.

3.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2019), European Drug Report 2019: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg 2019, pag 17, 34-36. http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11364/20191724_TDAT19001ENN_PDF.pdf (acceso mayo 2021).

[2] Manchester K.R., Lomas E.C., Waters L., Dempsey F.C., Maskell P.D., The emergence of new psychoactive substances (NPS) benzodiazepines: a review, *Drug Test. Anal*. 2018, *10*, 37–53.

[3] Smith J.P., Sutcliffe O., Banks C., An overview of recent developments in the analytical detection of new psychoactive substances (NPS), *Analyst* 2015, *140*, 4932-4948.

[4] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, The misuse of benzodiazepines among high-risk opioid users in Europe, Perspectives on Drugs, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2018, http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2733/Misuse%20of%20benzos_POD2015.pdf (acceso mayo 2021).

[5] Bäckberg M., Jönsson K.H., Beck O., Helander A., Investigation of drug products received for analysis in the Swedish STRIDA project on new psychoactive substances, *Drug Test. Anal*. 2018, *10*, 340–349.

[6] Gunja N., In the Zzz Zone: The effects of Z-Drugs on human performance and driving, *J. Med. Toxicol*. 2013, *9*, 163-171.

[7] Sakshaug S., Handal M., Hjellvik V., Berg C., Ripel A., Gustavsen I., Mørland J., Skurtveit S., Long-term use of Z-hypnotics and co-medication with benzodiazepines and opioids, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. 2017, *120*, 292–298.

[8] Anilanmert B., Çavuş F., Narin I., Cengiz S., Sertler Ş., Özdemir A.A., Açikkol M., Simultaneous analysis method for GHB, ketamine, norketamine, phenobarbital, thiopental, zolpidem, zopiclone and phenytoin on urine, using C18 poroshell column, *J. Chromatogr. B* 2016, *1022*, 230–241.

[9] Eliassen E., Kristoffersen L., Quantitative determination of zopiclone and zolpidem in whole blood by liquid-liquid extraction and UHPLC-MS/MS, *J. Chromatogr. B* 2014, *971*, 72–80.

[10] Tomková J., Švidrnoch M., Maier V., Ondra P., Analysis of selected designer benzodiazepines by ultra high performance liquid chromatography with high-resolution time-of-flight mass spectrometry and the estimation of their partition coefficients by micellar electrokinetic chromatography, *J. Sep. Sci*. 2017, *40*, 2037–2044.

[11] Kratzsch C., Tenberken O., Peters F.T., Weber A.A., Kraeme T., Maurer H.H., Screening, library assisted identification and validated quantification of 23 benzodiazepines, flumazenil, zaleplone, zolpidem and zopiclone in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization, *J. Mass Spectrom*. 2004, *39*, 856–872.

[12] El Balkhi S., Chaslot M., Picard N., Dulaurent S., Delage M., Mathieu O., Saint-Marcoux F., Characterization and identification of eight designer benzodiazepine metabolites by incubation with human liver microsomes and analysis by a triple quadrupole mass spectrometer, *Int. J. Legal Med*. 2017, *131*, 979–988.

[13] Meyer M.R., Bergstrand M.P., Helander A., Beck O., Identification of main human urinary metabolites of the designer nitrobenzodiazepines clonazolam, meclonazepam, and nifoxipam by nano-liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for drug testing purposes, *Anal. Bioanal. Chem*. 2016, *408*, 3571–3591.

[14] Høiseth G., Tuv S.S., Karinen R., Blood concentrations of new designer benzodiazepines in forensic cases, *Forensic Sci. Int*. 2016, *268*, 35–38.

[15] Bergstrand M.P., A. Helander, Beck O., Development and application of multi-component LC-MS/MS method for determination of designer benzodiazepines in urine, *J. Chromatogr. B* 2016, *1035*, 104–110.

[16] De Boeck M., Missotten S., Dehaen W., Tytgat J., Cuypers E., Development and validation of a fast ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction procedure combined with LC-MS/MS analysis for the quantification of benzodiazepines and benzodiazepines-like hypnotics in whole blood, *Forensic Sci. Int*. 2017, *274*, 44–54.

[17] Vårdal L., Wong G., Øiestad Å.M.L., Pedersen-Bjergaard S., Gjelstad A., Øiestad E.L., Rapid determination of designer benzodiazepines, benzodiazepines, and Z-hypnotics in whole blood using parallel artificial liquid membrane extraction and UHPLC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem*. 2018, *410*, 4967–4978.

[18] Ambach L., Hernández Redondo A., König S., Angerer V., Schürch S., Weinmann W., Detection and quantification of 56 new psychoactive substances in whole blood and urine by LC-MS/MS, *Bionalysis* 2015, *7*, 1119–1136.

[19] Karlonas N., Ramanavicius A., Ramanaviviene A., Development of an SPE method for the determination of zaleplon and zopiclone in hemolyzed blood using fast GC with negative-ion chemical ionization MS, *J. Sep. Sci*. 2014, *37*, 551–557.

[20] Krylova E.A., Kataev S.S., Khomov Y.A., Dvorskaya O.N., Validation of a gas chromatography/mass spectrometry method for quantitative determination of zolpidem in whole blood, *Pharm. Chem. J*. 2015, *48*, 564–569.

[21] Meng L., Zhu B., Zheng K., Fu S., Ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of 4 designer benzodiazepines in urine samples by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 2017, *1053*, 9–15.

[22] Wohlfarth A., Vikingsson S., Roman M., Andersson M., Kugelberg F.C., Green H., Kronstrand R., Looking at flubromazolam metabolism from four different angles: metabolite profilingin human liver microsomes, human hepatocytes, mice and authentic human urine samples with liquid chromatography high-resolution mass spectrometry, *Forensic Sci. Int*. 2017, *274*, 55–63.

[23] Zawilska J. B., Wojcieszak J., An expanding world of new psychoactive substances—designer benzodiazepines, *Neurotoxicology* 2019, *73*, 8–16.

[24] Švidrnoch M., Boráňová B., Tomkivá J., Ondra P., Maier V., Simultaneous determination of designer benzodiazepines in human serum using non-aqueous capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry with successive multiple ionic-polymer layer coated capillary, *Talanta* 2018, *176*, 69–76.

[25] Nilsson G.H., Kugelberg F.C., Ahlner J., Kronstrand R., Validation of an LC-MS/MS method for the determination of zopiclone, N-desmethylzopiclone and 2-amino-5-chloropyridine in whole blood and its application to estimate the original zopiclone concentration in stored specimens, *Int. J. Legal Med*. 2015, *129*, 269–277.

[26] Huppertz L.M., Moosmann B., Auwärter V., Flubromazolam-Basic pharmacokinetic evaluation of a highly potent designer benzodiazepine, *Drug Test. Anal*. 2018, *10*, 206–211.

[27] Fernandez P., Vazquez C., Lorenzo R.A., Carro A.M., Bermejo A.M., Development of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of six benzodiazepines in human plasma after solid-phase extraction. *Anal. Letters* 2010, *43*, 1075–1084.

[28] Piotrowski P., Bocian S., Śliwka K., Buszewski B., Simultaneous analysis of zolpidem and its metabolite in whole blood and oral fluid samples by SPE-LC-MS/MS for clinical and forensic purposes, *Adv. Med. Sci*. 2015, *60*, 167–172.

[29] Lee H., Park Y., Jo J., In S., Park Y., Kim E., Pyo J., Choe S., Analysis of benzodiazepines and their metabolites using DBS cards and LC-MS/MS, Forensic Sci. Int. 2015, 255, 137–145.

[30] Armenta S., Esteve-Turrillas F.A., Garrigues S., De la Guardia M., Green Analytical Chemistry: The Role of Green Extraction Techniques en: Ibáñez E, Cifuentes A (Eds.), Wilson and Wilson's comprehensive analytical chemistry, vol 76: Green extraction techniques: principles, advances and applications, Elsevier, Amsterdam, 2017.

[31] Abdel-Rehim M., New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications: I. Determination of local anesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr. B* 2004, *801*, 317–321.

[32] Pereira J.A.M., Gonçalves J., Porto-Figueira P., Figueira J. A., Alves V., Perestrelo R., Medina S., Câmara J. S., Current trends on microextraction by packed sorbent – fundamentals, application fields, innovative improvements and future applications, *Analyst* 2019, *144*, 5048-5074.

[33] Moein M. M., Abdel-Rehim A., Abdel-Rehim M., Microextraction by packed sorbent (MEPS) and monolithic packed pipette tips for 96-well plates en: Poole C.F. (Ed), Solid-Phase Extraction Handbooks in Separation Science, Elsevier, 2020.

[34] Fernández P., González M., Regenjo M., Ares A.M., Fernández A.M., Lorenzo R.A., Carro A.M., Analysis of drugs of abuse in human plasma using microextraction by packed sorbents and ultra-high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 2017, *1485*, 8–19.

[35] Ares A.M., Fernández P., Regenjo M., Fernández A.M., Carro A.M., Lorenzo R.A., A fast bioanalytical method based on microextraction by packed sorbent and UPLC–

MS/MS for determining new psychoactive substances in oral fluid, *Talanta* 2017, *174*, 454–461.

[36] Prata M., Ribeiro A., Figueirinha D., Rosado T., Oppolzer D., Restolho J., Araújo A. R.T.S., Costa S., Barroso M., Gallardo E., Determination of opiates in whole blood using microextraction by packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 2019, *1602*, 1–10.

[37] Malaca S., Rosado T., Restolho J., Rodilla J.M., P. Rocha M.M., Silva L., Margalho C., Barroso M., Gallardo E., Determination of amphetamine-type stimulants in urine samples using microextraction by packed sorbent and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 2019, *1120*, 41–50.

[38] World medical association declaration of Helsinki ethical principles for medical research involving human subjects, *J. Am. Med. Assoc*. 2013, *310*, 2191–2194.

[39] https://acis.sergas.es/cartafol/Rede-de-comites-de-etica-da-investigacion. (acceso mayo 2021).

[40] Wille S.M.R., Coucke W., De Baere T., Peters F.T., Update of standard practices for new method validation in forensic toxicology, *Curr. Pharm. Des*. 2017, *23*, 5442–5454.

[41] Magnusson B., Örnemark U., Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods—a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. Teddington: Eurachem; 2014. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf (acceso mayo 2021).

[42] U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. 2018. https://www.fda.gov/media/70858/download (acceso mayo 2021).

[43] ICH harmonized tripartite guideline: validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), International Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q2-r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology (acceso mayo 2021).

[44] Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M., Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Anal. Chem*. 2003, *75*, 3019–3030.

[45] Kruve A., Rebane R., Kipper K., Oldekop M.L., Evard H., Herodes K., Ravio P., Leito I., Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: part II, *Anal. Chim. Acta* 2015, *870*, 8–28.

[46] Abdel-Rehim M., Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis, *J. Chromatogr. A*, 2010, *1217*, 2569–2580.

[47] Yang L., Said R., Abdel-Rehim M., Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packedsorbent (MEPS): A review, *J. Chromatogr. B* 2017, *1043*, 33–43.

[48] da Cunha K.F., Rodrigues L.C., Huestis M.A., Costa J.L., Miniaturized extraction method for analysis of synthetic opioids in urine by microextraction with packed

sorbent and liquid chromatography—tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 2020, *1624*, 461241.

[49] Malaca S., Rosado T., Restolho J., Rodilla J.M., Rocha P.M.M., Silva L., Margalho C., Barroso M., Gallardo E., Determination of amphetamine-type stimulants in urine samples using microextraction by packed sorbent and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 2019, *1120*, 41–50.

[50] Lewis G.A., Mathieu D., Phan-Tan-Luu R., Pharmaceutical Experimental Design, Marcel Dekker, New York, 1999.

[51] Repetto M.R., Repetto M., Tabla de concentraciones de xenobióticos en fluidos biológicos humanos como referencia para el diagnóstico toxicológico (versión 2015). en: Repetto M. (ed.), Ampliación de Toxicología de Postgrado 15, CD-ROM. Ilustre Colegio Oficial de Químicos. Sevilla, 2015.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO III. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO

Publicaciones relacionadas:

- Ana M. Ares[1], P. Fernández[2], M. Regenjo[1], A.M. Fernández[3], A.M. Carro[1], R.A. Lorenzo[1], A fast bioanalytical method based on microextraction by packed sorbent and UPLC-MS/MS for determining new psychoactive substances in oral fluid, *Talanta*. 2017, *174*, 454-461.

  Factor de impacto (2017): 4.244
  Cuartil (2017): Q1 (posición 10/81)
  Nº citas (Web of Science) (2021): 36
  Nº citas (SCOPUS) (2021): 37
  Nº citas Google Académico (2021): 42
  PMID: 28738608
  DOI: 10.1016/j.talanta.2017.06.022

[1] *Departamento de Química Analítica, Facultad de Química e Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España.*

[2] *Instituto de Ciencias Forenses, Servicio de Toxicología Forense, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España.*

[3] *Unidad de Asistencia a las Drogodependencias, Monforte de Lemos, 27400 Lugo, España.*

Declaración de contribución de autoría:

- A.M. Ares-Fuentes: Investigación, Validación, Análisis formal, Visualización, Escritura-borrador original.

Presentación a congresos relacionados con este capítulo:

Póster: "Fast determination of twenty-one synthetic cathinones and other drugs of abuse in oral fluid by microextraction and UPLC-MS/MS", 18th International Symposium on Advances in Extraction Tehcnologies (ExTech), 3-6 julio 2016, Torun (Polonia).

Póster: "Microextraction techniques in the determination of new synthetic psychostimulants in biological fluids", 6th EuCheMs, 11-15 septiembre 2016, Sevilla (España).

Póster: "Aplicación del diseño experimental a la optimización de la Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) para el análisis de drogas de abuso en humor vítreo", XXII Encontro Luso-Galego Química, 9-11 noviembre 2016, Bragança (Portugal). ISBN 978-989-8121-17-3.

Oral: "Optimización dun método analítico para a extracción de drogas de abuso en fluido oral", V Encontro Mocidade Investigadora, 12-13 junio 2017, Santiago de Compostela (España).

Póster: "Aplication of dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) for determination of illicit drugs in vitreous humor", 19th International Symposium on Advances in Extraction Technologies (ExTech) 27-30 junio 2017, Santiago de Compostela (España).

Póster: "Aplicación de la Microextracción con Adsorbentes Empaquetados (MEPS) al análisis de sustancias psicotrópicas en matrices biológicas", XXI Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica (SEQA), 5-7 septiembre 2017, Valencia (España).

Oral: "Optimización de la microextracción con adsorbentes empaquetados (MEPS) para la extracción de drogas de abuso en fluidos biológicos", Jornada de Actualización en Toxicología Forense, 24 mayo 2018, Santiago de Compostela (España).

Oral: "Presenza de novas substancias psicoactivas e o seu interese en Toxicoloxía Analítica", VI Encontro da Mocidade Investigadora, 30-31 mayo 2018, Santiago de Compostela (España).

Oral: "Técnicas de preparación de muestra en Toxicología Analítica Forense", XXII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica (SEQA), 17-19 julio 2019, Valladolid (España).

D. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN HUMOR VÍTREO.

4.1. INTRODUCCIÓN

El OEDT publica anualmente el *Informe Europeo sobre Drogas*, con las actuales tendencias de cada clase de sustancias psicoactivas que monitoriza. De acuerdo con los últimos informes publicados, la cocaína es la segunda sustancia ilícita más consumida en Europa [1-3], aumentando su consumo y el número de incautaciones en los últimos años [1, 2]. En cuanto a los opioides, la heroína se sitúa como el opioide predominante [1-3]. Por ello, la monitorización de compuestos como la morfina o el principal metabolito de la heroína, 6-monoacetilmorfina, es necesario para detectar el consumo de este compuesto. Además, también se detectó un consumo abusivo de otros opioides como metadona o buprenorfina, entre otros [2]. Se calcula que el Sistema de Alerta Temprana de la Unión Europea (EWS) detecta por primera vez al año más de 50 nuevas sustancias psicoactivas (NSP). Hasta finales de octubre de 2020, 820 NSP fueron monitorizadas, de las cuales, 53 de ellas fueron detectadas por primera vez en Europa en 2019 y 38 sustancias que fueron notificadas en 2020 [1, 4]. Las catinonas sintéticas junto con los cannabinoides sintéticos son las NSP más incautadas en Europa, que en conjunto representaron el 77% de las incautaciones totales notificadas en 2018 [1]. Se detectaron por primera vez en 2004 y desde entonces, se han detectado una gran cantidad de estas sustancias con un total de 130 hasta 2017 [3].

El humor vítreo (HV) es un gel acuoso ubicado en la cavidad posterior del ojo, situado entre el cristalino y la retina [5]. Está compuesto en su mayoría por agua y un pequeño porcentaje de proteínas, electrolitos, carbohidratos y glicosaminoglicanos, como el ácido hialurónico [6, 7]. Como matriz biológica presenta numerosas ventajas como el pequeño porcentaje de proteínas, comparada con la orina o la sangre. Además, los fármacos y/o drogas junto a sus metabolitos permanecen relativamente estables durante el intervalo postmortem, debido a su entorno aislado evitando la contaminación bacteriana o los efectos de la putrefacción. Por ello, el HV es utilizado como una matriz biológica alternativa a la sangre en casos de análisis toxicológicos postmortem, donde la muestra de sangre no está disponible o es limitada [5, 7]. Durante años, el HV se ha utilizado para determinar concentraciones etílicas, puesto que la fermentación postmortem no es significativa en el ojo [6]. Por otro lado, las concentraciones que había en la sangre circulante una o dos horas antes de la muerte pueden reflejarse en esta matriz. En general, los compuestos más liposolubles e hidrofílicos, y menos susceptibles a la unión a proteínas son los que pasan de la sangre al humor vítreo por difusión pasiva [5]. Además, los compuestos alcalinos alcanzan concentraciones más altas en el HV, puesto que es un fluido más ácido que el plasma [7]. En los últimos años, esta matriz biológica se ha utilizado en el análisis de drogas incluyendo anfetaminas [5], cocaína [5, 8,], cannabinoides [5], opioides [8-11], antidepresivos [12] y benzodiacepinas [13, 14]. Sin embargo, consultando la bibliografía existente hasta la fecha, existen pocos métodos publicados para la determinación de catinonas en este tipo de muestra. Adamowicz *et al*. [15] publicaron un trabajo en el que cuantificaban mefedrona en sangre y humor vítreo. Novawk *et al*. [16] estudiaron la estabilidad de 4-clorometcatinona en sangre y humor vítreo. El HV no suele requerir una preparación de muestra complicada, debido a su carácter acuoso con bajo contenido de proteínas. Las técnicas clásicas de extracción como la LLE o la SPE son las más utilizadas [7]. Sin embargo, la dificultad de obtener un volumen suficiente de muestra de HV, tanto para la validación de los métodos analíticos

como para sus aplicaciones analíticas, ha facilitado que surjan nuevas estrategias. En las últimas décadas, la tendencia a miniaturizar estas técnicas de extracción convencionales provocó el desarrollo de nuevas técnicas de microextracción, como la microextracción líquido-líquido dispersiva. La DLLME es una miniaturización de la LLE introducida por Rezaee *et al*. en 2006 [17]. Esta técnica ha sido ampliamente usada para la determinación de drogas de abuso [18], como opioides [19], cocaína [20], cannabinoides [21] o benzodiacepinas [22], y más recientemente de catinonas [23] en distintas matrices biológicas. Sin embargo, no se han encontrado referencias sobre la determinación simultánea de catinonas junto a drogas de abuso, como cocaína y opioides, en HV mediante DLLME. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido desarrollar un método de determinación de varias drogas de abuso (incluyendo catinonas, cocaína y los marcadores del consumo de heroína) usando DLLME y cromatografía de ultra resolución (UHPLC) con detector de red de diodos (DAD).

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. COMPUESTOS Y REACTIVOS

Los patrones comerciales de morfina, 6-monoacetilmorfina (6-MAM), cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina (BEG), metadona, 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP), 3,4-metilenedioxipirovalerona (MDPV), mefedrona, metilona, buprenorfina, pentedrona, *N*-etilcatinona y pirovalerona fueron proporcionados por Cerillant (Round Rock, TX, Estados Unidos); tetrazepam, usado como patrón interno (IS), fue obtenido de Laboratorios Sanofi Synthelabo (Barcelona, España). Los disolventes en grado gradiente acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH), acetona, isopropanol (IPA), ácido fórmico, tetracloruro de carbono (CCl_4), cloroformo ($C_2H_4Cl_4$) y diclorometano (CH_2Cl_2), y los reactivos fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) e hidróxido sódico (NaOH) fueron comprados a Merck (Darmstadt, Alemania). Cloruro sódico (NaCl) fue comprado a Panreac (Barcelona, España). El agua ultrapura fue purificada mediante un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, Estados Unidos). Los filtros PTFE de 0.22 µm de tamaño de poro fueron obtenidos de Membrane Solutions (Dallas, TX, Estados Unidos).

Las disoluciones madre de cada droga en una concentración de 1 mg/mL en MeOH fueron suministradas como materiales de referencia certificados y almacenados a -20 °C. Se prepararon disoluciones estándar de trabajo para cada compuesto mediante dilución de las disoluciones madre a concentraciones apropiadas en MeOH (100 y 10 µg/mL). Las muestras de control de calidad (QC) se prepararon con 10 mL de humor vítreo blanco (sin la presencia de drogas), enriquecido con una concentración final de 1 µg/mL con los compuestos y el IS, y almacenadas a 4 °C.

4.2.2. MUESTRAS DE HUMOR VÍTREO

Las muestras de humor vítreo blanco (sin presencia de drogas de abuso) y las muestras reales procedentes de posibles casos positivos a estos compuestos fueron recogidas en las autopsias, y enviadas al Laboratorio de Toxicología. Las muestras se obtuvieron por punción directa del ojo y se congelaron a -20 °C hasta su anális. Todas las pruebas se realizaron de acuerdo con los Principios de la Asociación Médica Mundial para la Investigación Médica con Sujetos Humanos [24].

4.2.3. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS CON DLLME

En un tubo de ensayo cónico con tapa se añadieron 0.1 g de NaCl y 1.5 mL de agua Milli-Q, y se adicionaron 500 µL de humor vítreo enriquecido con los estándares y el IS. La mezcla se agitó vigorosamente en vórtex para facilitar la disolución de NaCl, y el pH de la mezcla se ajustó a pH 9 con NaOH (0.5 M). Después, se añadieron a la disolución de la muestra 1.3 mL de acetona (como disolvente dispersante) que contenía 180 µL de cloroformo (como disolvente de extracción). El tubo se sumergió en un baño de ultrasonidos (Selecta®, Barcelona, España) durante 3 minutos, formando una disolución turbia en el tubo. Después de una etapa de centrifugación a 8000 rpm durante 5 min, la fase sedimentada de cloroformo se recogió con una micro jeringa (Hamilton®, Reno, Estado Unidos). La gota extraída se evaporó hasta sequedad bajo una corriente de nitrógeno a 40 °C. Finalmente, el extracto fue reconstituido en 50 µL de fase móvil y 5 µL fueron inyectados en el sistema cromatográfico.

4.2.4. CONDICIONES DEL UHPLC-DAD

Los análisis se llevaron a cabo utilizando un sistema Waters® ACQUITY UPLC H-Class conectado a un detector Waters® ACQUITY *Photodiode Array* (PDA) (Waters, Mildford, MA, Estados Unidos). La separación cromatográfica se realizó en una columna ACQUITY UPLC™ BEH Shield RP18 (100 x 2.1 mm, 1.7 µm de tamaño de partícula) termostatizada a 55 °C. La fase móvil consitió en agua (A) y acetonitrilo (B), ambos acidificados con 0.1% de ácido fórmico y un flujo de 0.4 mL/min. Se utilizó un programa de gradiente en las siguientes condiciones: inicialmente, 90% A, a 3.5 min disminuyó a 30% A, a los 4 min volvió a las condiciones iniciales (90% A) hasta 5.1 min. El detector PDA trabajó realizando un barrido de longitudes de onda entre 200 y 400 nm. Consultando los espectros de absorción de los compuestos a estudiar, se decidió trabajar con las longitudes de onda 235, 252, 260 y 285 nm, correspondientes a los máximos de absorción. Estos máximos de absorción correspondientes a cada compuesto, así como los tiempos de retención fueron los parámetros utilizados para la identificación de los analitos de interés (**Tabla 4.1**).

Tabla 4.1. Propiedades físico-químicas de las drogas de abuso estudiadas.

Compuesto	Clase de compuesto	Fórmula Química	Peso Molecular (g/mol)	pKa*	Log P*	tR (min)	$\lambda_{máx}$ (nm)
Morfina	Opioide	$C_{17}H_{19}NO_3$	285.34	9.48	0.872	0.542	285
Metilona	Catinona	$C_{11}H_{13}NO_2$	207.230	7.74	-0.396	0.804	235
***N*-etilcatinona**	Catinona	$C_{11}H_{15}NO$	177.30	7.14	0.862	0.846	252
6-MAM	Opioide	$C_{19}H_{21}NO_4$	327.37	9.41	1.562	0.951	285
Mefedrona	Catinona	$C_{11}H_{15}NO$	177.24	7.41	0.677	1.199	260
Pentedrona	Catinona	$C_{12}H_{17}NO$	191.27	7.21	1.372	1.692	252
BEG	Alcaloide	$C_{16}H_{19}NO_4$	289.33	3.35, 10.82	2.263	1.952	235

Tabla 4.1. Propiedades físico-químicas de las drogas de abuso estudiadas (*continuación*).

Compuesto	Clase de compuesto	Fórmula Química	Peso Molecular (g/mol)	pKa*	Log P*	tR (min)	$\lambda_{máx}$ (nm)
Cocaína	Alcaloide	$C_{17}H_{19}NO_4$	303.35	8.97	2.275	2.049	235
MDPV	Catinona	$C_{16}H_{21}NO_3$	275.34	8.41	2.430	2.119	235
Cocaetileno	Alcaloide	$C_{18}H_{23}NO_4$	317.38	9.04	2.785	2.312	235
Pirovalerona	Catinona	$C_{16}H_{23}NO$	245.36	8.22	3.503	2.376	260
EDDP	Opioide	$C_{20}H_{23}N$	277.40	7.71	5.363	2.655	260
Buprenorfina	Opioide	$C_{29}H_{41}NO_4$	467.65	9.47	2.826	2.696	285
Metadona	Opioide	$C_{21}H_{27}NO$	309.45	9.05	3.930	2.863	260
Tetrazepam (IS)	Benzodiacepina	$C_{16}H_{17}ClN_2O$	288.80	4.10	2.620	3.614	230

tR: tiempos de retención; $\lambda_{máx}$: máximos de longitud de onda. * Valores de pKa y log P proporcionadas por *SciFinder database*.

4.2.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Como todo método analítico desarrollado, se debe llevar a cabo un proceso de validación para demostrar que el método cuenta con capacidades consistentes requeridas para la aplicación en la que se propone utilizar, y su fiabilidad a la hora de determinar los compuestos seleccionados. La validación del método desarrollado se llevó a cabo mediante las recomendaciones de las guías internacionales de validación de la FDA e ICH [25, 26]. Dicha validación se evaluó en términos de selectividad, linealidad, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), precisión y exactitud (en términos de recuperación relativa), y efecto matriz. La selectividad fue evaluada mediante la comparación de cromatogramas de muestras de humor vítreo libre de drogas de abuso, y cromatogramas correspondientes a la adición de 1 µg/mL de los compuestos a muestras blanco de humor vítreo. El estudio de la linealidad se llevó a cabo construyendo rectas de calibrado de adición estándar para cada compuesto usando muestras blanco de humor vítreo fortificadas en el rango de concentraciones de LOQ-ULOQ, dependiendo del compuesto. Cada nivel de concentración fue analizado por triplicado y se trazó la relación entre el área del pico cromatográfico de cada analito y el de IS. Los LOD y LOQ de cada compuesto fueron calculados como la concentración más baja con una relación señal-ruido de 3 y 10, respectivamente. La precisión (expresada como %RSD) fue evaluada usando muestras QC a tres concentraciones (nivel bajo, nivel medio y nivel alto, que variaron para cada compuesto estudiado). La precisión intra-día se determinó analizando 6 replicados por nivel de concentración en el mismo día y la precisión inter-día al analizar las muestras QC en los tres niveles de concentración anteriores por duplicado diariamente durante tres días consecutivos. La exactitud, en términos de porcentaje de recuperación, se evaluó mediante el uso de cuatro replicados de muestras QC por nivel de concentración considerado. El efecto matriz se estudió calculando la relación entre la pendiente de la curva de calibrado para cada compuesto estudiado después de la adición de analitos post-extracción (una muestra blanco de humor vítreo sometida al

procedimiento US-DLLME, y posteriormente fortificada con los compuestos), y la pendiente de la curva de calibrado en la fase móvil, utilizando la siguiente ecuación [27]:

$$EM\ (\%) = \left(\frac{pendiente\ adición\ postextracción}{pendiente\ fase\ móvil}\right) x\ 100$$

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Con el fin de lograr las mejores condiciones de separación cromatográfica, en términos de forma de pico cromatográfico y resolución de todos los compuestos estudiados, se han evaluado diferentes composiciones de fase móvil a diferentes temperaturas: acetonitrilo/tampón fosfato 1 mM con diferentes valores de pH (pH 3, 5, 6.5 y 8) a 45 ºC; acetonitrilo/agua, ambos con 0.1% de ácido fórmico a 35, 45 y 55 ºC; y metanol/agua, ambos con 0.1% ácido fórmico a 45 ºC (**Figura 4.1**).

La fase móvil formada por acetonitrilo/agua acidificada ambos con 0.1% de ácido fórmico a 55 ºC es la que proporciona la mejor separación de los compuestos estudiados y la mejor forma de pico cromatográfico, ya que, con las otras fases estudiadas, algunos de los analitos presentan mala resolución y/o mala forma de la señal cromatográfica. Queda demostrada la influencia del pH y la temperatura en el proceso de separación cromatográfica de estos compuestos.

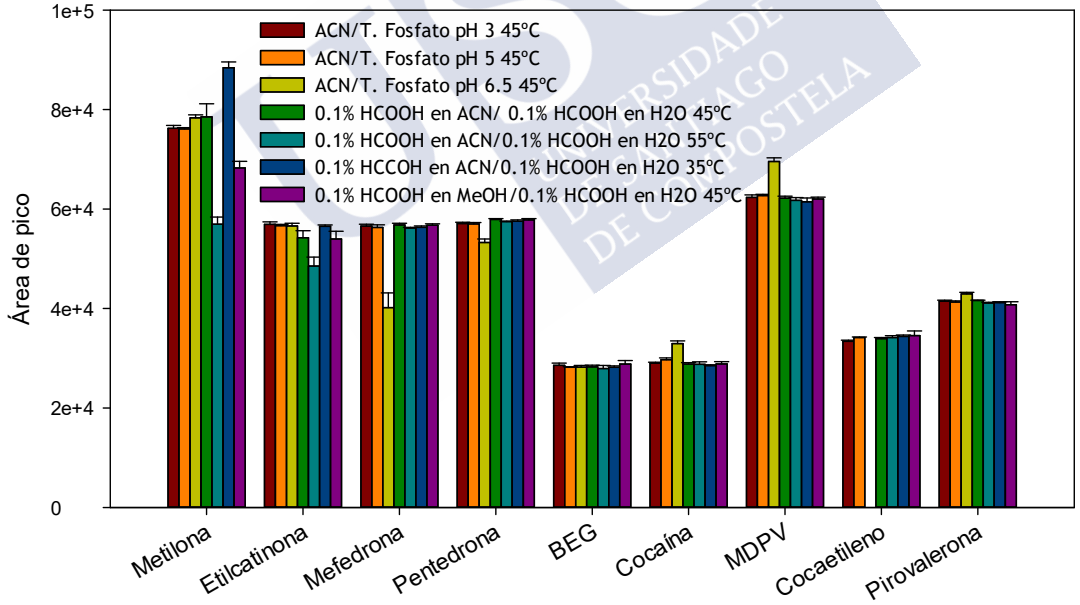


Figura 4.1. Estudio de las distintas fases móviles (n=3).

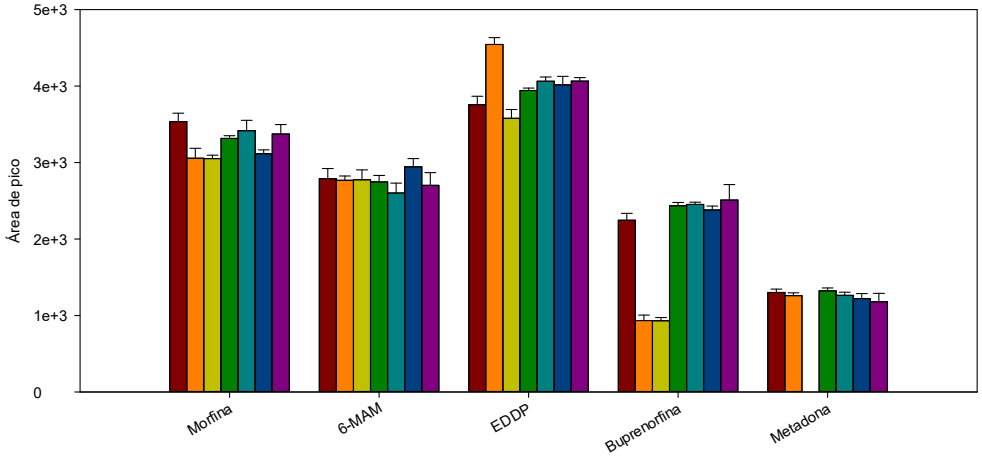


Figura 4.1. Estudio de las distintas fases móviles (n=3) (*continuación*).

4.3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN

4.3.2.1. OPTIMIZACIÓN DEL DISOLVENTE DISPERSANTE Y EXTRACTANTE

Se han estudiado diferentes disolventes de dispersión basándose en su miscibilidad con la fase acuosa y el disolvente de extracción, tales como: acetonitrilo, acetona, isopropanol y metanol. Para ello, se añadieron 0.5 mL de humor vítreo que contenía los compuestos a una concentración de 0.5 µg/mL, en un tubo cónico que contenía 1.5 mL de agua ultrapura. A continuación, se añadieron 2 mL del disolvente dispersante estudiado, conteniendo 100 µL de cloroformo (como disolvente de extracción) a la mezcla acuosa de HV. La disolución se agitó en un baño de ultrasonidos durante 5 min y se centrifugó a 3500 rpm durante 8 minutos. La gota de cloroformo formada en la parte inferior del tubo se recogió con una microjeringa y se evaporó a 40 °C bajo una corriente de nitrógeno. El extracto evaporado se reconstituyó con 50 µL de la fase móvil y se inyectó en el sistema UPLC. A partir de los resultados obtenidos, se observa que no se logra una buena separación cromatográfica de los compuestos utilizando acetonitrilo como disolvente dispersante. Utilizando isopropanol, se obtienen las mayores áreas para 6-MAM y BEG. Sin embargo, no fue posible extraer morfina. Empleando metanol como dispersante, no se ha podido cuantificar MDPV. La acetona muestra los mejores resultados de extracción para casi todos los analitos, excepto 6-MAM y BEG, aunque fue posible cuantificar todos los compuestos. Por ello, se ha establecido acetona como disolvente dispersante (**Figura 4.2**).

El disolvente extractante debe de presentar ciertas características para su uso en DLLME tales como, ser más denso que el agua, tener alta capacidad de extracción de los compuestos, baja solubilidad en agua y bajo punto de ebullición [28]. Se evaluaron: diclometano, dicloetano, cloroformo y tetracloruro de carbono. El procedimiento realizado es el mismo que en el estudio del disolvente de dispersión, utilizando acetona como disolvente dispersante y 100 µL de cada disolvente extractante estudiado. Los resultados obtenidos (**Figura 4.3**) indican que el dicloetano es el disolvente que menores áreas de pico proporciona para todos los compuestos, excepto etilcatinona, para el cual resulta el mejor disolvente extractante. El diclorometano proporciona los mejores resultados para buprenorfina y para BEG, mientras que el tetracloruro de carbono lo hace para metadona. El cloroformo es el disolvente que proporciona mejores resultados (áreas

de pico) para la mayoría de los compuestos, sobre todo para morfina, aspecto a considerar ya que se trata del compuesto que tiene la menor señal cromatográfica. Por lo tanto, el cloroformo es el disolvente seleccionado como extractante para posteriores experimentos.

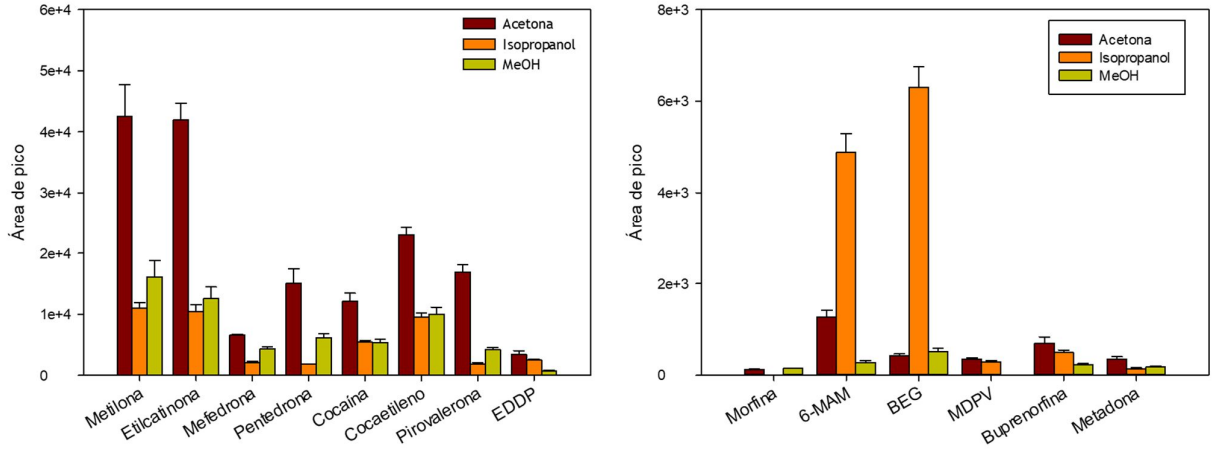


Figura 4.2. Estudio de los disolventes dispersantes en DLLME (n=3).

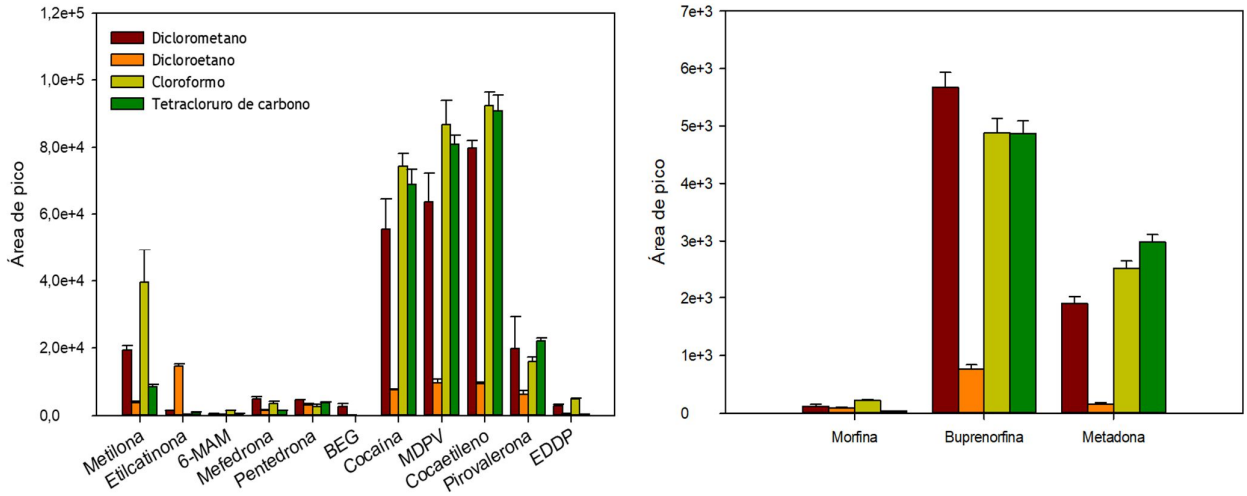


Figura 4.3. Estudio de los diferentes disolventes de extracción (n=3).

4.3.2.2.DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño de screening ($2^2 3^3 4^1$//16) para estudiar la influencia de varios factores en la eficacia del proceso de DLLME [29, 30]. En el diseño se estudiaron seis variables: dos factores a dos niveles (adición de sal y volumen de muestra), tres factores a tres niveles (volumen de dispersante, volumen de extractante y tiempo de ultrasonidos) y un factor a cuatro niveles (pH). Estos experimentos se llevaron a cabo de forma aleatoria para evitar los efectos de otras variables no controladas y supusieron 16 experimentos en total (**Tabla 4.2**).

Tabla 4.2. Plan de experimentación del diseño de *screening* asimétrico.

Nº de experimento	Orden aleatorio	Sal (g)	Volumen muestra (mL)	Volumen dispersante (mL)	Volumen extractante (µL)	Tiempo ultrasonidos (min)	pH
1	15	0	0.25	0.5	50	1	7
2	4	0	0.25	1	75	2	8
3	12	0	0.25	1.5	100	3	9
4	16	0	0.25	0.5	50	1	10
5	9	0.1	0.25	0.5	75	3	10
6	14	0.1	0.25	1	50	1	9
7	13	0.1	0.25	1.5	50	1	8
8	1	0.1	0.25	0.5	100	2	7
9	11	0	0.5	0.5	100	1	8
10	7	0	0.5	1	50	3	7
11	5	0	0.5	1.5	50	2	10
12	10	0	0.5	0.5	75	1	9
13	2	0.1	0.5	0.5	50	2	9
14	8	0.1	0.5	1	100	1	10
15	6	0.1	0.5	1.5	75	1	7
16	3	0.1	0.5	0.5	50	3	8

Se utilizó el software estadístico *NemrodW*® para generar y evaluar el diseño. Los resultados se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y las gráficas de Pesos Delta y Efectos Totales. Los compuestos morfina, metilona, 6-MAM, pentedrona y metadona fueron estadísticamente significativos en un intervalo de confianza del 95% ($p<0.05$). El gráfico de Pesos Delta representa los efectos relativos en la respuesta de cada compuesto, al producirse un cambio en la variable. La importancia del efecto es proporcional a la longitud de la barra. La disposición de la barra hacia la derecha indica un efecto positivo mientras que, el efecto es negativo si la barra está dispuesta hacia la izquierda. Las líneas punteadas verticales indican los límites de significación estadística. Los gráficos de Efectos Totales representan el efecto de cada nivel de un factor en la respuesta estudiada y también son proporcionales a la longitud de la barra. A modo de ejemplo, la **Figura 4.4** muestra gráficamente los resultados obtenidos para metilona. En ella se observa que todos los factores presentaron significancia estadística con algún cambio de nivel. Ningún factor fue estadísticamente significativo para etilcatinona, mefedrona, pirovalerona y buprenorfina. La adición de NaCl (b_1) fue estadísticamente

significativo para metilona y pentedrona. Además, en la mayoría de los casos, la influencia de la fuerza iónica mejora la eficiencia de extracción. Por tanto, se decidió añadir 0.1 g de NaCl en el procedimiento de DLLME. El volumen de muestra (b_2) fue estadísticamente significativo para nueve compuestos. Este hecho, revela que aumentar el volumen de muestra de 0.25 a 0.5 mL conduce a mejores resultados de extracción para todos los compuestos estudiados. El tiempo de ultrasonidos (b_5) solo fue estadísticamente significativo para metilona y pentedrona. Un tiempo de agitación de 3 min en baño de ultrasonidos fue adecuado para la extracción de todas las drogas. El pH de la muestra (b_6) fue estadísticamente significativo para morfina, metilona y pentedrona. Un pH 9 fue el valor más adecuado para la extracción de los compuestos, excepto pentedrona, BEG, MDPV, pirovalerona y buprenorfina, que se extraían de manera más eficaz a pH 7. El volumen de dispersante (b_3) fue estadísticamente significativo para morfina, metilona, 6-MAM, pentedrona, cocaína, MDPV, cocaetileno y metadona. El volumen de extractante (b_4) fue estadísticamente significativo para morfina, metilona, 6-MAM, pentedrona y BEG. Sin embargo, las condiciones operacionales de estos dos factores (b_3 y b_4) no pudieron establecerse debido a los diferentes resultados obtenidos. Un volumen de dispersante de 0.5 mL fue adecuado para algunas drogas como morfina, metilona, 6-MAM o pentedrona. En cambio, un valor de 1 mL fue mejor para cocaína, MDPV, cocaetileno o metadona. De manera similar, un nivel de volumen de extractante de 100 µL fue adecuado para morfina, 6-MAM, pentedrona o BEG; mientras que para pirovalerona, metilona y etilcatinona fueron mejores 75 µL, o 50 µL para mefedrona. Por esta razón estos dos parámetros se optimizaron mediante un diseño de superficie de respuesta.

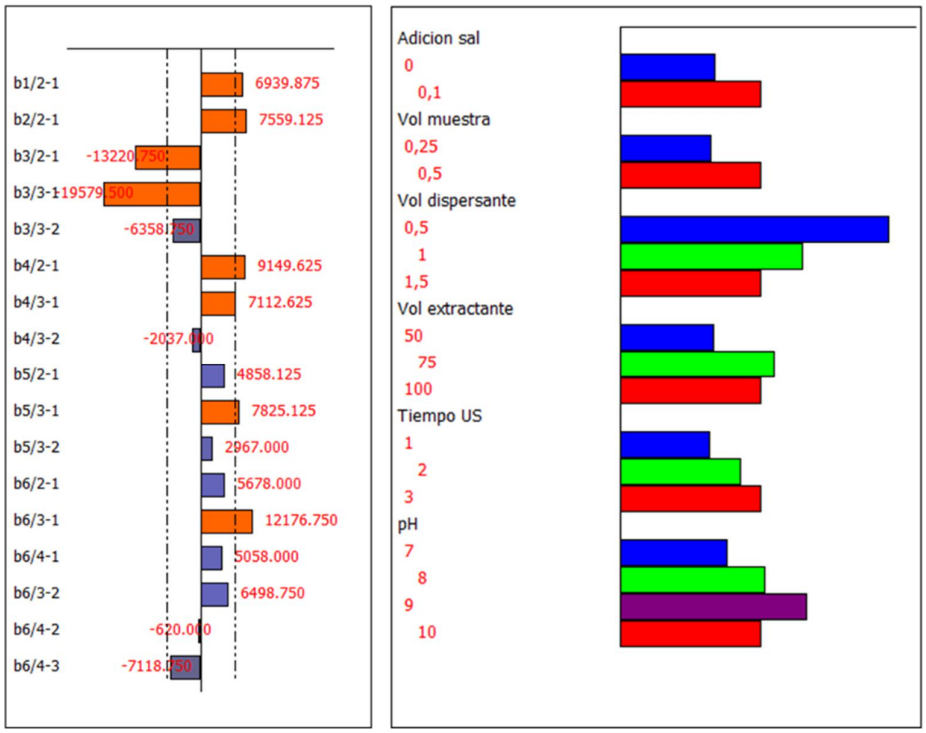


Figura 4.4. Gráficos Pesos Delta (*izquierda*) y Efectos Totales (*derecha*) para metilona.

Para estudiar la influencia de los volúmenes de dispersante y extractante, se utilizó un diseño central compuesto (CCD). Este diseño está formado por un diseño factorial

completo de base 2^2 más cuatro experimentos en posición axial ubicados a una distancia de α=1.414 del centro del dominio y 3 puntos centrales, para obtener una estimación del error experimental, lo que permite evaluar la precisión del diseño [30]. El estudio de 2 factores mediante un CCD, utilizando el programa *NemrodW*®, implica estudiar estos factores a 5 niveles en 11 experimentos, realizados de forma aleatoria para evitar los efectos de otras variables no considerdas (**Tabla 4.3**). Con este diseño se han obtenido los coeficientes del modelo matemático para cada respuesta, mediante regresión lineal:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^{n} b_i x_i + \sum_{i=1}^{n} b_{ii} x_{ii}^2 + \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{n} b_{ij} x_i x_j$$

donde x_i es el factor estudiado e y es la respuesta obtenida (área de pico cromatográfico). Los coeficientes polinomiales estimados se representan como: b_0, la respuesta media para todas las experiencias, b_i, el efecto principal para cada parámetro, b_{ii}, los términos cuadráticos asociados a los efectos de curvatura del modelo y $b_{ij\ (i\neq j)}$, la interacción entre factores.

Tabla 4.3. Dominio experimental y plan de experimentación del diseño CCD.

Factor	Centro	Paso de variación	N° de experimento	Orden aleatorio	Volumen dispersante (mL)	Volumen extractante (µL)
Volumen dispersante	1.0	0.3	1	7	0.7	72
Volumen extractante	125	53	2	11	1.3	72
			3	8	0.7	178
			4	5	1.3	178
			5	3	0.6	125
			6	4	1.4	125
			7	10	1.0	50
			8	9	1.0	200
			9	1	1.0	125
			10	2	1.0	125
			11	6	1.0	125

La regresión del modelo fue validada por ANOVA. Metilona y etilcatinona fueron estadísticamente significativos a un nivel de confianza del 99.9% ($p<0.001$) y 6-MAM, cocaína, MDPV, cocaetileno y EDDP también fueron estadísticamente significativos a un nivel de confianza del 95% ($p<0.05$). La **Figura 4.5** muestra los gráficos de superficie de respuesta para metilona y buprenorfina. Para metilona, la mejor extracción con DLLME se obtiene para niveles altos de los dos factores estudiados (**Figura 4.5a**). Esta misma tendencia también se observó para etilcatinona, mefedrona, pentedrona, MDPV,

prirovalerona y EDDP. Sin embargo, en el caso de buprenorfina (**Figura 4.5b**), la mejor respuesta se obtiene con valores altos de volumen de dispersante y valores bajos de volumen de extractante; al igual que en el caso de metadona. Este tipo de variabilidad para los niveles de los factores se observó en otros compuestos. Para 6-MAM, los valores intermedios-bajos de volumen de dispersante con valores altos del volumen de extractante fueron más adecuados. Algo similar sucedió con cocaína y morfina. Para cocaetileno, los niveles intermedios-altos de ambos factores fueron más adecuados en el proceso de DLLME. Ante este comportamiento variable de la DLLME para las diferentes familias de compuestos estudiados, se ha utilizado un algoritmo matemático basado en funciones de deseabilidad (no lineal y unilateral izquierda para maximizar cada respuesta) para obtener unas condiciones óptimas para estos dos factores estudiados que permitan la extracción simultánea de los analitos. Este algoritmo lo proporciona el programa *NemrodW*® y no requiere experimentación adicional. Está basado en la conversión de cada respuesta y_i en la correspondiente función de deseabilidad individual d_i que puede variar entre 0 y 1, en función de la lejanía o de la proximidad de la respuesta a un valor deseado. A partir de la media geométrica de las funciones de deseabilidad individuales se obtiene la deseabilidad global (D). La **Figura 4.5c** muestra la función de deseabilidad global en 3 dimensiones, donde hay áreas en las que la deseabilidad es cero (zona fucsia) hasta su valor más alto de 1 (zona roja), correspondiente al área de interés, y donde los valores para el volumen de dispersante y extractante son óptimas. Este tipo de optimización numérica proporciona los valores óptimos de ambos factores: 1.3 mL de volumen de dispersante y 180 µL de volumen de extractante.

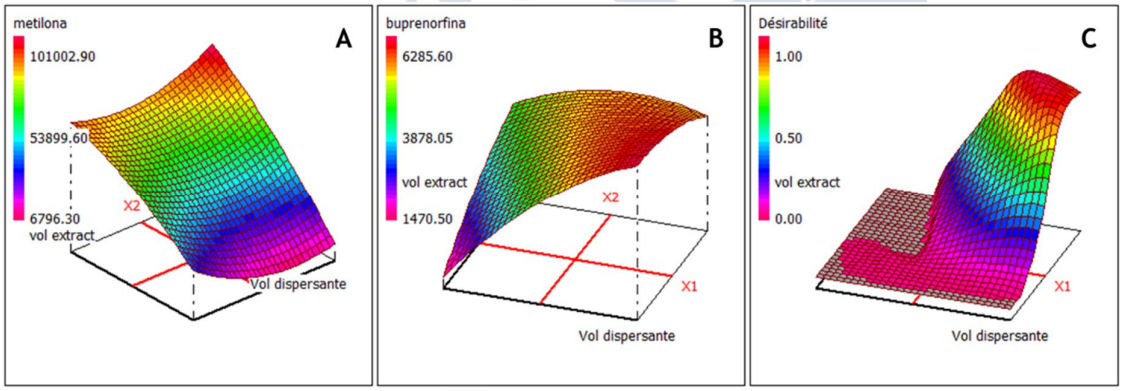


Figura 4.5. Gráficos de superficie de respuesta para metilona (A), buprenorfina (B) y función de deseabilidad en 3D (C).

Durante este diseño, no se han podido obtener respuestas para BEG, posiblemente debido al pH básico fijado en el primer diseño (pH 9). Este compuesto, a diferencia del resto de los analitos, es un compuesto zwitterión. Tiene un pKa ácido de 3.35 y un pK básico de 10.82, y a pH 9 está en la forma ionizada (en disolución básica, la amina terciaria está desprotonada, formando la forma aniónica), por lo que no se extrae favorablemente (ver **Tabla 4.1**). Por ello, se realizaron experiencias posteriores a los diseños y en las condiciones óptimas obtenidas para el resto de los factores (0.5 mL de muestra, 0.1 g de NaCl, 3 min de US, 1.3 mL de dispersante y 180 µL de extractante) estudiando la respuesta a pH 7 (pH más adecuado para este compuesto) y pH 9 (pH establecido por el diseño de *screening* para la mayoría de los compuestos). Los resultados obtenidos muestran que el pH 9 es el óptimo para la mayoría de los compuestos, excepto para mefedrona, pentedrona y BEG. En el caso de BEG, tal y como se puede observar en

la **Figura 4.6**, no existe mucha diferencia utilizando uno u otro pH, por lo que se estableció finalmente, un pH alcalino (pH 9) para el procedimiento de DLLME.

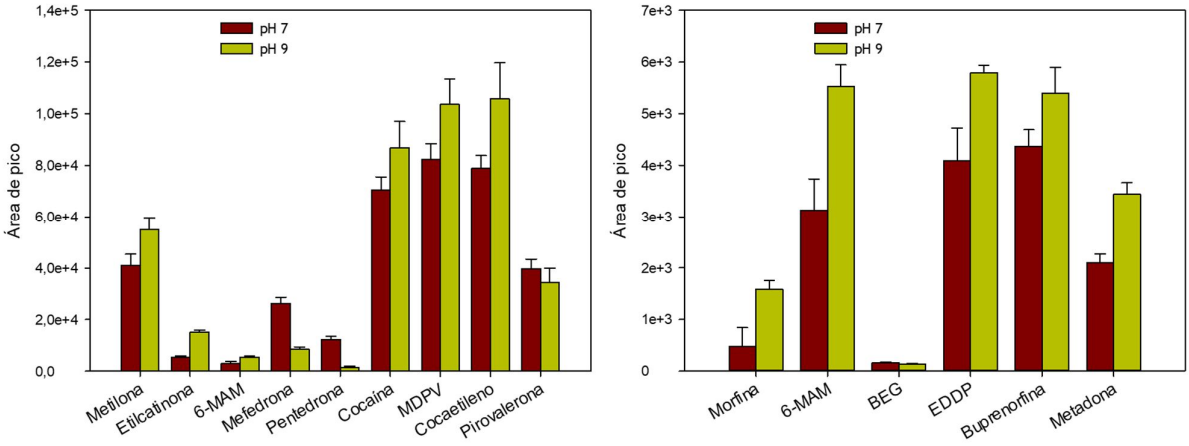


Figura 4.6. Estudio del pH en las condiciones óptimas (n=3).

4.3.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

El método propuesto de UA-DLLME-UHPLC-DAD fue validado en términos de selectividad, linealidad, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), efecto matriz, precisión y exactitud (en términos de recuperación), siguiendo las directrices de las guías internacionales de validación de la FDA e ICH [25, 26].

La selectividad se evaluó como la ausencia de señal de analito en una muestra blanco. Para ello, se analizaron cuatro muestras blanco de humor vítreo procedentes de diferentes fuentes. Los cromatogramas se compararon con un cromatograma de una muestra enriquecida con los compuestos a 1 µg/mL a los tiempos de retención de los analitos. Como se puede observar en la **Figura 4.7**, no existen compuestos interferentes a los tiempos de retención de los compuestos estudiados.

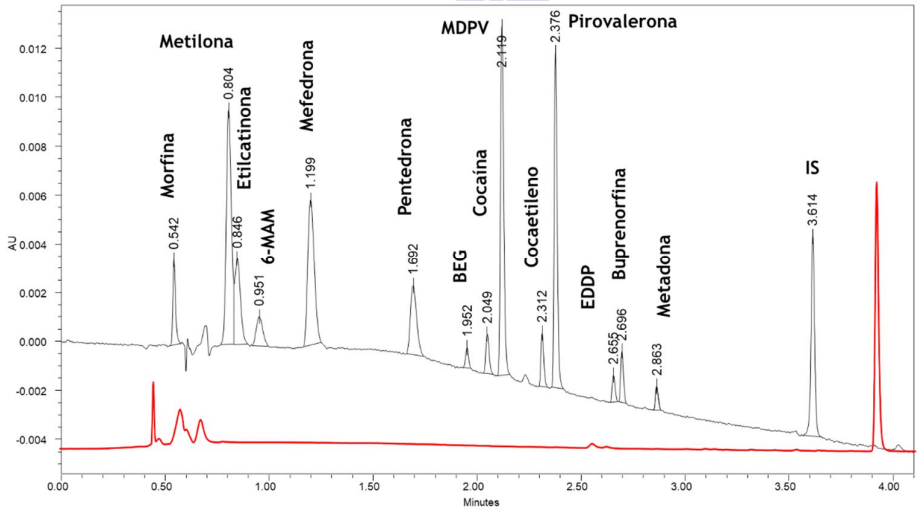


Figura 4.7. Cromatogramas de una muestra de humor vítreo blanco (*rojo*) y una muestra de humor vítreo blanco adicionado a 1 µm/mL de concentración de cada compuesto (*negro*) a 285 nm.

La linealidad se estudió estableciendo curvas de calibración al agregar analitos a muestras blanco de humor vítreo y utilizando IS, en el rango de 0.5-10 µg/mL para morfina y BEG; 0.05-2.5 µg/mL para metilona, mefedrona y pentedrona; 0.01-2.5 µg/mL para etilcatinona, cocaína y cocaetileno (1 µg/mL IS); 0.1-5 µg/mL para EDDP, buprenorfina y metadona, y 0.01-5 µg/mL para 6-MAM, MDPV y pirovalerona (0.5 µg/mL) para IS). Todos los niveles de concentración se inyectaron por triplicado. La linealidad fue satisfactoria, presentando coeficientes de determinación mayores a 0.9906 (**Tabla 4.4**). Los LOD variaron de 5 a 50 ng/mL, excepto para morfina y BEG (250 ng/mL). Los LOQ variaron de 10 a 100 ng/mL, excepto para morfina y BEG (500 ng/mL). El efecto matriz se calculó a partir de la ecuación de la *sección 5.2.5*. Se considera que no existe un efecto de la matriz si se obtiene un valor próximo al 100%, mientras que, a valores inferiores al 80% indican la presencia de efecto matriz. Los valores obtenidos recogidos en la **Tabla 4.4** muestran que existe un efecto matriz para todos los compuestos analizados, por lo que se ha utilizado la calibración de adición estándar para la cuantificación de las muestras. La precisión intra- e interdía se calculó a partir de las muestras QC a tres concentraciones (baja, media y alta): 0.1, 0.25 y 1 µg/mL para metilona, etilcatinona, mefedrona, pentedrona, cocaína y cocaetileno; 0.5, 2.5 y 7 µg/mL para morfina y BEG, y 0.25, 1 y 5 µg/mL para 6-MAM, MDPV, pirovalerona, EDDP, buprenorfina y metadona. Todos los resultados fueron inferiores a los criterios de aceptación (<15% RSD). Las recuperaciones se evaluaron a dos niveles de concentración (0.5 y 2.5 µg/mL) para cada compuesto (n=4). Las concentraciones obtenidas para los extractos en humor vítreo se compararon con las concentraciones añadidas. Las recuperaciones fueron próximas al 100 % para la mayoría de los compuestos estudiados, excepto para tres catinonas (etilcatinona, mefedrona y pentedrona), para las cuales se obtuvieron valores inferiores al 64%. En la **Tabla 4.5** se comparan diferentes trabajos encontrados en bibliografía para la determinación de algunos de los analitos estudiados en este trabajo. Se puede observar que la técnica DLLME se ha empleado en diferentes determinaciones aplicadas a matrices diferentes, aunque no se han encontrado trabajos para la determinación de catinonas en humor vítreo.

Tabla 4.4. Validación del método US-DLLME.

Compuesto	Linealidad				LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	EM (%)	Precisión intra-día (% RSD) (n=6)			Precisión inter-día (% RSD) (n=6)			Exactitud (% recuperación ± SD) (n=4)	
	Rango lineal (µg/mL)	Pendiente	Ordenada en el origen	R^2				Nivel Bajo[a]	Nivel Medio[b]	Nivel Alto[c]	Nivel Bajo[a]	Nivel Medio[b]	Nivel Alto[c]	0.5 µg/mL	2.5 µg/mL
Morfina	0.5-10	0.0089	-0.0026	0.9952	250	500	78.2	8.2	5.6	5.4	6.1	6.5	4.8	83 ± 11	100 ± 14
Metilona	0.05-2.5	0.3112	-0.0180	0.9924	25	50	26.2	11.9	10.0	11.0	9.8	9.4	6.5	106 ± 8	107 ± 7
Etilcatinona	0.01-2.5	0.3866	-0.0192	0.9939	5	10	18.6	8.2	14.1	9.3	8.2	8.7	14.9	37 ± 1	26± 6
6-MAM	0.01-5	0.1220	0.0038	0.9957	5	10	64.1	5.8	11.2	10.1	6.4	8.4	7.2	88 ±5	95 ± 25
Mefedrona	0.05-2.5	0.6089	-0.0400	0.9969	25	50	65.6	5.4	8.2	2.9	4.7	10.3	14.6	60 ± 4	43 ± 11
Pentedrona	0.05-2.5	0.4419	-0.0282	0.9935	25	50	76.4	742	5.6	3.4	6.5	7.3	10.2	64 ± 13	33 ± 10
BEG	0.5-10	0.0053	-0.0028	0.9923	250	500	75.1	8.9	12.5	6.9	10.7	7.6	3.8	101 ± 3	59 ± 3
Cocaína	0.01-2.5	0.4070	-0.0226	0.9906	5	10	75.4	4.5	9.1	4.5	10.4	8.0	4.4	91 ± 8	105 ± 4
MDPV	0.01-5	1.3771	-0.0181	0.9959	5	10	75.6	5.6	7.2	9.2	6.2	8.2	5.6	114 ± 4	99 ± 5
Cocaetileno	0.01-2.5	0.6640	-0.0391	0.9916	5	10	75.2	4.8	6.3	4.3	9.3	8.6	4.3	87 ± 1	90 ± 10
Pirovalerona	0.01-5	3.2832	-0.3344	0.9908	5	10	76.7	12.1	8.4	12.4	10.6	9.0	9.4	76 ± 11	51 ± 4
EDDP	0.1-5	0.5109	-0.0345	0.9973	50	100	75.7	10.1	6.4	12.8	12.2	7.7	6.8	104 ± 8	101 ± 13

Tabla 4.4. Validación del método US-DLLME (*continuación*).

Compuesto	Linealidad				LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	EM (%)	Precisión intra-día (% RSD) (n=6)			Precisión inter-día (% RSD) (n=6)			Exactitud (% recuperación ± SD) (n=4)	
	Rango lineal (µg/mL)	Pendiente	Ordenada en el origen	R^2				Nivel Bajo[a]	Nivel Medio[b]	Nivel Alto[c]	Nivel Bajo[a]	Nivel Medio[b]	Nivel Alto[c]	0.5 µg/mL	2.5 µg/mL
Buprenorfina	0.1-5	0.2284	-0.0154	0.9990	50	100	77.8	4.7	14.8	8.8	7.2	4.9	9.4	86 ± 9	110 ± 5
Metadona	0.1-5	0.1446	-0.0222	0.9920	50	100	78.3	5.2	13.9	12.2	5.6	5.1	8.3	74 ± 4	99 ± 8

[a]Nivel bajo: LOQ; [b]Nivel medio: 250 ng/mL metilona, etilcatinona, mefedrona, pentedrona, cocaína y cocaetileno; 2500 ng/mL morfina y BEG; 1000 ng/mL 6-MAM, MDPV, pirovalerona, EDDP, buprenorfina y metadona; [c]Nivel alto:1000 ng/mL metilona, etilcatinona, mefedrona, pentedrona, cocaína y cocaetileno; 7000 ng/mL morfina y BEG; 5000 ng/mL 6-MAM, MDPV, pirovalerona, EDDP, buprenorfina y metadona. EM: efecto matriz; RSD: Desviación estándar relativa; SD: Desviación estándar.

Tabla 4.5. Comparación de trabajos.

Compuesto	Matriz	Técnica de Extracción	Técnica de Determinación	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Recuperación (%)	Ref.
Cocaína, opioides, anfetaminas, cannabinoides	Humor vítreo	SPE	GC-MS	1-2	10	70.4-100.1	5
Morfina, 6-MAM, codeína, cocaína, BEG, cocaetileno, metadona, EDDP	Humor vítreo	SPE	LC-PDA	10-28	100	66.4-97.1	8
Morfina y metabolitos, 6-MAM	Sangre, cerebro, hígado, hueso músculo y humor vítreo	SPE	LC-MS/MS			72.2-79.1	10
6-MAM, morfina, codeína, 6-acetilcodeina.	Sangre, humor vítreo, orina, contenido gástrico, bilis	SPE	LC-MS/MS	1-2	1-2	86-99	11
Mefedrona	Sangre, humor vítreo	LLE	LC-MS/MS	0.08	1	84.4	15
4-Clorometcatinona	Sangre, humor vítreo, orina	LLE	LC-MS/MS	-	0.5	91.3-105.9	16

Tabla 4.5. Comparación de trabajos (*continuación*).

Compuesto	Matriz	Técnica de Extracción	Técnica de Determinación	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Recuperación (%)	Ref.
Metadona	Saliva	UA-DLLME	GC-MS	50	150	89.4-115.5	19
Catinonas, opioides, cocaína y metabolitos	Saliva	DLLME	LC-MS/MS	0.25-25	0.5-50	80-115	23
Morfina, 6-MAM, cocaína, BEG, metadona	Plasma	DLLME	LC-PDA	13.9-28.5	46.2-94.9	84.2-101.9	20
Catinonas, opioides, cocaína y metabolitos	Humor vítreo	UA-DLLME	LC-PDA	5-250	10-500	37-114	*Este trabajo*

SPE: extracción en fase sólida; LLE: extracción líquido-líquido; UA-DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonidos; PDA: detector de red de diodos.

4.3.4. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES

Se aplicó el método propuesto de US-DLLME-UHPLC-DAD para la determinación de los compuestos en 11 muestras de humor vítreo para su análisis toxicológico. Las muestras se realizaron por duplicado y resultaron positivas para algún compuesto estudiado en nueve muestras, aunque no se detectó la presencia de catinonas en ninguna de las muestras analizadas. Dos muestras resultaron negativas para todos los compuestos analizados. En dos muestras se pudo detectar la presencia de cocaína, pero no cuantificarla (<LOQ). Se cuantificó morfina en una de las muestras (1.57 ± 0.001 µg/mL) junto a metadona (1.04 ± 0.001 µg/mL) y se detectó el metabolito EDDP (<LOQ). En otra de las muestras se cuantificó BEG (1.35 ± 0.0002 µg/mL) y metadona (0.5 ± 0.002 µg/mL). En 5 muestras se detectó y cuantificó únicamente metadona (0.75± 0.001, 0.37 ± 0.002, 0.31 ± 0.003, 0.69 ± 0.005 y 0.43 ± 0.003 µg/mL). Como se puede observar en la **Figura 4.8**, un 63.6% de los sujetos habían consumido metadona (detectándose en 9.1% de los casos su metabolito correspondiente, EDDP) y un 18.2% cocaína (detectándose su metabolito BEG en un 9.1% de las muestras analizadas). Además, un 9.1% de las muestras fueron positivas a morfina.

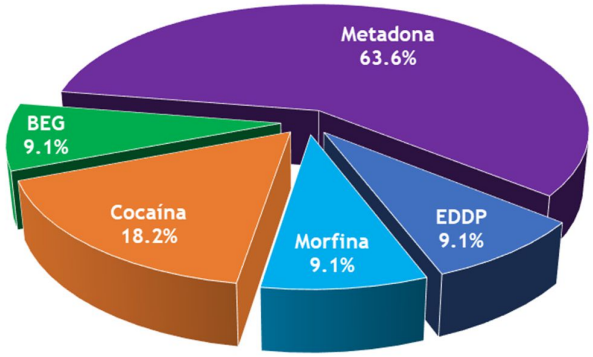


Figura 4.8. Distribución de las drogas detectadas en las 11 muestras de HV analizadas.

4.4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método de determinación de drogas de abuso en humor vítreo usando microextracción líquido-líquido dispersiva y UHPLC-DAD. Los parámetros que afectan a la extracción han sido optimizados mediante el uso de técnicas quimiométricas, como diseños de experimentos, proporcionando las condiciones óptimas de trabajo de DLLME para la extracción simultánea de 14 analitos. Con ello, se reduce el volumen de reactivos y disolventes, así como de la muestra biológica, condicionante en el caso de HV, y el tiempo de análisis. Además, el uso del humor vítreo como muestra biológica alternativa a otras, como sangre o orina, puede ayudar en los análisis toxicológicos forenses de forma complementaria o cuando no se dispone de muestras principales como la sangre. Finalmente, se ha establecido por primera vez un método para la determinación de nuevas sustancias psicoactivas, como las catinonas, en humor vítreo usando esta técnica de microextracción.

4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, European Drug Report 2020: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2020.

https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13236/TDAT20001ENN_web.pdf (acceso mayo 2021).

[2] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, European Drug Report 2019: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2019. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11364/20191724_TDAT19001ENN_PDF.pdf (acceso mayo 2021).

[3] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, European Drug Report 2018: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2018. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/8585/20181816_TDAT18001ENN_PDF.pdf (acceso mayo 2021).

[4] European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction, New psychoactive substances: global markets, glocal threats ant the COVID-19 pandemic. An update from the EU Early Warning System, Publications Office of the European Union, Luxembourg, December 2020. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13464/20205648_TD0320796ENN_PDF_rev.pdf (acceso mayo 2021).

[5] Dadalto Peres M., Souza Pelição F., Caleffi B., Spinosa De Matinis B., Simultaneous Quantification of Cocaine, Amphetamines, Opiates and Cannabinoids in Vitreous Humor, *J. Anal. Toxicol*. 2014, *38*, 39-45.

[6] Savini F., Tartaglia A., Coccia L., Palestini D., D´Ovidio C., de Grazia U., Merone G.M., Bassotti E., Locatelli M., Ethanol Determination in Post-Mortem Samples: Correlation between Blood and Vitreous Humor Concentration, *Molecules* 2020, *25*, 2724.

[7] Wójtowicz A., Wietecha-Posłuszny R., Snamina M., Contemporany trends in drug analysis of vitreous humor: A critical review, *Trends Anal. Chem*. 2020, *129*, 115935.

[8] Fernández P., Seoane S., Vázquez C., Tabernero M.J., Carro A.M., Lorenzo R.A., Chromatographic determination of drugs of abuse in vitreous humor using solid-phase extraction, *J. Appl. Toxicol*. 2013, *33*, 740-745.

[9] Concheiro M., Chessser R., Pardi J., Cooper G., Postmortem Toxicology of New Synthetic Opioids, *Front. Pharmacol*. 2018, *9*, 1210.

[10] Maskell P.D., Wilson N.E., Nitin Seetohul L., Crichton M.L., Beer L.J., Drummond G., De Paoli G., Postmortem tissue distribution of morphine and its metabolites in a series of heroin-related deaths, *Drug Test. Anal*. 2019, *11*, 292-304.

[11] Al-Asmari A.I., Postmortem Fluid Concentrations of Heroin, *J. Forensic Sci*. 2020, *65*, 570-579.

[12] Ntoupa P-S.A., Armaos K.P., Athanaselis S.A., Spiliopoulou C.A., Papoutsis I.I., Study of the distribution of antidepressant drugs in vitreous humor using a validated GC/MS method, *For. Sci. Int*. 2020, *317*, 110547.

[13] Bazmi E., Behnoush B., Akhgari M., Bahmanabadi L., Quantitative analysis of benzodiazepines in vitreous humor by high-performance liquid chromatography, *SAGE Open Med*. 2016, *4*, 1-7.

[14] Bévalot F., Cartiser N., Bottinelli C., Fanton L., Guitton J., Vitreous humor analysis for the detection of xenobiotics in forensic toxicology: a review, *Forensic Toxicol*. 2016, *34*, 12-40.

[15] Adamowicz P., Tokarczyk B., Stanaszek R., Slopianka M., Fatal Mephedrone Intoxication-A case report, *J. Anal. Toxicol*. 2013, *37*, 37-42.

[16] Nowak K., Szpot P., Zawadzki M., The stability of 4-Chloromethcathinone in Blood and Vitreous Humor, *J. Forensic Sci*. 2020, *65*, 1784-1790.

[17] Rezaee M., Assadi Y., Hosseini M.R.M., Aghaee E., Ahmadi F., Berijani S., Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 2006, *1116*, 1–9.

[18] Jain R., Singh R., Applications of dispersive liquid-liquid micro-extraction in forensic toxicology, *Trends Anal. Chem*. 2016, *75*, 227-237.

[19] Shekari A., Forouzesh M., Valipour R., Fallah F., Shojaei P., Validation and Optimization of Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction as a Preparation Method for Determination of Methadone in Saliva with Gas Chromatography-Mass Spectrometry Technique, *Adv. Pharm. Bull*. 2020, *10*, 329-333.

[20] Fernandez P., Regenjo M., Bermejo A.M., Fernandez A.M., Lorenzo R.A., Carro A.M., Analysis of drugs of abuse in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography, *J. Appl. Toxicol*. 2015, *35*, 418–425.

[21] Mercieca G., Odoardi S., Mestria S., Cassar M., Strano-Rossi S., Application of ultrasound-assisted liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography and mass spectrometry for the rapid determination of synthetic cannabinoids and metabolites in biological samples, *J. Sep. Sci*. 2020, *42*, 2858-2868.

[22] Fernandez P., Regenjo M., Fernandez A.M., Lorenzo R.A., Carro A.M., Optimization of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for ultra performance liquid chromatography determination of benzodiazepines in urine and hospital waste water, *Anal. Methods* 2014, *6*, 8239–8246.

[23] Fernández P., Regenjo M., Ares A., Fernández A.M., Lorenzo R.A., Carro A.M., Simultaneous determination of 20 drugs of abuse in oral fluid using ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction, *Anal. Bioanal. Chem*. 2019, *411*, 193-203.

[24] Williams J.R., The declaration of Helsinki and public health, *Bull. World Health Organ*. 2008, *86*, 650-651.

[25] Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Drug Medicine (CVM) May 2018 Silver Spring, Maryland, USA. https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf (acceso mayo 2021).

[26] ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonisation of Technical

Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva. Switzerland. 2005. https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1__Guideline.pdf (acceso mayo 2021).

[27] Cortese M., Gigliobianco M.R., Magnoni F., Censi R., Di Martino P., Compensate for Minimize Matrix Effects Strategies for Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technique: A Tutorial Review, *Molecules* 2020, *25*, 3047.

[28] Mansour F.R., Khairy M.A., Pharmaceutical and biomedical applications of dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. B* 2017, *1061–1062*, 382–391.

[29] Lewis G.A., Mathieu D., Phan-Tan-Luu R., Pharmaceutical Experimental Design, Marcel Dekker, New York, 1999.

[30] Ryan T.P., Modern experimental design, John & Wiley Sons, 1st ed., Hoboken, New Jersey, 2007.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

E. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN FLUIDO ORAL.

5.1. INTRODUCCIÓN

El número total de consumidores de drogas ilícitas ha ido aumentando constantemente desde finales de los años noventa. Sin embargo, el uso de drogas de abuso clásicas se estabilizó en 2009, mientras que el de las nuevas sustancias psicoactivas ha seguido creciendo. Los riesgos y los efectos adversos de las drogas ilícitas en la salud pública han sido objeto de un Informe Mundial sobre Drogas [1]. La cocaína es la droga estimulante más utilizada en Europa y la más frecuente en los países del sudoeste de Europa. Aunque la heroína es el opioide más utilizado, el consumo de opioides como la metadona, la buprenorfina y la naloxona, y su uso en terapias de reemplazo, también ha aumentado en los últimos años. Durante la última década, han surgido nuevas drogas sintéticas capaces de sortear el control internacional, como las catinonas, y su abuso llevó a un aumento de los ingresos hospitalarios de emergencia e incluso a algunos casos de muertes [2]. La catinona es un β-ceto análogo de la anfetamina con propiedades estimulantes, presente en las hojas de la *Catha edulis* (el arbusto "Khat"). Las catinonas sintéticas se usan con frecuencia como sustitutos de estimulantes controlados como la anfetamina, el MDMA (más conocido como "éxtasis") y la cocaína, y se venden como sustitutos legales o como sustancias sin regulación fiscal. Entre 2005 y 2014, el Sistema de Alerta Temprana de la UE (EWS) informó de más de 80 derivados de catinona [3,4]. Además, ha habido un número creciente de pacientes ingresados en emergencias tras ser sometidos a una sumisión química para manipular su voluntad o modificar su comportamiento con fines delictivos. Una de las sustancias más utilizadas en este contexto es la escopolamina, que causa la pérdida de memoria para perpetrar robos a causa de drogas, accidentes de tráfico y agresiones sexuales [5]. Un reciente informe mundial sobre drogas, publicado en 2020, indica el auge del mercado de drogas sintéticas a pesar de las restricciones debidas a la pandemia COVID-19 y la crisis económica [6].

El fluido oral (OF) es una alternativa efectiva y ventajosa a las típicas matrices biológicas para el análisis de drogas. Por lo tanto, puede obtenerse fácilmente de manera rápida y no invasiva, es mucho más difícil de adulterar que la orina, tiene un menor riesgo de infección que la sangre y es un mejor indicador del consumo reciente de drogas [7].

El creciente interés en el uso de las NSP y sus peligros para la salud pública han promovido el desarrollo de métodos analíticos selectivos para su determinación (especialmente porque la mayoría de NSP no se detectan en las pruebas de detección de drogas en conductores sospechosos de estar bajo la influencia de drogas). Las técnicas de confirmación para la cuantificación de diversas drogas de abuso en fluidos biológicos incluyen cromatografía de gases-espectrometría de masas [7-11] y cromatografía de líquidos-espectrometría de masas [12-21]. Por lo general, la preparación de muestra se realiza mediante LLE [9, 10, 16, 22, 23] o SPE [11-13, 15, 17, 18] para preconcentrar los analitos de interés. Los desarrollos recientes en el tratamiento de muestras se han dirigido principalmente a la miniaturización y la automatización. La microextracción con adsorbentes empaquetados es una versión miniaturizada de SPE con algunas ventajas sobre la técnica original que incluye tiempos de extracción cortos, consumo reducido de muestra y disolvente y fácil operación. En MEPS, un adsorbente se empaqueta directamente en un pequeño cartucho que se coloca entre el cuerpo y la aguja de una jeringa [24-27]. Se usa una etapa de lavado de fase después de eluir los analitos para

evitar el efecto memoria, permitiendo así que la fase MEPS se reutilice hasta 90 veces con OF. Esta técnica se ha utilizado en análisis para diversos compuestos como antidepresivos [28], anestésicos [29], parabenos [30], AINEs [31], fluoroquinolonas [32] y combinaciones de drogas [33] en fluidos biológicos. Sin embargo, con respecto a las drogas ilícitas, el proceso de MEPS sólo se ha utilizado para determinar la metadona en la orina [8] y en manchas de sangre [21], los cannabinoides en OF [20] y los opiáceos y los metabolitos de codeína en la orina [34]. Además, sólo se ha informado hasta la fecha de un método MEPS-LC-MS/MS para determinar drogas de múltiples clases (cocaína, anfetaminas, opioides naturales y sintéticos y alucinógenos) en OF [19].

El diseño experimental es una herramienta quimiométrica para estimar el efecto de factores de una técnica de extracción, potencialmente influyentes, sobre la respuesta analítica. Los diseños de cribado o *screening* permiten identificar los factores más influyentes con un número relativamente pequeño de experimentos, y los diseños de superficie de respuesta se suelen utilizar para encontrar los valores óptimos de las principales variables [35].

La oferta y el consumo de NSP es un problema dinámico y un riesgo para la salud pública y la seguridad vial. Controlar eficazmente el uso de NSP es un desafío práctico y bioanalítico difícil. El método propuesto es una herramienta de confirmación para cuantificar cantidades traza de drogas ilícitas detectadas previamente en pruebas de detección en conductores. Además, permite la cuantificación de NSP que no se pueden identificar con pruebas de detección rápida. En este trabajo, un total de 11 catinonas, seis opiáceos, cocaína y dos compuestos relacionados con la cocaína, y escopolamina fueron extraídos simultáneamente de OF por MEPS para su determinación por UHPLC-MS/MS. Se utilizó un diseño de *screening* asimétrico y un diseño *Doehlert* para examinar la influencia de las variables seleccionadas con el fin de optimizar el procedimiento MEPS. El método resultante propuesto y validado se utilizó con éxito para analizar muestras reales de pacientes perteneciente a un programa de desintoxicación de drogas.

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1. COMPUESTOS Y REACTIVOS

Morfina (MOR), 6-monoacetilmorfina (6-MAM), cocaína (COC), cocaetileno (COCET), benzoilecgonina (BEG), metadona (METHA), 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP), metilendioxipirovalerona (MDPV), mefedrona (MEP), metilona (MET), buprenorfina (BUP), naloxona (NAL), pentedrona (PENT), etilona (ETH), butilona (BUT), etilcatinona (ETCAT), etilcatinona efedrina metabolito (ETCATEP), metilefedrina metabolito (METEP), pirovalerona (PYR), flefedrona (FLE) y escopolamina (SCO), todo a una concentración de 1 mg/mL, y los estándares internos (IS) 6-MAM-d3, COC-d3, COCET-d8, BEG-d8, METHA-d9, EDDP-d3, MDPV-d8, MEP-d3, BUP-d4, NAL-d5, ETH-d5, BUT-d3, ETCATEP-d5, METEP-d3 (100 µg/mL), fueron obtenidos de Cerilliant (Round Rock, TX, EEUU).

Acetonitrilo, metanol, diclorometano, 2-propanol, ácido fórmico, ácido acético e hidróxido amónico fueron comprados a Merck® (Darmstadt, Alemania) en grado LC-MS. El agua se purificó a través de un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, EEUU). Los analitos se extrajeron utilizando una jeringa analítica digital eVol® XR (100 y 500 µL) empaquetada con material adsorbente (C_8, octil-sílice; C_{18}, octadecil-sílice; o M_1, un adsorbente mixto que contiene 80% de C_8 y 20% de SCX intercambiador de cationes fuerte) de SGE Analytical Science (SGE Europe, Ltd., Chester, reino Unido). Se compraron filtros de jeringa de PTFE con un tamaño de poro de 0.22 µm en Membrane

Solutions (Dallas, TX, EEUU). También se utilizó una centrífuga Minicen suministrada por Orto Alresa (Ajalvir, Madrid, España).

Las disoluciones madre individuales para cada droga a una concentración de 1 mg/mL (100 µg/mL para los estándares internos) en metanol se almacenaron a -20°C. Las disoluciones de trabajo se prepararon por dilución de las disoluciones madre en fase móvil: 0.1% ácido fórmico en agua (A) o acetonitrilo (B), 90:10 (v:v). Las curvas de calibración se construyeron a ocho niveles de concentración diferente añadiendo alícuotas apropiadas de las disoluciones de trabajo (para tener concentraciones finales dentro del rango de 0.5-100 ng/mL) sobre muestras de OF blanco (libre de drogas). Los estándares internos se agregaron a 25 ng/mL. Se utilizaron procedimientos internos que utilizan muestras de control de calidad (QC) a diferentes niveles de concentración y varias matrices OF para verificar las características de rendimiento del método. La precisión se evaluó mediante el uso de muestras QC de 5, 25 y 100 ng/mL para los niveles de concentración baja, media y alta, y se almacenaron refrigerados a 4°C. Se prepararon muestras QC para evaluar la eficiencia del proceso a cuatro niveles de concentración diferentes (10, 25, 50 y 100 ng/mL) en una matriz fortificada de OF. El procedimiento MEPS se optimizó añadiendo una concentración de 100 ng/mL de cada droga a un blanco de matriz libre de drogas.

Se preparó un tampón fosfato (50 mM, pH 9) disolviendo 3.4 g de dihidrógeno fosfato de potasio en 0.5 L de agua Milli-Q y ajustándolo a pH 9 con hidróxido de potasio.

5.2.2. MUESTRAS DE SALIVA

Se recogió fluido oral libre de drogas de voluntarios sanos, utilizando un dispositivo de Salivette® (Sarstedt, Alemania). El dispositivo incluye una torunda de algodón para su inserción directa en la boca. La torunda no debe tocarse con los dedos; más bien, los donantes deben masticarlo suavemente y enrollarlo alrededor de su boca durante 2 minutos antes de transferirlo a su tubo para su centrifugación y almacenamiento a -20°C hasta su análisis.

Todas las pruebas se realizaron de acuerdo con el Comité de Ética en Investigación de Galicia (España) [36] y cumplieron con los principios de la Declaración de Helsinki [37].

5.2.3. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS CON MEPS

Las muestras de fluido oral se pretrataron para eliminar posibles interferencias como proteínas, restos de comida y burbujas de aire. Para este propósito, se mezclaron un volumen de 300 µL de fluido oral adicionado con los analitos con 200 µL de metanol y se agitó manualmente durante 30 s. La disolución resultante se centrifugó a 15000 rpm durante 5 minutos. Luego se diluyeron 300 µL de sobrenadante con 200 µL de tampón fosfato (50 mM, pH 9) y se centrifugó a 15000 rpm, 5 minutos para eliminar cualquier resto de proteínas que pudiera bloquear la fase adsorbente.

El procedimiento MEPS se realizó utilizando jeringas analíticas eVol® semiautomáticas (100 y 500 µL). La aguja se equipó con un inserto que contenía 4 mg de un adsorbente de tipo mixto: C_8 mezclado con un intercambiador de cationes fuerte (C_8/SCX). El adsorbente se acondicionó primero con 100 µL de metanol y luego con 100 µL de agua. Se hizo pasar una alícuota de 100 µL de muestra de OF pretratada a través de la fase aspirando y dispensando la misma alícuota seis veces a 10 µL/s para aumentar la retención de los analitos. Luego, la fase se lavó con 50 µL de agua/metanol 90:10 (v:v) a 20 µL/s para eliminar las interferencias y se secó durante 0.5 minutos, después de lo cual,

los analitos retenidos se eluyeron con 90 µL de diclorometano/2-propanol/hidróxido de amonio (78:20:2, v:v:v) a 10 µL/s. El extracto, así obtenido, se evaporó bajo una corriente de nitrógeno a 40°C y se reconstituyó con 50 µL de fase móvil. Luego se inyectaron 5 µL de extracto reconstituido en el sistema UPLC-MS/MS para su análisis.

Para reducir los efectos de memoria, la fase se lavó con 100 µL de eluyente, 100 µL de metanol, 4 x 100 µL de agua Milli-Q, 4 x 100 µL 0.1% ácido fórmico y 4 x 100 µL de metanol a 20 µL/s entre extracciones.

5.2.4. CONDICIONES DEL UHPLC-MS/MS

Los analitos se determinaron por cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem. La separación cromatográfica se realizó en un sistema Acquity UPLC H-Class equipado con una columna cromatográfica Acquity UPLC™ BEH Shield RP 18 (100 mm x 2.1 mm de diámetro interno, 1.7 µm de tamaño de partícula) y se conectó a un espectrómetro de masas Xevo® TQD de Waters (Milford, MA, EEUU). La separación de las veintiuna drogas se logró mediante el uso de un programa de elución en gradiente con una fase móvil que consiste en 0.1% de ácido fórmico en agua (A) y 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (B) a un flujo de 0.4 mL/min. El programa fue el siguiente: 90% de A durante 0-0.2 min, 30% A a 3.5 min y 90% A a 4 min. La temperatura de la columna se estabilizó térmicamente a 55°C, la temperatura del compartimento del muestreador automático se ajustó a 10°C y el volumen inyectado fue de 5 µL.

La fuente de ionización por electro-*spray* (ESI) se hizo funcionar en modo positivo, utilizando un voltaje capilar de 0.6 kV y una temperatura de fuente de iones a 120°C. El detector de MS se usó en el modo de monitorización de reacción múltiple (MRM) con todas las drogas. Se utilizó nitrógeno tanto como nebulizador (50 L/h) como gas de secado (500°C, 1100 L/h). Estas variables fueron optimizadas de forma individual para cada estándar en metanol (1 µg/mL), que se inyectó a 20 µL/min. Los otros valores de los parámetros MS/MS para los compuestos y estándares internos se resumen en la **Tabla 5.1**. Los datos se obtuvieron utilizando el software *MassLynx™ Application Manager*. La **Figura 5.1** muestra un cromatograma en el modo MRM para una muestra de OF adicionada con una concentración de 100 µg/mL.

Tabla 5.1. Parámetros UHPLC-MS/MS para los analitos estudiados y los patrones internos.

Compuesto	Categoría	tR (min)	Ion precursor (*m/z*)	Ion producto Cuantificador (*m/z*)	RCE% (V)	Ion producto Cualificador (*m/z*)	RCE% (V)	CV (V)	pKa	IS
Morfina	Opioide	0.51	286.00	201.04	24	165.00	38	55	9.48	6-MAM-d3
Naloxona	Opioide	0.80	328.37	310.08	18	212.00	36	35	9.16	NAL-d5
Metilona	Catinona	0.86	207.93	159.95	16	190.01	12	30	7.74	ETH-d5
Flefedrona	Catinona	0.89	181.99	164.05	10	148.95	20	26	7.24	ETCATEP-d5
Etilcatinona	Catinona	0.89	178.02	160.07	12	131.84	16	28	-	ETCATEP-d5
Etilcatinona efedrina metabolito	Catinona	0.88	180.04	162.09	12	117.00	20	24	-	ETCATEP-d5
Escopolamina	Alcaloide	0.92	304.00	138.00	22	102.94	38	40	8.01	6-MAM-d3
6-MAM	Opioide	1.02	328.00	165.00	40	211.01	26	55	9.41	6-MAM-d3
Etilona	Catinona	1.01	22.14	174.10	16	204.02	12	30	7.75	ETH-d5
Metilefedrina	Catinona	1.17	180.04	162.09	14	91.04	26	22	9.04	METEP-d3
Butilona	Catinona	1.20	222.01	174.11	16	201.04	12	30	7.74	BUT-d3
Mefedrona	Catinona	1.23	177.96	159.95	12	144.93	20	25	7.41	MEP-d3
Pentedrona	Catinona	1.71	192.16	174.10	12	131.88	18	28	7.21	MDPV-d8
BEG	Cocaína	2.05	299.00	168.13	18	105.02	26	42	3.35	BEG-d8
Cocaína	Alcaloide	2.14	304.00	182.00	20	82.00	30	40	8.97	COC-d3
MDPV	Catinona	2.19	276.06	126.08	26	175.04	22	40	8.41	MDPV-d8

Tabla 5.1. Parámetros UHPLC-MS/MS para los analitos estudiados y los patrones internos (*continuación*).

Compuesto	Categoría	tR (min)	Ion precursor (*m/z*)	Ion producto Cuantificador (*m/z*)	RCE% (V)	Ion producto Cualificador (*m/z*)	RCE% (V)	CV (V)	pKa	IS
Cocaetileno	Cocaína	2.40	318.00	196.09	20	82.05	32	12	9.04	COCET-d8
Pirovalerona	Catinona	2.45	246.15	104.96	24	175.02	18	35	8.22	MDPV-d8
EDDP	Opioide	2.74	278.09	234.06	30	249.06	22	50	7.71	EDDP-d3
Buprenorfina	Opioide	2.78	468.34	55.06	48	54.35	46	60	9.47	BUP-d4
Metadona	Opioide	2.94	310.00	104.96	30	265.00	15	33	9.05	METHA-d9
Naloxona-d5	-	0.79	333.19	315.18	18	212.09	28	36		
Etilcatinona efedrina-d5	-	0.88	185.07	167.13	12	117.08	20	30		
6-MAM-d3	-	0.98	331.39	165.05	34	211.03	26	55		
Etilona-d5	-	0.99	227.07	179.04	18	209.02	12	30		
Metilefedrina-d3	-	1.15	183.52	165.19	12	91.03	24	22		
Butilona-d3	-	1.15	225.10	177.12	16	207.04	12	35		
Mefedrona-d3	-	1.20	181.07	163.06	12	148.04	20	25		
BEG-d8	-	1.95	298.22	171.05	20	109.90	26	32		
Cocaína-d3	-	2.08	307.37	104.96	34	85.05	32	40		

Tabla 5.1. Parámetros UHPLC-MS/MS para los analitos estudiados y los patrones internos (*continuación*).

Compuesto	Categoría	tR (min)	Ion precursor (*m/z*)	Ion producto Cuantificador (*m/z*)	RCE% (V)	Ion producto Cualificador (*m/z*)	RCE% (V)	CV (V)	pKa	IS
MDPV-d8	-	2.14	284.18	175.09	22	134.42	26	40		
Cocaetileno-d8	-	2.35	326.14	201.08	18	85.04	30	34		
Buprenorfina-d4	-	2.75	472.35	59.02	48	101.04	40	76		
Metadona-d9	-	2.91	319.21	268.10	14	104.89	28	28		

tR: tiempo de retención, RCE: Energía relativa de colisión, CV: Voltaje de cono, IS: Patrón interno.



Figura 5.1. Cromatograma UPLC-MS/MS de una muestra de OF adicionada a un nivel de concentración de 100 µg/mL con los analitos.

5.2.5. VALIDACIÓN ANALÍTICA DEL MÉTODO

El método optimizado MEPS-UHPLC-MS/MS fue validado de acuerdo con las pautas de la FDA [38], ICH [39] y EuraChem [40] para garantizar la precisión y resultados confiables. La exactitud y la fiabilidad se evaluaron en términos de linealidad, límites de detección (LOD)y cuantificación (LOQ), precisión, veracidad, recuperación y efecto matriz.

La linealidad se evaluó mediante la construcción de una curva de calibrado de adición estándar para cada analito utilizando estándares internos. Cada curva se obtuvo utilizando ocho niveles de concentración diferentes por triplicado y trazando la relación del área de pico de los iones cuantitativos para cada analito con respecto al IS marcado isotópicamente con la concentración de analito correspondiente (ng/mL), estando los dos relacionados por regresión lineal de mínimos cuadrados.

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para cada compuesto se calcularon como las concentraciones más bajas, lo que resultó en una relación señal-ruido de 3 y 10, respectivamente. La precisión del método se evaluó a tres niveles de concentración (5, 25, y 100 ng/mL) en muestras QC que se analizaron el mismo día para estimar la precisión intra-día y en diferentes días para la precisión inter-día.

El efecto matriz se evaluó de acuerdo con Matuszewski *et al.* [41] y a una revisión sobre validación de métodos de cromatografía líquida-espectrometría de masas de Kruve *et al.* [42]. El procedimiento implicó la adquisición de áreas de pico para tres conjuntos de muestra diferentes. El conjunto A consistía en disoluciones estándar y se usó para calcular la relación entre el área de pico de cada analito y la del IS en la fase móvil. El conjunto B consistió en patrones basados en matriz de OF y se usó para calcular la relación entre el área de pico para cada compuesto y la del IS, agregado después de la extracción del blanco de OF. Finalmente, el conjunto C consistió en muestras de OF a las que se agregaron los analitos antes de la extracción y se usó para calcular la relación entre el área de pico para cada droga y la del IS, agregado antes de la extracción. El efecto matriz (EM) se determinó analizando seis replicados de muestras QC en una concentración de 100 ng/mL:

$$\text{EM}\ (\%) = B/A \times 100$$

La eficiencia general del proceso (PE) se calculó analizando seis replicados de muestras QC en cada nivel de concentración (10, 25, 50 y 100 ng/mL) que se prepararon como se describe en la *Sección 5.2.1*:

$$\text{PE}\ (\%) = C/A \times 100$$

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN

Las condiciones de MEPS se optimizaron cuidadosamente mediante el uso de diseños experimentales para examinar la influencia de variables operativas seleccionadas (disolvente y volúmenes de lavado y de elución, tipo de fase, número de ciclos de aspiración-dispensación y pH) en la eficiencia de MEPS. El estudio quimiométrico fue precedido por pruebas preliminares para seleccionar el disolvente de elución y el disolvente de lavado más adecuados.

5.3.1.1.OPTIMIZACIÓN DEL DISOLVENTE DE ELUCIÓN Y LAVADO

Se evaluó la eficiencia de extracción en un total de cinco disolventes de elución, nombrados como: la fase móvil (0.1% ácido formico en agua/ 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo, 90:10, v:v), metanol, diclorometano/2-propanol/hidróxido de amonio (DCM/IPA/NH_4OH) (78:20:2, v:v:v), 5% de NH_3 en acetonitrilo y 5% de NH_3 en metanol. La **Figura 5.2** muestra las respuestas cromatográficas normalizadas obtenidas con cada eluyente. La eficiencia de extracción de drogas con DCM/IPA/NH_4OH y 5% NH_3 en ACN varió de 80% a 100%. Las disoluciones de amonio maximizan la ionización de los analitos. Algunas de las respuestas obtenidas con el 5% de NH_3 en ACN fueron ligeramente mejores que las proporcionadas por DCM/IPA/NH_4OH. Sin embargo, las respuestas de morfina y EDDP cuando se utiliza un disolvente 5% de NH_3 en ACN como eluyente fueron aproximadamente un 20% más bajas que las obtenidas con DCM/IPA/NH_4OH. Esto llevó a elegir la disolución ternaria como disolvente de elución.

El disolvente de lavado se usó antes de secar la fase para eliminar selectivamente analitos de la matriz no específicos sin pérdida de ninguna droga. Se realizaron las siguientes pruebas para este propósito: extracción sin usar un disolvente de lavado, lavado con agua Milli-Q, 0.1% ácido fórmico, agua/metanol (90:10, v:v), 0.1 M ácido acético/agua/metanol (1:2:2, v:v:v) y 50 mM NH_3 en agua/metanol (90:10, v:v). Los resultados de las pruebas sin disolvente de lavado fueron muy variables y similares a los obtenidos con 50 mM NH_3 en agua/metanol. La disolución de 0.1% ácido fórmico demostró ser el mejor disolvente de lavado para la mayoría de las drogas clásicas. Sin embargo, los mejores resultados para la morfina se obtuvieron con agua/metanol (90:10, v:v), lo que proporcionó buenos resultados para todos los compuestos estudiados (**Figura 5.3**). Por lo tanto, se eligió usar esta mezcla binaria de agua/metanol (90:10, v:v) como disolvente de lavado.

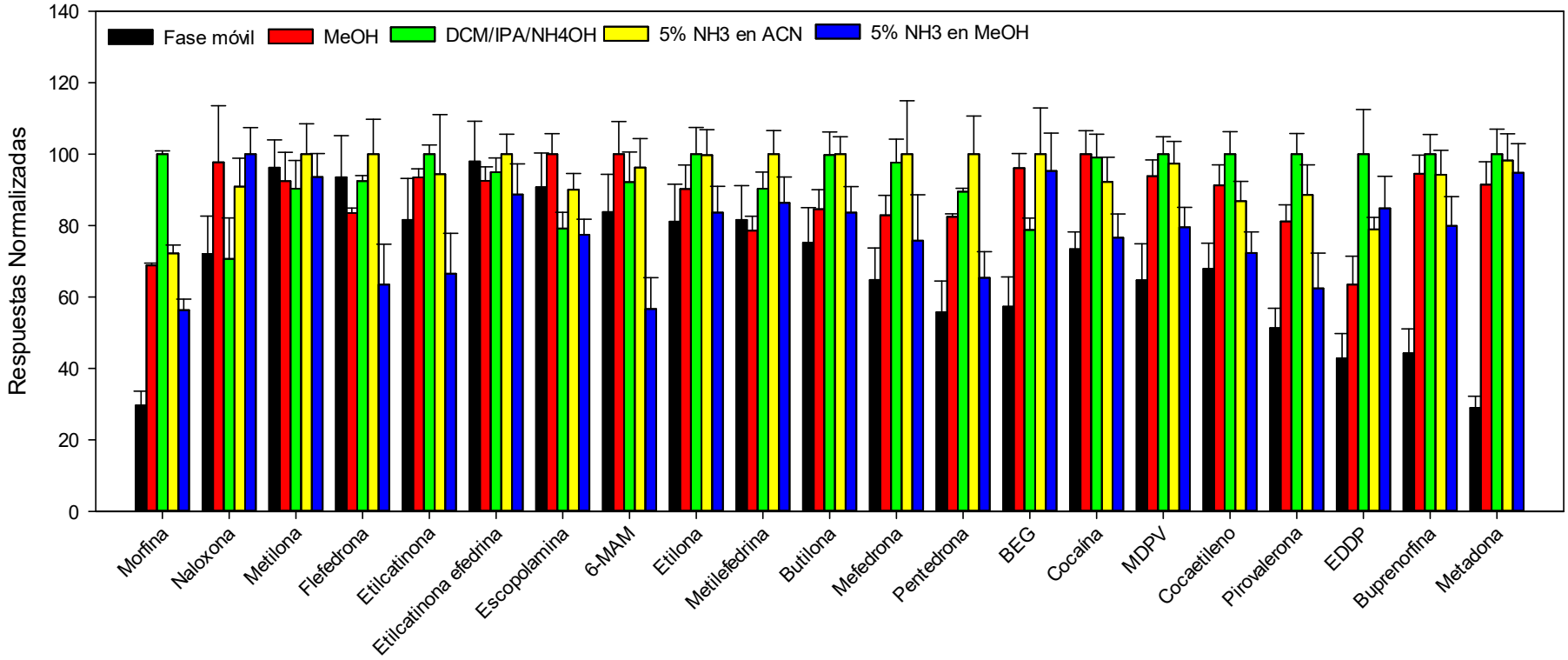


Figura 5.2. Optimización del disolvente de elución. Las respuestas están expresadas como la media ± desviación estándar (n=3).

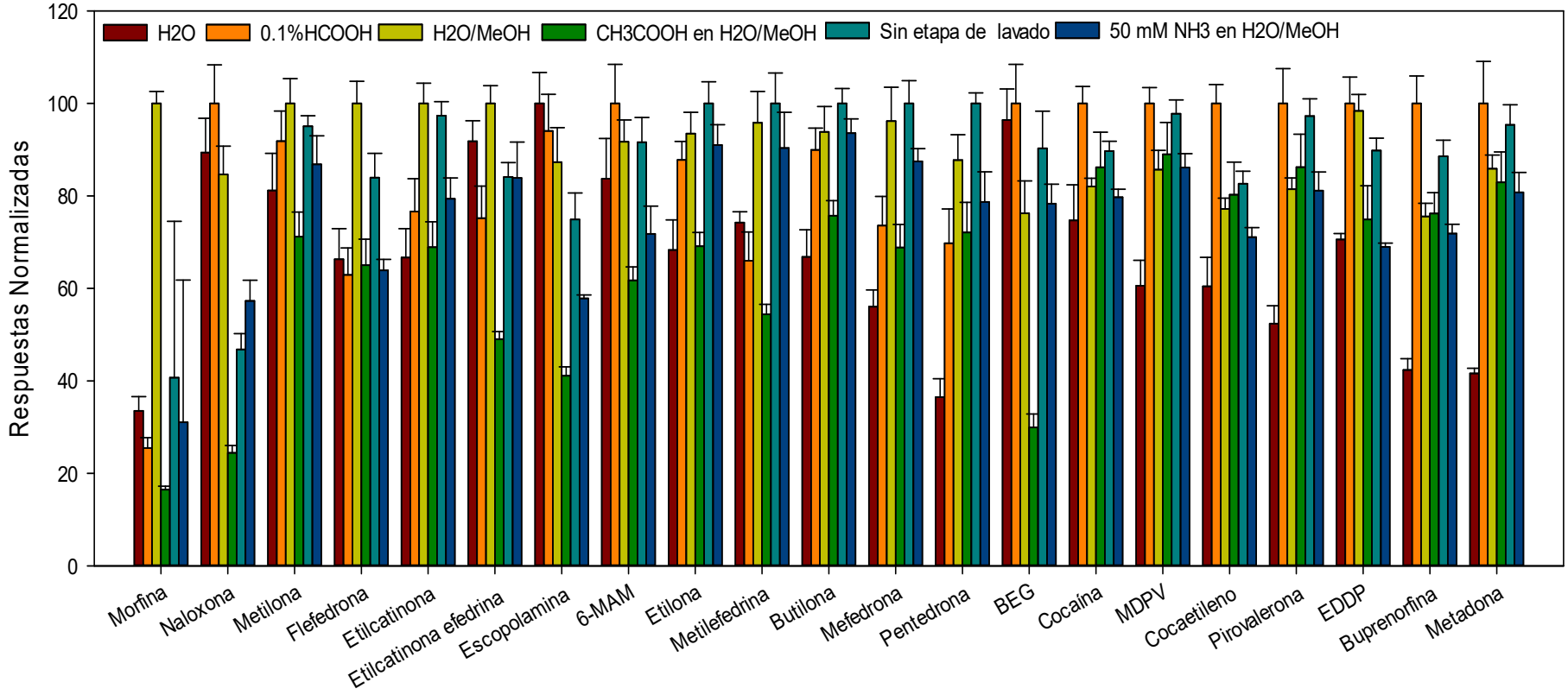


Figura 5.3. Influencia de los diferentes disolventes de lavado sobre la respuesta. Las respuestas están expresadas como la media ± desviación estándar (n=3).

5.3.1.2.DISEÑO EXPERIMENTAL

Se usó el software estadístico *NemrodW*® para desarrollar los diseños experimentales, evaluar los datos y trazar efectos y superficies de respuesta [43].

Se usó inicialmente un diseño de cribado factorial $3^4 4^1//16$ asimétrico o de nivel mixto para seleccionar cinco variables estudiadas en diferentes niveles [44]. Las variables estudiadas fueron las siguientes:

- b_1. Volumen de disolución de lavado [agua/metanol (90:10, v:v)] (50, 100 y 200 µL).
- b_2. Volumen de eluyente [DCM/IPA/NH_4OH (78:20:2, v:v:v)] (50, 100 y 500 µL).
- b_3. Número de ciclos de aspiración-dispensación (2, 5 y 8 *strokes*).
- b_4. Naturaleza de la fase adsorbente (C_8, C_{18} y modo mixto C_8/SCX).
- b_5. pH (6, 7, 8 y 9).

Las condiciones experimentales para el diseño se muestran en la **Tabla 5.2**.

Tabla 5.2. Condiciones experimentales para el diseño de *screening* asimétrico $3^4 4^1//16$ en MEPS.

Nº experimentos	Orden Aleatorio	Volumen lavado (µL)	Volumen eluyente (µL)	Nº ciclos	Fase	pH
1	5	50	50	2	C_8	6
2	4	50	100	5	C_{18}	7
3	6	50	500	8	Mixta	8
4	8	50	50	2	C_8	9
5	12	100	50	5	Mixta	9
6	7	100	100	2	C_8	8
7	10	100	500	2	C_8	7
8	15	100	50	8	C_{18}	6
9	11	200	50	8	C_8	7
10	16	200	100	2	Mixta	6
11	3	200	500	2	C_{18}	9
12	1	200	50	5	C_8	8
13	14	50	50	2	C_{18}	8
14	2	50	100	8	C_8	9
15	9	50	500	5	C_8	6
16	13	50	50	2	Mixta	7

Los resultados de ANOVA revelaron significación estadística para cocaína, metilona, butilona, morfina, 6-MAM, metilefedrina, etilona y etilcatinona para un nivel de

confianza del 95%, y también para escopolamina, BEG y naloxona para un nivel de confianza del 99%. Estos resultados estadísticos se representan mejor como gráficos de Pesos Delta [44], que permiten exponer los efectos diferenciales de cada factor al considerar dos niveles diferentes del factor tomados de dos en dos. La longitud de las barras es proporcional a la magnitud relativa del efecto. Dicho efecto es negativo para las barras dispuestas hacia la izquierda y positivo para las barras dispuestas hacia la derecha. Las líneas punteadas en el gráfico representan el nivel de significación estadística correspondiente al nivel de confianza considerado [44]. También se ha utilizado los gráficos de Efectos Totales [44], donde la longitud de la barra es proporcional al efecto de cada nivel de factor en la respuesta analítica, para identificar el mejor nivel para cada variable, aunque no fue estadísticamente significativo. A modo de ejemplo, la **Figura 5.4**. muestra las gráficas de Pesos Delta (**5.4A** y **5.4B**) y las gráficas de Efectos Totales (**5.4C** y **5.4D**) para escopolamina y morfina, respectivamente. La influencia de la fase (factor b_4) fue estadísticamente significativa para catorce analitos. En la mayoría de los casos, la fase de modo mixto (C_8/SCX) proporcionó los mejores resultados de extracción; como excepción, la fase C_{18} proporcionó mejores respuestas para buprenorfina y metadona. Además, la respuesta a la extracción de pirovalerona y naloxona produjo resultados similares con C_8/SCX y C_{18}. La fase de modo mixto se seleccionó como mejor solución de compromiso porque consistía en gel de sílice unido con grupos octil y ácido fenilsulfónico, que es una composición adecuada para analitos polares como son las drogas ácidas y básicas.

El pH (b_5) fue estadísticamente significativo para diecisiete drogas. Un pH 9 demostró ser el valor más adecuado para extraer todos los compuestos, excepto metadona y EDDP, que se extrajeron de manera más eficiente a un pH neutro. Dado que los valores de pKa para los analitos oscilaron entre 3.4 y 9.5, la eficiencia de extracción se incrementó por el equilibrio ácido-base de la mayoría de los compuestos que se desplazan a la forma básica disociada con valores de pH altos. Por lo tanto, se eligió un pH 9 para las extracciones posteriores.

Un volumen de disolución de lavado (b_1) de 50 µL fue la mejor opción para el procedimiento MEPS para todos los analitos, además de ser el nivel estadísticamente significativo para naloxona, escopolamina y BEG. Los resultados para algunas drogas fueron similares con 100 y 50 µL de disolución de lavado.

El uso de una gran cantidad de ciclos de extracción (*strokes*, b_3) facilitó la interacción de la muestra con la fase adsorbente y, por lo tanto, la extracción. El número de ciclos fue estadísticamente significativo para once compuestos, el uso de 8 ciclos aumentó el rendimiento de extracción para ocho analitos, pero el uso de 5 ciclos produjo una extracción más eficiente para morfina y naloxona. Este factor no tuvo un efecto estadísticamente significativo en la eficiencia de extracción para las otras drogas, que alcanzaron su punto máximo de extracción con un número medio-alto de *strokes* (5 u 8 ciclos).

El volumen de eluyente (b_2), fue estadísticamente significativo para escopolamina y morfina. Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes en cuanto al valor óptimo para la extracción máxima. Por estas razones, estos dos últimos factores se estudiaron con mayor detalle utilizando un diseño de superficie de respuesta.

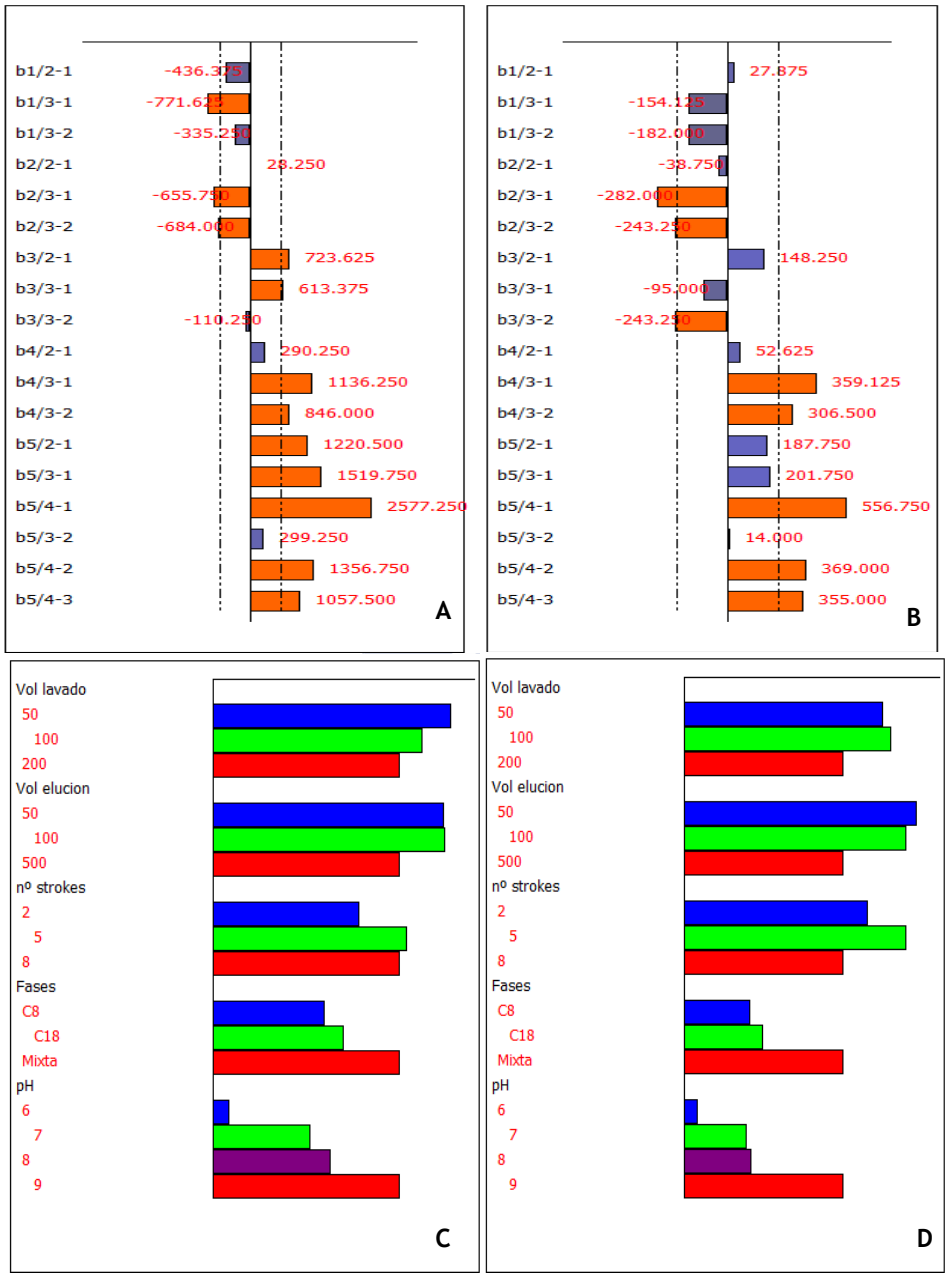


Figura 5.4. Gráficos de Pesos Delta para escopolamina (A) y morfina (B). Gráficos de Efectos Totales para escopolamina (C) y morfina (D).

La influencia del volumen de eluyente y el número de *strokes* (ciclos de aspiración y dispensación) se estudió utilizando un diseño *Doehlert* que es adecuado para explorar modelos de superficie de respuesta cuadráticos [42]. Con dos factores, el diseño comprende los seis vértices de un hexágono y tres puntos centrales, por lo que requiere un total de 9 experimentos. Los factores se exploraron a diferentes niveles (uno a tres y el otro a cinco en un diseño de dos factores). Los volúmenes de eluyente examinados variaron de 75 a 475 µL y el número de *strokes* de 2 a 8. Las condiciones experimentales para el diseño *Doehlert* utilizado se muestran en la siguiente tabla (**Tabla 5.3**):

Tabla 5.3. Condiciones experimentales para el diseño Doehlert en MEPS.

Nº experimentos	Orden aleatorio	Volumen eluyente (µL)	Nº ciclos
1	3	475	5
2	4	75	5
3	2	375	8
4	1	175	2
5	7	375	2
6	8	175	8
7	9	275	5
8	5	275	5
9	6	275	5

Las funciones de deseabilidad basadas en funciones parciales de Derringer [44] se utilizaron para identificar las condiciones experimentales que conducen a las mejores compensaciones entre variables, es decir, las respuestas que caen dentro de los rangos aceptables. La función objetivo general *D*, que representaba la función de deseabilidad general, se definió como la media geométrica ponderada de *n* funciones de deseabilidad individuales. Los resultados experimentales fueron evaluados por ANOVA. Los resultados de regresión fueron estadísticamente significativos para un nivel de confianza del 95% para cinco de los compuestos estudiados. Además, el volumen de eluyente fue estadísticamente significativo a $p<0.05$ para 12 analitos, siendo la mejor opción un nivel medio-alto.

La **Figura 5.5** muestra superficies de respuesta que ilustran la dependencia mutua de los factores anteriores para etilcatinona (**A**), butilona (**B**), naloxona (**C**) y cocaína (**D**), todas las demás drogas se comportaron de manera similar a alguno de estos compuestos mostrados. Los mejores resultados para escopolamina (**E**) se obtuvieron usando un volumen de eluyente bajo y un número medio de *strokes*. La disimilitud en los valores para la determinación óptima de todos los compuestos requirió un análisis de decisión multicriterio basado en funciones de deseabilidad (**F**). Las respuestas más altas (D=1) para todas las drogas correspondieron a altos volúmenes de eluyente y un número medio de ciclos. Se encontró que las condiciones óptimas eran 90 µL de eluyente (DCM/IPA/NH_4OH) y seis ciclos de aspiración-dispensación.

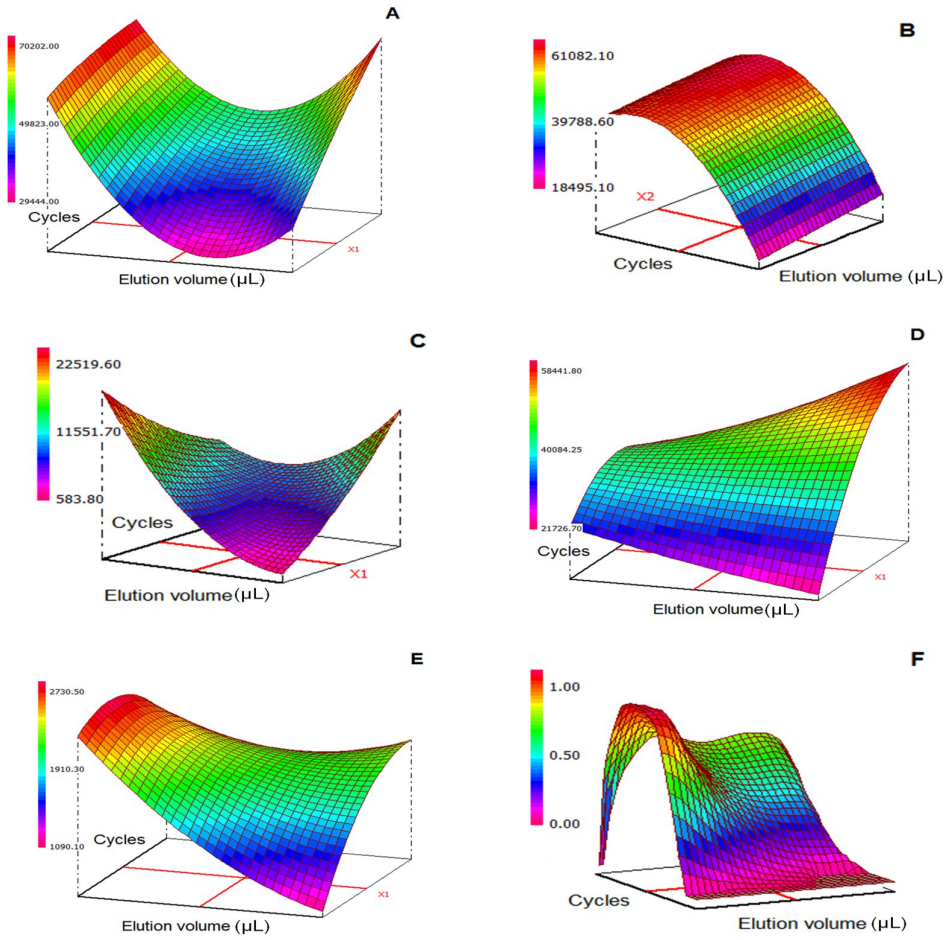


Figura 5.5. Respuestas estimadas de superficie para etilcatinona (A), butilona (B), naloxona (C), cocaína (D) y escopolamina (E). Función de deseabilidad global para todos los compuestos seleccionados (F).

5.3.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La linealidad del método propuesto se evaluó teniendo en cuenta los rangos de los niveles terapéuticos en pacientes de programas de terapia de sustitución con metadona o buprenorfina/naloxona. Para ello, se utilizaron disoluciones estándar desde niveles de LOQ a 500 ng/mL y con los IS a la concentración adecuada. El rango de concentración lineal para mefedrona fue el más estrecho (LOQ-250 ng/mL). Se usó el análogo de IS más cercano cuando no había un IS marcado isotópicamente para algunos de los compuestos estudiados. Como se puede ver en la **Tabla 5.4**, el análisis de regresión de los resultados proporcionó buenos coeficientes de determinación para todas las drogas (0.9903 a 0.9995).

Los LOQ variaron de 0.5 a 1.0 ng/mL para todos, excepto para morfina (10 ng/mL), 6-MAM y escopolamina (2.5 ng/mL) (**Tabla 5.4**). Estos límites son más bajos que la mayoría de los valores publicados con anterioridad [8-11, 14-16, 18, 19, 21, 24], pero similares a los obtenidos por Concheiro *et al*. [10] que utilizaron una SPE para la preparación de muestras.

Tabla 5.4. LODs, LOQs, linealidad, precisión inter- e intra-día (n=4) para las 21 drogas y metabolitos en OF.

Compuesto	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Linealidad (R^2)	Precisión inter-día (% RSD)			Precisión intra-día (% RSD)		
				5 ng/mL	25 ng/mL	100 ng/mL	5 ng/mL	25 ng/mL	100 ng/mL
Morfina	2.5	10	0.9935	-	12.3	13.7	-	16.6	4.7
Naloxona	0.5	1	0.9909	12.0	12.4	5.0	14.4	8.1	5.4
Metilona	0.25	0.5	0.9931	0.4	3.8	2.7	0.4	2.4	5.5
Flefedrona	0.25	0.5	0.9929	5.1	3.8	1.4	9.0	3.0	2.0
Etilcatinona	0.25	0.5	0.9940	6.6	2.6	3.7	3.9	1.4	4.1
Etilcatinona efedrina	0.25	0.5	0.9931	2.2	1.1	0.7	5.8	1.3	2.2
Escopolamina	1	2.5	0.9933	11.4	3.7	2.5	13.3	12.8	6.0
6-MAM	1	2.5	0.9910	7.9	8.6	3.7	12.6	9.9	6.3
Etilona	0.25	0.5	0.9925	4.2	3.7	1.4	5.8	0.7	1.6
Metilefedrina	0.25	0.5	0.9946	6.7	1.2	0.7	7.8	0.8	0.5
Butilona	0.25	0.5	0.9950	4.4	3.8	2.7	8.9	0.9	2.1
Mefedrona	0.25	0.5	0.9984	3.0	3.4	2.8	7.8	4.2	3.9
Pentedrona	0.25	0.5	0.9938	5.4	2.3	2.6	4.3	0.4	1.3
BEG	0.5	1	0.9925	3.9	5.3	3.4	5.1	3.5	3.3
Cocaína	0.25	0.5	0.9969	6.3	3.3	1.6	6.9	2.3	1.6
MDVP	0.25	0.5	0.9922	3.4	2.7	2.4	5.6	1.1	2.4
Cocaetileno	0.25	0.5	0.9930	6.2	2.9	1.8	5.4	2.4	3.9
Pirovalerona	0.25	0.5	0.9930	7.0	3.0	2.6	2.7	1.8	1.0
EDDP	0.25	0.5	0.9903	5.4	4.8	2.2	8.8	0.5	1.5
Buprenorfina	0.25	0.5	0.9935	0.4	1.7	1.6	5.8	2.0	1.0
Metadona	0.25	0.5	0.9946	6.6	2.5	3.4	6.0	6.8	2.8

LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; RSD: desviación estándar relativa.

Los resultados obtenidos en las pruebas de evaluación del efecto matriz se muestran en la **Tabla 5.5**. La supresión o incremento de la señal de ionización por efecto de la matriz fue aceptable (80-117%) para todos los compuestos, excepto para morfina, naloxona y flefedrona (<75%), que mostraron una supresión de la señal de ionización.

La exactitud del método propuesto se evaluó como veracidad y precisión [39, 42]. La precisión se evaluó en muestras QC que contenían los analitos a tres niveles de concentración, utilizando cuatro réplicas por nivel para una precisión intra-día e inter-día. Los resultados se muestran como desviaciones estándar relativas (% RSD) en la **Tabla 5.4**. Como se puede observar, la precisión fue satisfactoria (valores de RSD de 0.4% a 14.4%) para todos los compuestos, excepto para morfina (RSD ≤ 16.6%). La veracidad general se evaluó como la eficiencia del proceso (%PE) [42], utilizando cuatro niveles de concentración y seis replicados por nivel de muestra QC (**Tabla 5.5**). La eficiencia media del proceso varió de 75% para metilona a 125% para etilcationa y butilona. Los valores de %PE para morfina, escopolamina y flefedrona resultaron pobres a concentraciones inferiores a 100 ng/mL, probablemente debido a la mayor variabilidad en el proceso de ionización a concentraciones bajas. Sin embargo, estos tres analitos presentaron excelentes valores de %PE a la concentración de 100 ng/mL, lo que aseguró su cuantificación exacta. Estos resultados son mejores que los publicados por otros autores que usan SPE [9, 10, 15] o MEPS para extraer drogas de abuso clásicas de fluido oral [19].

Tabla 5.5. Valores de efecto matriz (EM) y eficacia de proceso (PE) de los compuestos estudiados en OF (n=6).

Compuesto	EM (Media ± SD)	%PE ± SD			
		10 ng/mL	25 ng/mL	50 ng/mL	100 ng/mL
Morfina	28 ± 2	47 ± 6	30 ± 4	22 ± 3	87 ± 8
Naloxona	21 ± 1	94 ± 11	107 ± 11	102 ± 5	105 ± 10
Metilona	97 ± 10	75 ± 8	78 ± 2	76 ± 2	93 ±10
Flefedrona	70 ± 2	60 ± 2	62 ± 2	64 ±10	100 ± 14
Etilcatinona	93 ± 3	114 ± 7	100 ± 13	116 ± 13	125 ± 3
Etilcatinona efedrina	84 ± 3	106 ± 8	85 ± 6	88 ± 9	96 ± 7
Escopolamina	80 ± 2	54 ±13	58 ± 8	44 ± 7	86 ± 11
6-MAM	98 ± 10	99 ± 7	87 ± 13	86 ± 5	93 ± 9
Etilona	108 ± 5	110 ± 8	107 ± 4	91 ± 5	91 ± 13
Metilefedrina	102 ± 3	100 ± 8	98 ± 5	87 ± 8	101 ± 6
Butilona	107 ± 6	98 ± 13	92 ± 7	84 ± 4	125 ± 7
Mefedrona	117 ± 4	86 ± 10	100 ± 6	90 ± 7	124 ± 3
Pentedrona	100 ± 2	99 ± 11	75 ± 4	98 ± 16	99 ± 2
BEG	117 ± 10	112 ± 3	110 ± 15	99 ± 9	85 ± 6

Tabla 5.5. Valores de efecto matriz (EM) y eficacia de proceso (PE) de los compuestos estudiados en OF (n=6) (*continuación*).

Compuesto	EM (Media ± SD)	%PE ± SD			
		10 ng/mL	25 ng/mL	50 ng/mL	100 ng/mL
Cocaína	107 ± 4	86 ± 18	79 ± 10	92 ± 12	105 ± 5
MDVP	106 ± 3	91 ± 5	92 ± 4	85 ± 4	72 ± 6
Cocaetileno	107 ± 6	88 ± 4	95 ± 4	87 ± 3	108 ± 5
Pirovalerona	95 ± 2	97 ± 6	100 ± 5	92 ± 3	102 ± 7
EDDP	102 ± 3	99 ± 8	98 ± 5	90 ± 4	104 ± 6
Buprenorfina	92 ± 2	107 ± 12	100 ± 4	94 ± 5	92 ± 7
Metadona	104 ± 6	94 ±7	85 ± 3	82 ± 3	111 ± 2

SD: Desviación estándar.

5.3.3. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES

La capacidad del método propuesto para determinar las drogas estudiadas, se evaluó analizando muestras de OF de doce pacientes en un programa de terapia de sustitución con metadona o buprenorfina/naloxona. El volumen recogido con el dispositivo de muestreo Salivette® permitió analizar las muestras por duplicado. Las muestras de los pacientes en la terapia con metadona también contenían su metabolito EDDP.

Todas las muestras dieron positivo para al menos uno de los compuestos. Las concentraciones encontradas se muestran, a modo de ejemplo, en la **Tabla 5.6** y los cromatogramas MRM para la muestra 4 se presentan en la **Figura 5.6**. Las muestras reales que dieron positivo para los diferentes analitos contenían: 734-3734 ng/mL de morfina, 24-310 ng/mL de 6-MAM, 7-19296 ng/mL de cocaína, 13-26582 ng/mL de BEG, <LOQ-14 ng/mL de cocaetileno, 7-2355 ng/mL de metadona, 8-78 ng/mL de EDDP, 114-433 ng/mL de naloxona y 1502-4197 ng/mL de buprenorfina. Como se puede observar en la **Tabla 5.6**, el 83% de los sujetos consumieron metadona y el 17% estaban en terapia con buprenorfina/naloxona. Aunque el 75% de los individuos consumieron cocaína, sus metabolitos BEG y cocaetileno se asociaron al consumo de cocaína en sólo el 67% y el 50% de los sujetos, respectivamente. Finalmente, el uso de heroína se evidenció por la presencia de sus metabolitos 6-MAM (33%) y morfina (25%). Algunos sujetos exhibieron concentraciones de drogas ilícitas que eran compatibles con el uso reciente de heroína (3 casos para morfina y 4 para 6-MAM) y/o cocaína (9 casos para cocaína, 6 casos para cocaetileno y 8 para BEG).

Tabla 5.6. Resultados de la determinación de drogas de abuso en fluido oral por MEPS-UHPLC-MS/MS (ng/mL) (n=2).

Muestra	Morfina	6-MAM	Cocaína	BEG	Cocaetileno	Metadona	EDDP	Naloxona	Buprenorfina
1	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	328 ± 11	15 ± 1	Nd	Nd
2	Nd	Nd	7 ± 1	13 ± 4	Nd	505 ± 12	16 ± 1	Nd	Nd
3	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	144 ± 2	9 ± 0.3	Nd	Nd
4	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	433 ± 110	4197 ± 363
5	Nd	Nd	926 ±161	1180 ± 288	14 ± 1	7 ± 0.03	8 ± 1	Nd	Nd
6	Nd	24 ± 8	89 ± 23	85 ± 10	<LOQ	Nd	Nd	114 ± 15	1502 ± 109
7	734 ± 187	109 ± 16	19296 ± 197	26582 ± 3041	<LOQ	134 ± 7	17 ± 1	Nd	Nd
8	Nd	Nd	19 ± 8	Nd	Nd	1455*	78 ± 1	Nd	Nd
9	Nd	Nd	14 ± 1	< LOQ	Nd	7 ± 0.2	8 ± 1	Nd	Nd
10	3734*	310 ± 48	121 ± 4	446 ± 31	<LOQ	89 ± 1	10 ± 0.4	Nd	Nd
11	1194*	202 ± 11	21 ± 3	56 ± 1	<LOQ	2355*	13 ± 0.3	Nd	Nd
12	Nd	Nd	30 ± 1	43 ± 0.2	<LOQ	237 ± 0.1	15 ± 0.2	Nd	Nd

Nd: no detectado.
*n=1.

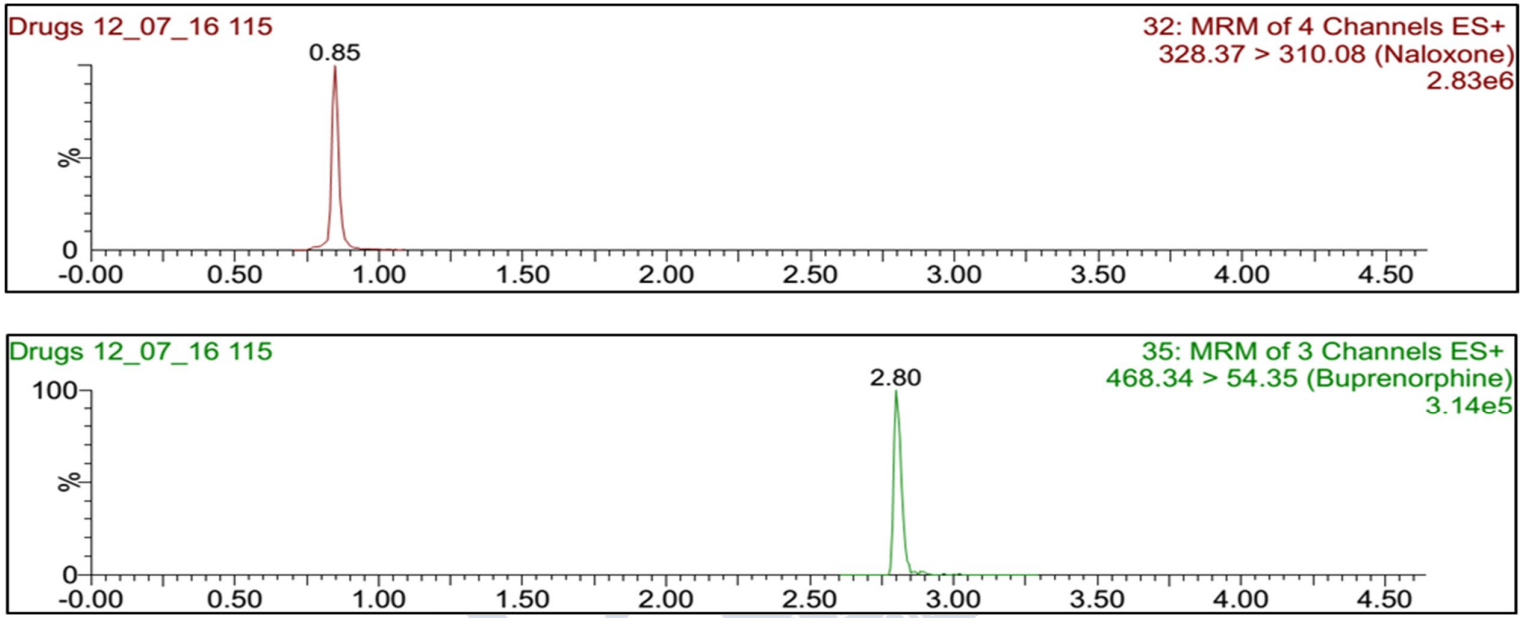


Figura 5.6. Cromatograma UPLC-MS/MS en modo MRM de dos compuestos detectados (naloxona y buprenorfina) en la muestra real 4 de la **Tabla 5.6**.

5.4. CONCLUSIONES

El procedimiento de MEPS es una versión miniaturizada de SPE basada en los mismos principios fisicoquímicos y materiales adsorbentes que la técnica original. Se optimizó un método MEPS-UHPLC-MS/MS para la extracción simultánea de veintiuna drogas de abuso, incluidas once nuevas sustancias psicoactivas (NSP) y varios metabolitos en el fluido oral (OF). El método propuesto utiliza cantidades de muestras y disolventes reducidas e implica un trabajo de laboratorio ligero. Los resultados obtenidos con muestras reales muestran que el método es útil en sujetos en programas de terapia de sustitución, y también para prevenir y reducir accidentes de tráfico entre usuarios potenciales de drogas.

Debido a que las catinonas sintéticas están estructuralmente relacionadas con las anfetaminas, tienden a dar falsos positivos con los dispositivos de detección rápida *in situ*. Estos errores se pueden evitar utilizando el método propuesto para la confirmación y cuantificación de NPS en OF. Además, el método podría usarse para determinar simultáneamente catinonas sintéticas, naloxona, buprenorfina y escopolamina en OF.

Finalmente, se sugiere que el desarrollo de nuevos adsorbentes basados en nanomateriales sensibles a estímulos y polímeros de impronta molecular está destinado a ampliar el alcance de MEPS para cuantificar NPS en matrices biológicas.

5.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime), Worlds Drug Report. New Psychoactive Substances: Concepts and Definitions, Vienna, 2013, pp. 60–115. http://www.unodc.org/unodc/secured/wdr/wdr2013/World_Drug_Report_ 2013.pdf (acceso mayo 2021).

[2] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, European Drug Report 2016: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2016. http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2637/TDAT16001ENN.pdf (acceso mayo 2021).

[3] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, New Psychoactive Substances in Europe, An Update from the EU Early Warning System (March 2015), Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2015. http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_235958_EN_TD0415135ENN.pdf (acceso mayo 2021).

[4] Zawilska J.B., Andrzejczak D., Next generation of novel psychoactive substances on the horizon – a complex problem to face, *Drug Alcohol Depend*. 2015, *157*, 1–17.

[5] Sáiz J., Duc Mai T., López López M., Bartolomé C., Hauser P.C., García-Ruiz C., Rapid determination of scopolamine in evidence of recreational and predatory use, *Sci. Justice* 2013, *53*, 409–414.

[6] World Drug Report 2020 (United Nations publication, Sales No. E.20.XI.6) https://wdr.unodc.org/wdr2020/en/exsum.html (acceso mayo 2021).

[7] Anizan S., Huestis M.A., The potential role of oral fluid in antidoping testing, *Clin. Chem*. 2014, *60*, 307–322.

[8] El-Beqqali A., Abdel-Rehim M., Quantitative analysis of methadone in human urine samples by microextraction in packed syringe-gas chromatography-mass spectrometry (MEPS-GC-MS), *J. Sep. Sci*. 2007, *30*, 2501–2505.

[9] Langel K., Gunnar T., Ariniemi K., Rajamäki O., Lillsunde P., A validated method for the detection and quantitation of 50 drugs of abuse and medicinal drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 2011, *879*, 859–870.

[10] Hagan K.S., Reidy L., Detection of synthetic cathinones in victims of sexual assault, *Forensic Sci. Int*. 2015, *257*, 71–75.

[11] Lee D., Chronister C.W., Hoyer J., Goldberger B.A., Ethylone-related deaths: toxicological findings, *J. Anal. Toxicol*. 2015, *39*, 567–571.

[12] Swortwood M.J., Boland D.M., DeCapio A.P., Determination of 32 cathinone derivatives and other designer drugs in serum by comprehensive LC-QQQ-MS/MS analysis, *Anal. Bioanal. Chem*. 2013, *405*, 1383–1397.

[13] Concheiro M., Anizan S., Ellefsen K., Huestis M.A., Simultaneous quantification of 28 synthetic cathinones and metabolites in urine by liquid chromatography- high resolution mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem*. 2013, *405*, 9437–9448.

[14] Jankovics P., Váradi A., Tölgyesi L., Lohner S., Palotás J.N., Szalai H.K., Identification and characterization of the new designer drug 4′-methylethcathinone (4-MEC) and elaboration of a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) screening method for seven different methcathinone analogs, *Forensic Sci. Int*. 2011, *210*, 213–220.

[15] Amaratunga P., Lemberg B.L., Lemberg D., Quantitative measurement of synthetic cathinones in oral fluid, *J. Anal. Toxicol*. 2013, *37*, 622–628.

[16] Sykutera M., Cychowska M., Boguslawska E.B., A fatal case of pentedrone and alpha-pyrrolidinovalerophenone poisoning, *J. Anal. Toxicol*. 2015, *39*, 324–329.

[17] de Castro A., Lendoiro E., Vega H.F., Steinmeyer S., Rivadulla M.L., Cruz A., Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of selected synthetic cathinones and two piperazines in oral fluid. Cross reactivity study with an on-site immunoassay device, *J. Chromatogr. A* 2014, *1374*, 93–101.

[18] Concheiro M., Castaneto M., Kronstrand R., Huestis M.A., Simultaneous determination of 40 novel psychoactive stimulants in urine by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and library matching, *J. Chromatogr. A* 2015, *1397*, 32–42.

[19] Montesano C., Simeoni M.C., Curini R., Sergi M., Lo Sterzo C., Compagnone D., Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with LC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem*. 2015, *407*, 3647–3658.

[20] Sergi M., Montesano C., Odoardi S., Rocca L.M., Fabrizi G., Compagnone D., Curini R., Microextraction by packed sorbent coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cannabinoids in oral fluids, *J. Chromatogr. A* 2013, *1301*, 139–146.

[21] Saracino M.A., Marcheselli C., Somaini L., Piere M.C., Gerra G., Ferranti A., Raggi M.A., A novel test using dried blood spots for the chromatographic assay of methadone, *Anal. Bioanal. Chem*. 2012, *404*, 503–511.

[22] Svidrnoch M., Lnenícková L., Válka I., Ondra P., Maier V., Utilization of micellar electrokinetic chromatography-tandem mass spectrometry employed volatile micellar phase in the analysis of cathinone designer drugs, *J. Chromatogr. A* 2014, *1356*, 258–265.

[23] Strano-Rossi S.., Cadwallader A.B., de la Torre X., Botrè F., Toxicological determination and in vitro metabolism of designer drug methylenedioxypyrovalerone (MDPV) by gas chromatography / mass spectrometry and liquid chromatography / quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2010, *24*, 2706–2714.

[24] Abdel-Rehim M., Microextraction by packed sorbents (MEPS): a tutorial, *Anal. Chim. Acta* 2011, *701*, 119–128.

[25] Abdel-Rehim M., Recent advances in microextraction by packed sorbents for bioanalysis, *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 2569–2580.

[26] Moein M.M., Said R., Bassyouni F., Abdel-Rehim M., Solid phase microextraction and related techniques for drugs in biological samples, *J. Anal. Methods Chem*. 2014, *24*, Article ID 921350. http://dx.doi.org/10.1155/2014/921350

[27] Moein M.M., Abdel-Rehim A., Abdel-Rehim M., Microextraction by packed sorbent (MEPS), *Trends Anal. Chem*. 2015, 67, 34–44.

[28] Alves V., Gonçalves J., Conceiçao C., Teixeira H.M., An improved analytical strategy combining microextraction by packed sorbent combined with ultra-high pressure liquid chromatography for the determination of fluoxetine, clomipramine and their active metabolites in human urine, *J. Chromatogr. A* 2015, *1408*, 30–40.

[29] Daryanavard S. M., Jeppsson-Dadoun A., Andersson L.I., Hashemi M., Colmsjö A., Abdel-Rehim M., Molecularly imprinted polymer in microextraction by packed sorbent for the simultaneous determination of local anesthetics: lidocaine, ropivacaine, mepivacaine and bupivacaine in plasma and urine samples, *Biomed. Chromatogr*. 2013, *27*, 1481–1488.

[30] Cristina Jardim V.C., de Paula Melo L., Soares Domingues D., Costa Queiroz M.E., Determination of parabens in urine samples by microextraction using packed sorbent and ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 2015, *974*, 35–41.

[31] Locatelli M., Ferrone V., Cifelli R., Barbacane R.C., Carlucci G., Microextraction by packed sorbent and high performance liquid chromatography determination of seven non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma and urine, *J. Chromatogr. A* 2014, *1367*, 1–8.

[32] Locatelli M., Ciavarella M.T., Paolino D., Celia C., Fiscarelli E., Ricciotti G., Pompilio A., Di Bonaventura G., Grande R., Zengin G., Di Marzio L., Determination of ciprofloxacin and levofloxacin in human sputum collected from cystic fibrosis patients using microextraction by packed sorbent-high performance liquid chromatography photodiode array detector, *J. Chromatogr. A* 2015, *1419*, 58–66.

[33] D'Angelo V., Tessari F., Bellagamba G., De Luca E., Cifelli R., Celia C., Primavera R., Di Francesco M., Paolino D., Di Marzio L., Locatelli M., Microextraction by packed sorbent and HPLC–PDA quantification of multiple antiinflammatory drugs and fluoroquinolones in human plasma and urine, *J. Enzym. Inhib. Med. Chem*. 2016, *31*, 110–116.

[34] Candish E., Gooley A., Wirth H.J., Dawes P.A., Shellie R.A., Hilder E.F., A simplified approach to direct SPE-MS, *J. Sep. Sci*. 2012, *35*, 2399–2406.

[35] Dejaegher B., Vander Heyden Y., Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2011, *56*, 141–158.

[36] https://acis.sergas.es/cartafol/Rede-de-comites-de-etica-da-investigacion (acceso mayo 2021).

[37] World Medical Association, World Medical Association Declaration of Helsinki ethical principles for medical research involving human subjects, *J Am. Med. Assoc*. 2013, *310*, 2191–2194.

[38] Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2018 Silver Spring, Maryland. USA. http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm (acceso mayo 2021).

[39] ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva. Switzerland. 2005. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf (acceso mayo 2021).

[40] Magnusson B., Örnemark U., Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd ed., Eurachem, Teddington, 2014. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf (acceso mayo 2021).

[41] Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M., Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Anal. Chem*. 2003, *75*, 3019–3030.

[42] Kruve A., Rebane R., Kipper K., Oldekop M.L., Evard H., Herodes K., Ravio P., Leito I., Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: part II, *Anal. Chim. Acta* 2015, *870*, 8–28.

[43] Mathieu D., Nony J., Phan-Tan-Luu R., NemrodW®, Version 2011, LPRAI, Marseille.

[44] Lewis G.A., Mathieu D., Phan-Tan-Luu R., Pharmaceutical Experimental Design, Marcel Dekker, New York, 1999.

CAPÍTULO IV. DETERMINACIÓN DE FENTANILOS

Presentación a congresos relacionados con este capítulo:

Póster: "An effective analytical approach to determine synthetic opioids in oral fluid samples", 23th International Symosium on Advances in Extraction Tehcnologies (ExTech), 29 junio-2 julio 2021, Alicante (España).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

F. DETERMINACIÓN DE FENTANILOS EN FLUIDO ORAL.

6.1. INTRODUCCIÓN

Fentanilo es un opioide sintetizado por Paul Janssen en 1960, que posee una mayor potencia (50-100 veces) narcótica que la morfina. Pertenece a una familia de compuestos basados en una cadena principal de feniletilpiperidina y posee múltiples sitios para la adición o sustitución de varios grupos funcionales químicos para producir subfamilias de compuestos, conocidos como fentanilos, con efectos analgésicos o tóxicos similares o incluso superiores [1, 2] (**Figura 6.1**).

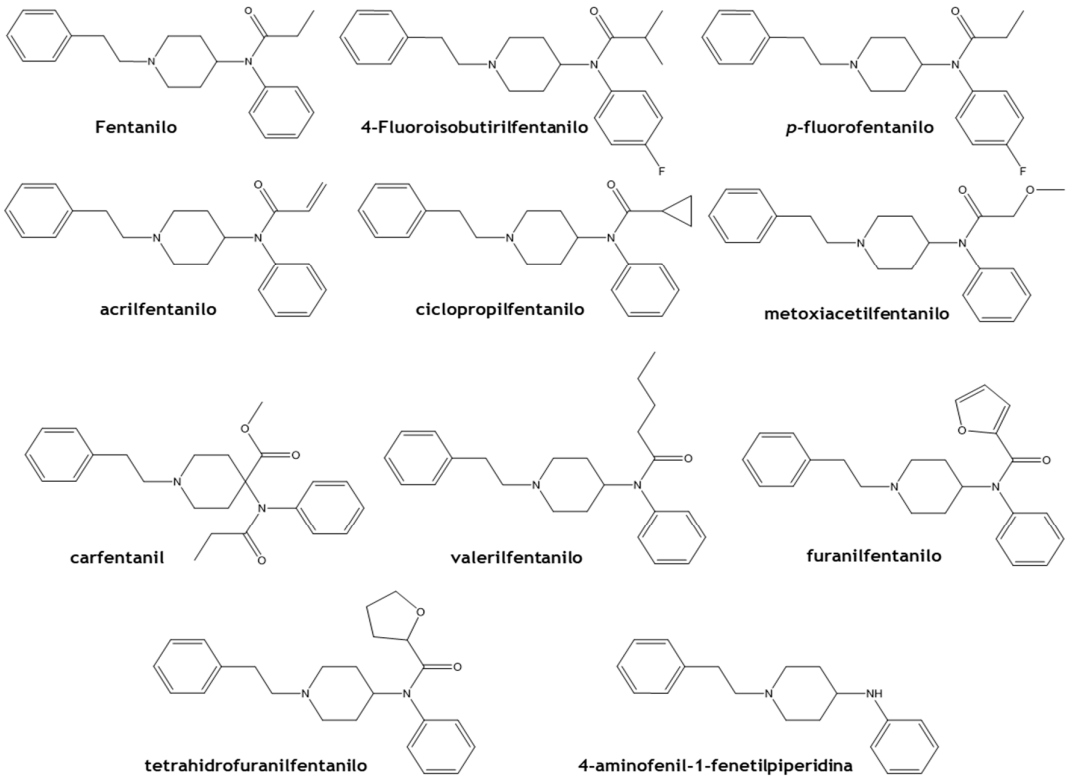


Figura 6.1. Estructuras de los fentanilos estudiados en este trabajo.

Un pequeño número de fentanilos se ha utilizado ampliamente en medicina humana (fentanilo, alfentanilo, sufentanilo y remifentanilo) para el control del dolor y en anestesia, y en medicina veterinaria, como en el caso del carfentanilo y tiafentanilo, para inmovilizar animales grandes. Por otro lado, los fentanilos tienen un largo historial de abuso ilícito como sustitutos de la heroína y otros opioides naturales o semisintéticos controlados, o en mezclas con estes compuestos. Se ha estimado que el fentanilo estaba involucrado en el 41% de las aproximadamente 7100 muertes relacionadas con la heroína en Estados Unidos entre 2012 y 2014 [2]. Además, la disponibilidad de fentanilo en Estados Unidos había comenzado a aumentar exponencialmente pasando de notificarse aproximadamente 4500 casos en 2014 a más de 14400 casos en 2015 [3]. En los últimos años, ha habido un gran aumento en la disponibilidad de compuestos de la familia de fentanilo en Estados Unidos, Canadá y Europa [4, 5]. Desde 2009, se han detectado 57

nuevos opioides sintéticos en el mercado de drogas de Europa, según el *Informe Europeo sobre Drogas* [6], que incluye ocho notificados por primera vez en 2019. En 2019, sólo dos de estos opioides eran derivados de fentanilo, representando una pequeña proporción en comparación con años anteriores [6]. En 2017, se habían sometido a fiscalización internacional 15 análogos del fentanilo, entre ellos, acrilfentanilo, furanilfentanilo, 4-fluoroisobutirilfentanilo, tetrahidrofuranilfentanilo, carfentanilo, metoxiacetilfentanilo y ciclopropilfentanilo, y dos precursores químicos. Estas sustancias han estado involucradas en más de 250 muertes, muchas de las cuales se atribuyeron directamente a estas sustancias [2, 4].

Por ello, se requieren métodos analíticos sensibles y selectivos para la detección de compuestos similares al fentanilo, ya que estos compuestos son muy potentes, y se presentan en concentraciones bajas. La técnica analítica más popular en el campo del bioanálisis es la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) [7-13]. Sin embargo, esta técnica requiere de grandes volúmenes de disolventes orgánicos y su instrumentación es bastante costosa. La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) también se usa habitualmente en los laboratorios de toxicología forense para la identificación y cuantificación de drogas de abuso y otros compuestos de interés toxicológico en diferentes matrices [14-19].

Por otro lado, la etapa de preparación de muestra es el paso más importante en el desarrollo de un método analítico. El objetivo fundamental es extraer el analito de interés de la matriz que lo contiene, previamente a su determinación mediante la técnica analítica seleccionada. Las técnicas de extracción más usadas en la extracción de fentanilo y sus derivados en matrices complejas son la extracción líquido-líquido [7, 11, 12] y la extracción en fase sólida [8-10, 18, 20, 21]. Sin embargo, estas dos técnicas convencionales requieren de grandes volúmenes de disolventes orgánicos y de muestra, la cual, está limitada en toxicología forense. Por ello, en los últimos años, se han implementado una serie de tendencias en el desarrollo de métodos analíticos, que conducen a la miniaturización de estas técnicas tradicionales. Se han desarrollado metodologías que hacían uso de técnicas miniaturizadas para la extracción de fentanilos en diferentes matrices biológicas. Saraji *et al*. [22] compararon las técnicas de microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y microextracción líquido-líquido de fibra hueca (HF-LPME) para la determinación de fentanilo, alfentanilo y sufentanilo en muestras de agua, plasma y orina. Gardner *et al*. [23] también utilizaron la DLLME para el análisis de fentanilo en muestras de orina. Da Cunha *et al.* [13] desarrollaron un método basado en la MEPS, una miniaturización de la SPE, para la determinación de nueve fentanilos (fentanilo, sufentanilo, alfentanilo, acrilfentanilo, tiofentanilo, valerilfentanilo, furanilfentanilo, acetilfentanilo y carfentanil) en muestras de orina. En 2014, Kabir y Furton usaron la tecnología del recubrimiento *sol-gel* para desarrollar una nueva técnica de extracción (*Fabric phase sorptive extraction*, FPSE), donde se usa un recubrimiento uniforme ultrafino sobre un pequeño fragmento de tela natural o sintética [24]. Esta técnica combina los mecanismos de extracción de la SPE (extracción exhaustiva) y la SPME (extracción de equilibrio) en una sola. A pesar de ser una técnica relativamente nueva, ya ha sido aplicada satisfactoriamente en la extracción de diferentes compuestos de interés toxicológico, tales como: antidepresivos [25], benzodiacepinas [25], anfetaminas [27], antiinflamatorios [28] o antibióticos [29] en muestras biológicas.

El objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de un método de determinación de fentanilo y diez derivados sintéticos (4-aminofenil-1-fenetilpiperidina, 4-fluoroisobutirilfentanilo, *p*-fluorofentanilo, acrilfentanilo, ciclopropilfentanilo,

metoxiacetilfentanilo, carfentanil, furanilfentanilo, valerilfentanilo y tetrahidrofuranilfentanilo) basado en la técnica FPSE y su posterior análisis mediante GC-MS. Basándose en la escasa literatura científica publicada sobre técnicas miniaturizadas de extracción para este tipo de compuestos, no se han publicado estudios usando la FPSE para extraer fentanilos en muestras forenses combinada con cromatografía de gases-espectrometría de masas.

6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

6.2.1. COMPUESTOS Y REACTIVOS

4-aminofenil-1-fenetilpiperidina (4-ANPP), 4-fluoroisobutirilfentanilo (4-FIBF), *p*-fluorofentanilo (*p*-FF), acrilfentanilo (AF), ciclopropilfentanilo (CPF), metoxiacetilfentanilo (MAF), carfentanil, furanilfentanilo (FF) y tetrahidrofuranilfentanilo (THFF), todos con una concentración de 1 mg/mL, valerilfentanilo (VF) y furanilfentanilo-d5 (FF-d5), a una concentación de 100 µg/mL, fueron proporcionados por Chiron AS (Stiklestadveien, Trondheim, Noruega). Fentanilo (1 mg/mL), y los patrones internos (IS) 4-ANPP-d5, fentanilo-d5 y VF-d5, todos a una concentración de 100 µg/mL, fueron obtenidos de Cerillant (Round Rock, TX, EEUU) (**Tabla 6.1**). Acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH) y acetato de etilo (EtOAc) en grado gradiente, y fosfato disódico anhidro fueron comprados a Merck (Darmstadt, Alemania). Un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, EEUU) fue usado para purificar el agua. Jeringas Omnifix^{TM}-F de un solo uso (1 mL) fueron proporcionadas por Braun (Barcelona, España), y los filtros de jeringa PTFE (0.22 µm de tamaño de poro) fueron comprados a Thermo Scientific (Waltham, MA, EEUU). Las membranas funcionalizadas para la FPSE fueron proporcionadas amablemente por el Profesor A. Kabir del departamento de Química y Bioquímica del Instituto Internacional de Investigación Forense de la Universidad Internacional de Florida (Miami, FL, EEUU).

Las disoluciones madre individuales para cada fentanilo en una concentración de 1 mg/mL o 100 µg/mL, suministradas en metanol o acetonitrilo, se almacenaron a -20 °C. Las disoluciones de trabajo con todos los analitos, utilizadas para la optimización y los experimentos adicionales, se prepararon diariamente mediante la dilución adecuada de las disoluciones madre en metanol o acetato de etilo. Las curvas de calibración de adición estándar se construyeron en el rango de concentraciones (5-1500 ng/mL), fortificando muestras de fluido oral (OF) blanco (libre de analitos) con alícuotas tomadas a partir de las disoluciones de trabajo. Los patrones internos se prepararon (250 ng/mL) mediante dilución de las disoluciones estándar. Las muestras de control de calidad (QC) se prepararon con adiciones a tres niveles de concentración (75, 250 y 1000 ng/mL) sobre la muestra de OF blanco.

Tabla 6.1. Propiedades físico-químicas de los opoioides sintéticos estudiados.

Compuesto	Nombre IUPAC	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	pKa	log P
4-aminofenil-1-fenetilpiperidina (4-ANPP)	*N*-phenyl-1-(2-phenylethyl)-4-piperidinamine	$C_{19}H_{24}N_2$	280.41	9.03	3.98
4-Fluoroisobutiril fentanilo (4-FIBF)	*N*-(4-fluorophenyl)-*N*-(1-phenylethylpiperidin-4-yl)isobutyramide	$C_{23}H_{29}FN_2O$	368.50	8.91	4.15

Tabla 6.1. Propiedades físico-químicas de los opoioides sintéticos estudiados (*continuación*).

Compuesto	Nombre IUPAC	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	pKa	log P
***p*-Fluorofentanilo (*p*-FF)**	*N*-(4-fluorophenyl)-*N*-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]propanamide	$C_{22}H_{27}FN_2O$	354.46	8.91	3.80
Acrilfentanilo (AF)	*N*-phenyl-*N*-[1-(2-phenethyl)piperidin-4-yl]prop-2-enamide	$C_{22}H_{26}N_2O$	334.46	8.72	3.20
Carfentanil	Methyl 1-(2-phenylethyl)-4-[phenyl(propanoyl)amino]piperidine-4-carboxylate	$C_{24}H_{30}N_2O_3$	394.51	7.76	3.68
Ciclopropilfentanilo (CPF)	*N*-phenyl-*N*-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]cyclopropanecarboxamide	$C_{23}H_{28}N_2O$	348.49	8.75	3.56
Fentanilo	*N*-phenyl-*N*-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]propanamide	$C_{22}H_{28}N_2O$	336.47	8.92	3.68
Furanilfentanilo (FF)	*N*-phenyl-*N*-[1-(2-phenethyl)piperidin-4-yl]-furan-2-carboxamide	$C_{24}H_{26}N_2O_2$	374.48	8.71	5.28
Methoxiacetilfentanilo (MAF)	2-methoxy-*N*-phenyl-*N*-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]acetamide	$C_{22}H_{28}N_2O_2$	352.48	8.88	2.57
Tetrahidrofuranilfentanilo (THFF)	(*N*-phenyl-*N*-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]oxolane-2-caeboxamide	$C_{24}H_{30}N_2O_2$	378.52	8.71	2.82
Valeril fentanilo (VF)	*N*-(1-(2-Phenylethyl)-4-piperidinyl)-*N*-phenylpentylamide	$C_{24}H_{32}N_2O$	364.52	8.92	4.70

6.2.2. MUESTRAS DE FLUIDO ORAL

Se obtuvieron muestras de fluido oral humano, libre de drogas y otras sustancias psicoactivas, de voluntarios sanos utilizando dispositivos Salivette® (Sarstedt, Alemania). El dispositivo está disponible con un hisopo de algodón simple, que se introduce en el interior de la boca. El hisopo debe masticarse suavemente durante aproximadamente un minuto, para estimular la salivación. Finalmente, el hisopo se transfiere al tubo para su posterior centrifugación. Las muestras de OF recolectadas se almacenaron a -20 °C hasta sus análisis, sin la ayuda de estimulantes salivares externos ni ningún tipo de pretratamiento. Todos los estudios fueron realizaron de acuerdo a los "Principios éticos para la investigación médica con seres humanos" de la Asociación Médica Mundial y de acuerdo con los criterios de evaluación y la posterior autorización establecidos por el Comité de Ética en Investigación de Galicia (España) [30, 31].

6.2.3. EXTRACCIÓN CON FPSE

Previamente a la etapa de extracción, la membrana FPSE recubierta con *sol-gel* CW 20M (1 x 1 cm) se sumergió en 2 mL de una disolución de ACN/MeOH (50:50, v/v)

durante 5 minutos para eliminar cualquier residuo indeseable. Posteriormente, la membrana se enjuagó con 2 mL de agua ultrapura durante 5 minutos, para eliminar los posibles restos de disolventes orgánicos. Este procedimiento se llevó a cabo mediante las especificaciones proporcionadas por el Prof. Kabir. En las condiciones finales optimizadas, la fase FPSE limpia se transfirió a un vial de vidrio con tapón de rosca de 5 mL, el cual contenía 500 µL de OF fortificado en la concentración deseada (ajustado a pH 7). El vial se sometió a agitación en baño de ultrasonidos (FB15055 Fisherbrand®, Madrid, España) a 25 °C, durante 30 min. Luego, se retiró la membrana FPSE del vial, se lavó con agua ultrapura y se secó sobre un papel sin pelusa. Posteriormente, se puso en contacto con 250 µL de acetato de etilo, con agitación en baño de ultrasonidos a 25 °C, durante 10 min. Finalmente, se retiró la membrana FPSE y el extracto resultante se filtró (filtros PTFE de 0.22 µm) y se analizó por GC-MS. La fase FPSE se puede reutilizar después de un lavado final de 10 minutos con 2 mL de ACN/MeOH (1:1, v/v).

6.2.4. CONDICIONES GC-MS

El análisis mediante GC-MS se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 7890B combinado con un muestreador de líquidos automático Agilent 7650A y un detector de espectrometría de masas de cuadrupolo simple, Agilent 5977B (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, Estado Unidos). La separación se realizó empleando una columna capilar HP-5MS (30 m x 0.25 mm de d.i., 0.25 µm de espesor) de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EE. UU). Se utilizó helio con una pureza de 99.9999% (Nippon Gases, España) como gas portador a un flujo constante de 1.2 mL/min. La temperatura inicial del horno de GC se fijó en 100 °C (manteniendo dicha temperatura durante 1 min) y se incrementó en un gradiente de 42 °C/min hasta 200 °C, y hasta 280 °C con un nuevo gradiente de 15 °C/min, manteniendo esa temperatura 12 min. El tiempo de separación de los once compuestos fue finalmente de 20.71 minutos. El volumen inyectado se fijó en 1 µL, inyectando en modo *splitless*.

El espectrómetro de masas se hizo funcionar en el modo positivo de ionización por impacto de electrones (EI) (70 eV). Las temperaturas de la línea de transferencia, la fuente de MS y el cuadrupolo de MS se establecieron en 235 °C, 230 °C y 150 °C, respectivamente. Inicialmente, se usó un modo de escaneo completo (rango de masa 50-550 amu) para seleccionar los iones de mayor intensidad para cada compuesto. La identificación y determinación de los análogos de fentanilo se realizó mediante los tiempos de retención y las relaciones *m/z* de los iones característicos. Se seleccionó el ión más intenso para la cuantificación, y se seleccionararon los dos siguientes como cualificadores [32], utilizando el modo de monitorización selectiva de iones (SIM) para determinar los analitos de interés. El porcentaje de cualificador (q)/ cuantificador (Q) se determinó dividiendo la abundancia de los iones cualificadores seleccionados por la del ión objetivo (cuantificador) multiplicado por 100 (**Tabla 6.2**).

Tabla 6.2. Tiempos de retención y valores *m/z* para los fentanilos estudiados.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Ión cuantificador (Q) (*m/z*)	Iones cualificadores (q_1, q_2) (*m/z*)	% relación de iones (q/Q)	
				q_1	q_2
4-ANPP	08.4 ± 0.2	146	189, 91	77.4	27.7
4-FIBF	09.5 ± 0.2	277	164, 207	45.9	39.3

Tabla 6.2. Tiempos de retención y valores *m/z* para los fentanilos estudiados (*continuación*).

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Ión cuantificador (Q) (*m/z*)	Iones cualificadores (q_1, q_2) (*m/z*)	% relación de iones (q/Q)	
				q_1	q_2
***p*-FF**	09.7 ± 0.2	263	164, 207	53.0	25.2
Fentanil	09.9 ± 0.2	245	146, 189	57.1	32.1
AF	10.1 ± 0.2	243	146, 189	56.0	24.5
CPF	10.8 ± 0.2	257	146, 189	50.1	43.7
MAF	10.9 ± 0.2	261	158, 218	24.8	21.1
Carfentanil	10.9 ± 0.2	303	187, 154	14.8	12.5
VF	11.1 ± 0.2	273	146, 189	80.0	47.7
FF	12.9 ± 0.2	283	240, 158	58.3	17.8
THFF	13.2 ± 0.2	287	146, 189	50.4	32.7

6.2.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

De acuerdo con las directrices internacionales de la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA), el Grupo de Trabajo Científico de Toxicología Forense (*Scientific Working Group for Forensic Toxicology*, SWGTOX) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) [33-35], el método fue validado en términos de linealidad, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), precisión y exactitud (sesgo), recuperación, efecto matriz, y estabilidad. El modelo de calibración se estableció utilizando curvas de calibrado de al menos seis niveles de concentración, entre el LOQ de cada analito hasta 1500 ng/mL, con cinco replicados por concentración. El límite de detección se definió como la concentración más baja con una relación señal-ruido ≥ 3. El criterio del límite de cuantificación se estableció con una relación señal-ruido de al menos 10 y se cuantificó dentro de 20% de precisión de cada concentración. El LOD y el LOQ se evaluaron con concentraciones decrecientes de analito en muestras de OF procedente de seis fuentes diferentes, enriquecidas con los analitos de interés. La precisión y la exactitud (sesgo) se evaluaron en tres niveles de concentración: QC bajo (50 o 75 ng/mL, dependiendo del compuesto), QC medio (250 ng/mL) y QC alto (1000 ng/mL) por triplicado en cinco días diferentes (n=15). Se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) para cada concentración de muestras QC con el fin de evaluar la variabilidad potencialmente significativa entre días (nivel de confianza de 95%, $p<0.05$). La precisión se evaluó midiendo el coeficiente de variación (CV) entre las muestras y el criterio de aceptación establecido por las guías de validación fue que el %CV no debería exceder el 20% en cada nivel de concentración. El sesgo se determinó calculando el porcentaje de error de las muestras QC para cada nivel de concentración considerado. El sesgo aceptable promedio más alto de la concentración nominal no debería exceder del ± 20%. El efecto matriz (EM) se estudió calculando la relación entre la pendiente de la curva de calibrado para cada fentanilo después de una adición post-extracción (muestra blanco de fluido oral

sometida al procedimiento FPSE, con adición posterior de los compuestos e IS) y la pendiente de la curva de calibrado de patrón externo, utilizando la siguiente ecuación:

$$EM\ (\%) = \left(\frac{pendiente\ adición\ postextracción}{pendiente\ patrón\ externo}\right) x\ 100$$

Se consideró que no existe efecto matriz si el valor está próximo al 100%, mientras que se confirma la existencia de EM con % inferiores al 20%. La recuperación se evaluó utilizando las muestras QC anteriores, con cinco replicados para cada uno de los tres niveles de concentración considerados. Los valores de recuperación (%) se calcularon como:

$$Recuperación\ (\%) = \left(\frac{concentración\ obtenida}{concentración\ añadida}\right)\ x\ 100$$

donde la *concencentración obtenida* es la concentración del compuesto medida en las muestras QC y la *concentración añadida* es el nivel de concentración de los compuestos adicionado a las muestras QC. Se consideró como criterio de aceptación aquellas recuperaciones próximas al 100% y dentro del rango 80-120%. Se realizó un estudio de estabilidad mediante la aplicación de ciclos de congelación-descongelación de muestras, y la estabilidad de los analitos en el extracto colocado en el automuestreador del sistema GC-MS para su análisis. La estabilidad durante la congelación-descongelación se realizó en muestras de QC en el nivel bajo de concentración y QC en el nivel alto de concentración (n=3). El OF se enriqueció con disoluciones patrón de los analitos el día cero y se procedió a su extracción y medida. Se cuantificaron tres alícuotas de cada concentración y las muestras de OF restantes se almacenaron a -20 °C, y se aplicó durante 5 ciclos de congelación-descongelación (tres ciclos/24 h y dos ciclos/7 días). La estabilidad del automuestreador se evaluó también con muestras QC en el nivel bajo de concentración y QC en el nivel alto de concentración (n=3). Las muestras QC se analizaron el día cero, se almacenaron en el automuestreador a 20°C ± 2 y se volvieron a inyectar durante 72 h. En los dos estudios de estabilidad descritos anteriormente, los analitos se consideraron estables dentro de ± 20% y se requirió que estuvieran dentro de 80-120% de recuperación.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1. OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLO FPSE

Con el fin de maximizar la eficiencia de extracción del método FPSE, se investigaron en primer lugar el tipo de recubrimiento de la fase FPSE y el tipo de disolvente de desorción. A continuación, se evaluaron simultáneamente mediante un diseño experimental varios factores que pueden afectar al rendimiento de la extracción y desorción, tales como: el volumen de la muestra, el tiempo de extracción, el modo de agitación, el volumen de disolvente de desorción y el pH de la muestra.

6.3.1.1.SELECCIÓN DEL TIPO DE FASE FPSE

El fentanilo y sus derivados poseen valores de polaridad en un rango amplio con *log P* que van desde 2.57, para MAF, a 5.28, para FF (**Tabla 6.1**). Por lo tanto, se evaluó el tipo de recubrimiento de la membrana FPSE con diferentes sorbentes *sol-gel* de diferentes polaridades, con el fin de seleccionar la fase FPSE más adecuada para la extracción de estos compuestos. Se investigaron cuatro polaridades diferentes de

recubrimientos de sorbentes *sol-gel*: tres sorbentes biocomplatibles, como *sol-gel* poli(dimetildifenilsiloxano) (PDMDPS, no polar), *sol-gel* poli(tetrahidrofurano) (PTHF, medio-polar) y *sol-gel* poli(etilenglicol) (Carbowax 20M, altamente polar), y un sorbente no biocompatible, *sol-gel* C_{18} (no polar). Destacar que, aunque el *sol-gel* C_{18} no es biocompatible, se usa frecuentemente en SPE y MEPS, como un sorbente común para compuestos polares y no polares [13, 36, 37]. Todos los recubrimientos se elaboraron sobre 100% algodón (celulosa) como sustrato, proporcionando una fuerte propiedad hidrofílica a la membrana FPSE. Los experimentos iniciales se llevaron a cabo con 1 mL de agua ultrapura con adición de una concentración de 1 µg/mL de cada analito. Las extracciones se llevaron a cabo durante 30 minutos con agitación magnética. La desorción se realizó con 500 µL de acetato de etilo, el cual es compatible con GC-MS, con agitación magnética durante 15 min. Todos los experimentos se efectuaron por triplicado para cada fase FPSE. Finalmente, los extractos se filtraron y se inyectaron en el sistema GC-MS. Por otro lado, Kabir *et al*. [38] desarrollaron un algoritmo de cálculo denominado calculadora de recuperación absoluta (ARC) para cada uno de los sorbentes FPSE, con el fin de simplificar el proceso de selección de fases [26, 29, 39-41]. Esta ARC se basa en un modelo matemático de segundo orden que correlaciona los valores de *log* K_{ow} de una amplia gama de analitos de interés con sus eficiencias de extracción para cada sorbente químico FPSE. Esto se puede utilizar como una herramienta predictiva para seleccionar la fase FPSE apropiada. Los valores de eficiencia de extracción previstos para todos los fentanilos y sus recuperaciones absolutas se muestran en la **Tabla 6.3** para las fases estudiadas. Se obtuvieron diferencias en los valores de recuperaciones reales, con respecto a las recuperaciones esperadas o predichas. En la técnica FPSE predominan las interacciones dipolo-dipolo, dispersión de London y las interacciones π-π entre el sorbente y los analitos para una extracción eficaz [42]. Además, las fases FPSE recubiertas con las disoluciones *sol-gel* Carbowax 20M estimulan las interacciones de enlaces de hidrógeno con el analito si contienen donantes y aceptores de enlaces de hidrógeno. Cuanto mayor sea el número total de donantes y aceptores de enlaces de hidrógeno en un analito, mayor es la probabilidad de una interacción satisfactoria entre el analito y el sorbente, lo que da como resultado una mayor eficiencia de extracción. Sin embrago, la ausencia de donantes y aceptores provoca una pérdida en la recuperación de la extracción en comparación con el valor esperado a su valor *log* K_{ow}. En este caso, los fentanilos presentan un bajo número de donantes y aceptores de enlaces de hidrogeno (entre 2 y 4), lo que puede explicar las bajas recuperaciones encontradas con respecto a las previstas por el modelo matemático. Aún así, basándose en la ARC, se ha predicho que el *sol-gel* CW20M es el mejor sorbente para los fentanilos estudiados.

Tabla 6.3. Recuperación esperada y valores absolutos reales de recuperación para los fentanilos en los sorbentes *sol-gel* individuales.

Compuesto	Recuperación absoluta prevista (%)				Recuperación absoluta experimental (%)
	sol-gel C_{18}[a]	*sol-gel* PDMDPS[b]	*sol-gel* PTHF[c]	*sol-gel* CW 20M[d]	*sol-gel* CW 20M
4-ANPP	74.08	39.41	74.40	90.16	79.43
4-FIBF	75.80	41.36	74.76	92.70	99.46
***p*-FF**	72.06	37.32	73.66	87.36	97.57

Tabla 6.3. Recuperación esperada y valores absolutos reales de recuperación para los fentanilos en los sorbentes *sol-gel* individuales (*continuación*).

Compuesto	Recuperación absoluta prevista (%)				Recuperación absoluta experimental (%)
	***sol-gel* C_{18}[a]**	***sol-gel* PDMDPS[b]**	***sol-gel* PTHF[c]**	***sol-gel* CW 20M[d]**	***sol-gel* CW 20M**
AF	63.43	29.61	68.42	76.62	101.87
Carfentanil	70.66	35.95	73.00	85.51	65.50
CPF	69.04	34.45	72.12	83.43	79.76
Fentanilo	70.64	35.94	73.00	85.49	80.70
FF	80.78	51.57	68.24	104.47	73.94
MAF	51.15	20.27	58.31	62.90	12.61
THFF	56.26	24.01	62.75	68.46	24.19
VF	79.56	46.87	73.47	99.46	91.45

[a] ***sol-gel* C_{18}**: $-2.27 + 20.8 \times \log K_{ow} - 4.15 \times (\log K_{ow} - 2.74)^2$; [b] ***sol-gel* PDMDPS**: $-19.6 + 15.5 \times \log K_{ow} - 1.6 \times (\log K_{ow} - 2.74)^2$; [c] ***sol-gel* PTHF**: $12.4 + 17.9 \times \log K_{ow} - 6.0 \times (\log K_{ow} - 2.74)^2$; [d] ***sol-gel* CW 20M**: $4.30 + 22.8 \times \log K_{ow} - 3.13 \times (\log K_{ow} - 2.74)^2$.

Los resultados experimentales (**Figura 6.2**) muestran que el recubrimiento *sol-gel* C_{18} no fue adecuado para la extracción de metoxiacetilfentanilo, furanilfentanilo y tetrahidrofuranilfentanilo. Tampoco el otro recubrimiento no polar, PDMPDPS, fue adecuado para la extracción de furanilfentanilo y tetrahidrofuranilfentanilo. Metoxiacetilfentanilo y tetrahidrofuranilfentanilo son los compuestos más polares de los fentanilos estudiados por lo que difícilmente quedan retenidos en la membrana no polar. Furanilfentanilo es el compuesto menos polar. Posiblemente, FF queda retenido en la membrana FPSE no polar. Sin embargo, el acetato de etilo no es lo suficientemente fuerte para extraerlo de la fase, mientras que en el *sol-gel* Carbowax 20M el compuesto que queda retenido pasa al disolvente orgánico, al ser menos polar que la fase. En general, la fase más polar (Carbowax 20M) fue la más adecuada para cinco de los compuestos, la fase intermedia (PTHF) fue adecuada para tres de los fentanilos, la fase no polar biocompatible (PDMDPS) lo fue para dos de ellos y la fase C_{18} sólo lo fue para AF. Por todo ello, la fase polar fue elegida para los posteriores experimentos, confirmando los resultados obtenidos en el modelo de recuperación de extracción (ARC).

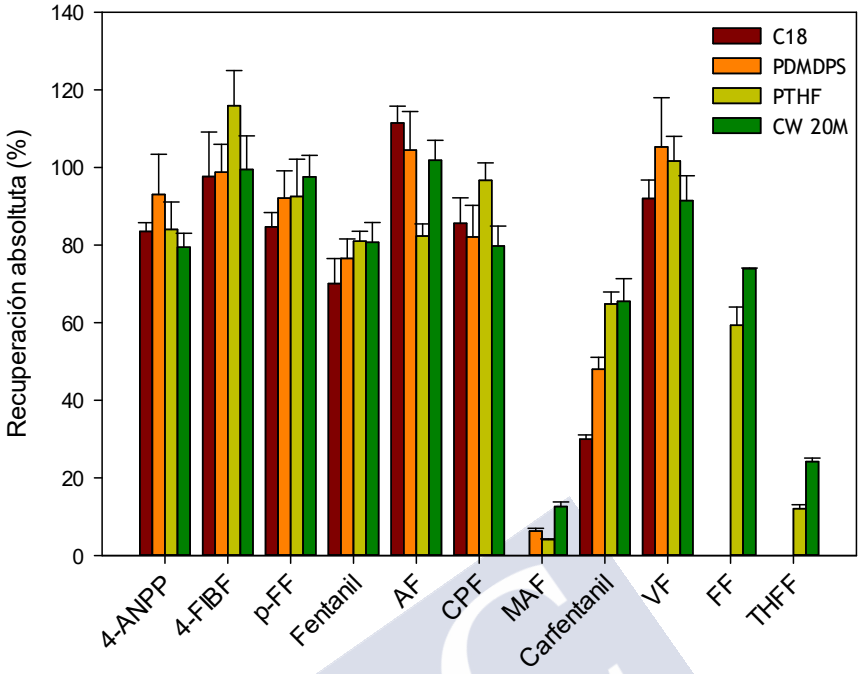


Figura 6.2. Estudio experimental del tipo de fase FPSE para los fentanilos seleccionados (n=3).

6.3.1.2.DISOLVENTE DE DESORCIÓN

En FPSE, al igual que en las técnicas de SPE o MEPS, la selección adecuada del disolvente orgánico es de gran importancia para obtener la mayor eficiencia de extracción para todos los analitos de interés con una determinada fase de extracción. Debido a la fuerte unión química entre el sustrato de la membrana y el recubrimiento, FPSE permite cualquier disolvente para la elución del analito después de la extracción [43]. Se estudiaron como disolventes de desorción acetato de etilo, metanol y una mezcla de acetato de etilo/metanol (1:1, v/v), adecuados para su posterior inyección en GC-MS. El protocolo usado es igual al descrito para la selección del sorbente en el apartado anterior, seleccionando la fase *sol-gel* Carbowax 20M como membrana FPSE. Como puede observarse en la **Figura 6.3**, la mayor eficiencia de extracción para todos los analitos se obtuvo con el acetato de etilo. Por lo tanto, se seleccionó este disolvente para la desorción de los fentanilos.

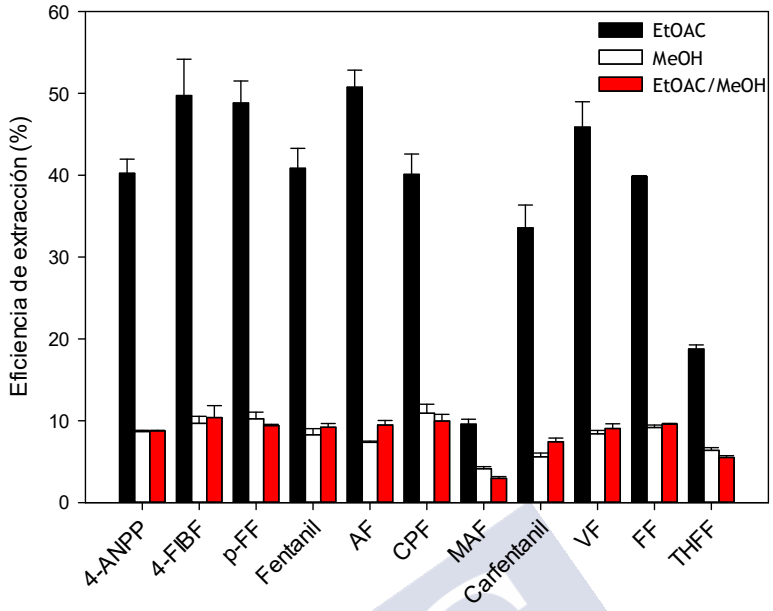


Figura 6.3. Estudio del disolvente de desorción para los fentanilos estudiados (n=3).

6.3.1.3.DISEÑO DE SCREENING

Se utilizó un diseño de *screening* asimétrico $2^3 3^3 4^1//16$ para examinar la influencia de los factores que afectan a la FPSE, tales como el volumen de la muestra, el tiempo de extracción y de desorción, el modo de agitación, el volumen de disolvente de desorción y el pH de la muestra. El objetivo es identificar aquellos factores que realmente influyen en la extracción con el menor número de experimentos posibles. Para ello, se estudiaron siete variables (tres factores con dos niveles, tres factores con tres niveles y un factor con cuatro niveles) en sólo 16 experimentos (**Tabla 6.4**). Las varibles estudiadas fueron:

- b_1: modo de agitación durante la extracción (agitación magnética y con ultrasonidos).
- b_2: modo de agitación durante la desorción (agitación magnética y con ultrasonidos).
- b_3: volumen de disolvente de desorción (250 y 500 µL).
- b_4: volumen de muestra (300, 500 y 800 µL).
- b_5: tiempo de extracción (10, 20 y 30 min).
- b_6: tiempo de desorción (5, 10 y 15 min).
- b_7: pH de la muestra (6, 7, 8 y 9).

Tabla 6.4. Plan de experimentación del diseño de *screening* asimétrico $2^3 3^3 4^1//16$.

N°Exp.	Orden Aleatorio	Agitación (extracción)	Agitación (desorción)	Volumen (desorción)	Volumen (muestra)	Tiempo extracción	Tiempo desorción	pH
				µL	µL	min	min	
1	1	magnética	magnética	250	300	10	5	6
2	8	magnética	magnética	250	500	20	10	7
3	2	magnética	magnética	250	800	30	15	8

Tabla 6.4. Plan de experimentación del diseño de *screening* asimétrico $2^3 3^3 4^1//16$ *(continuación)*.

N°Exp.	Orden Aleatorio	Agitación (extracción)	Agitación (desorción)	Volumen (desorción)	Volumen (muestra)	Tiempo extracción	Tiempo desorción	pH
				µL	µL	min	min	
4	16	magnética	magnética	250	300	10	5	9
5	12	ultrasonidos	magnética	500	300	20	15	9
6	7	ultrasonidos	magnética	500	500	10	5	8
7	13	ultrasonidos	magnética	500	800	10	5	7
8	15	ultrasonidos	magnética	500	300	30	10	6
9	6	magnética	ultrasonidos	500	300	30	5	7
10	14	magnética	ultrasonidos	500	500	10	15	6
11	10	magnética	ultrasonidos	500	800	10	10	9
12	11	magnética	ultrasonidos	500	300	20	5	8
13	3	ultrasonidos	ultrasonidos	250	300	10	10	8
14	5	ultrasonidos	ultrasonidos	250	500	30	5	9
15	9	ultrasonidos	ultrasonidos	250	800	20	5	6
16	4	ultrasonidos	ultrasonidos	250	300	10	15	7

Las respuestas del diseño obtenidas (áreas de pico cromatográfico) se relacionaron con los siete factores estudiados, mediante el modelo matemático siguiente:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_{i/B-A}\, x_{BA} + \sum_{j=4}^{6} \beta_{j/B-A}\, x_{BA} + \beta_{j/C-A} x_{CA} + \beta_{j/C-B} x_{CB} + \beta_{7/B-A} x_{BA} + \beta_{7/C-A} x_{CA} + \beta_{7/D-A} x_{DA} + \beta_{7/C-B} x_{CB} + \beta_{7/D-C} x_{DC}$$

donde *A=1*, *B=2, C=3* representan los niveles de los factores, *y* es la respuesta cromatográfica, y el término constante β_0 es la respuesta media para todos los experimentos. El modelo describe los efectos en la FPSE al reemplazar el nivel de un factor con respecto a otro. Los resultados fueron generados y evaluados mediante el paquete de software estadístico *NemrodW*® [44]. Los resultados de ANOVA muestran que ninguno de los factores estudiados presenta significación estadística sobre la extracción con FPSE. Esto puede verse reflejado en los gráficos de Pesos Delta, los cuales representan los efectos relativos de cada compuesto en la respuesta, ante un cambio de variable. Si el efecto es positivo, la barra se desplaza a la derecha y si el efecto es negativo, la barra se desplaza a la izquierda. Las líneas verticales discontinuas representan los límites de significanción estadística para un nivel de confianza del 95%. Otra forma de interpretar los resultados es mediante los gráficos de Efectos Totales, en los cuales la longitud de la barra es proporcional al efecto de cada nivel de factor en la

respuesta. La **Figura 6.4** representa los resultados obtenidos por el diseño para el compuesto carfentanil, a modo de ejemplo, mediante los gráficos Pesos Delta (**Figura 6.4a**) y Efectos Totales (**Figura 6.4b**).

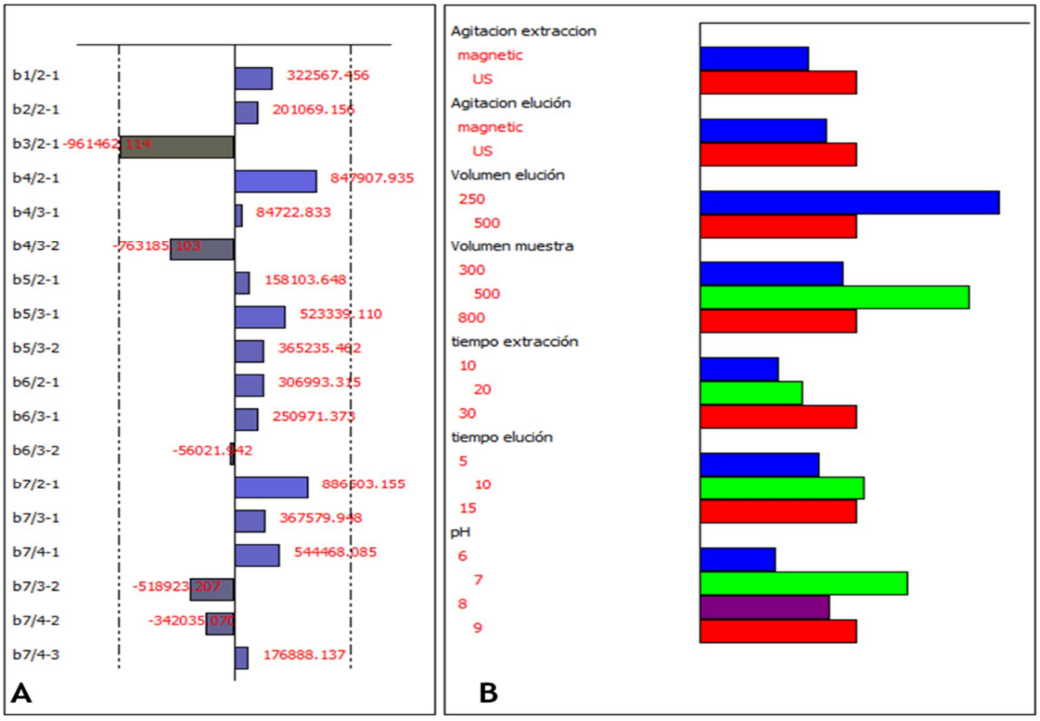


Figura 6.4. Gráficos Pesos Delta (A) y Efectos Totales (B) para carfentanil.

Analizando los resultados del diseño de *screening* para todos los compuestos estudiados, se ha podido establecer las condiciones óptimas para la extracción simultánea de los fentanilos seleccionados. El comportamiento de toda la familia de compuestos estudiados ha sido el mismo frente a la extracción y la influencia de los factores considerados ha sido similar en todos los casos. Tanto para la etapa de extracción (b_1) como de desorción o elución (b_2), se observa que una agitación mediante ultrasonidos tiene un efecto positivo y es más favorable que la agitación magnética. En cuanto al volumen del disolvente de desorción o elución (b_3), se observa que pasar de un volumen de 250 µL, que es el volumen mínimo para cubrir la membrana FPSE del tamaño seleccionado (1 x 1 cm), a un volumen de 500 µL tiene un efecto negativo en la extracción, por lo que se ha fijado un volumen de 250 µL para la desorción durante la FPSE. El objetivo ideal es utilizar el menor volumen de muestra (b_4) posible. Sin embargo, se ha observado que pasar de un volumen de muestra de 300 µL a 500 µL tiene un efecto positivo sobre la extracción de los fentanilos, mientras que aumentando el volumen de muestra a 800 µL, tiene un el efecto negativo. Así pues, se ha fijado un volumen de muestra intermedio (500 µL). El tiempo de extracción (b_5) para todos los compuestos se ha fijado en 30 min, mientras que para el tiempo de desorción (b_6) se ha observado que un tiempo entre 10 y 15 min producía respuestas similares para los compuestos. Con el fin de acortar el tiempo de análisis, se decidió que 10 min eran suficientes para llevar a cabo la desorción. Todos los compuestos tienen un pKa que oscila entre 7.76, para carfentanil y 9.03 para 4-ANPP (**Tabla 6.1**), por lo que el pH de la

muestra (b_7) se ha estudiado en el rango entre 6 y 9. Los resultados muestran que a pH 7 se obtienen los mejores resultados de extracción para todos los compuestos.

6.3.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Una vez establecidas las mejores condiciones experimentales para la FPSE, se llevó a cabo un protocolo de validación del método optimizado de FPSE-GC-MS, siguiendo las directrices de las guías de biovalidación de la FDA, SWGTOX y EMA [33-35] de los parámetros anteriormente mencionados (*sección 6.2.5*). Se estudió la selectividad del método evaluando posibles interferencias endógenas en el tiempo de retención de los analitos. Para ello, se sometieron al procedimiento FPSE-GC-MS diez muestras de OF blanco, libre de analitos, procedentes de diez voluntarios sanos. Los resultados no mostraron la existencia de posibles interferentes en el tiempo de retención de los compuestos al compararla con una muestra de OF enriquecida con 1 µg/mL con los fentanilos de interés (**Figura 6.5**).

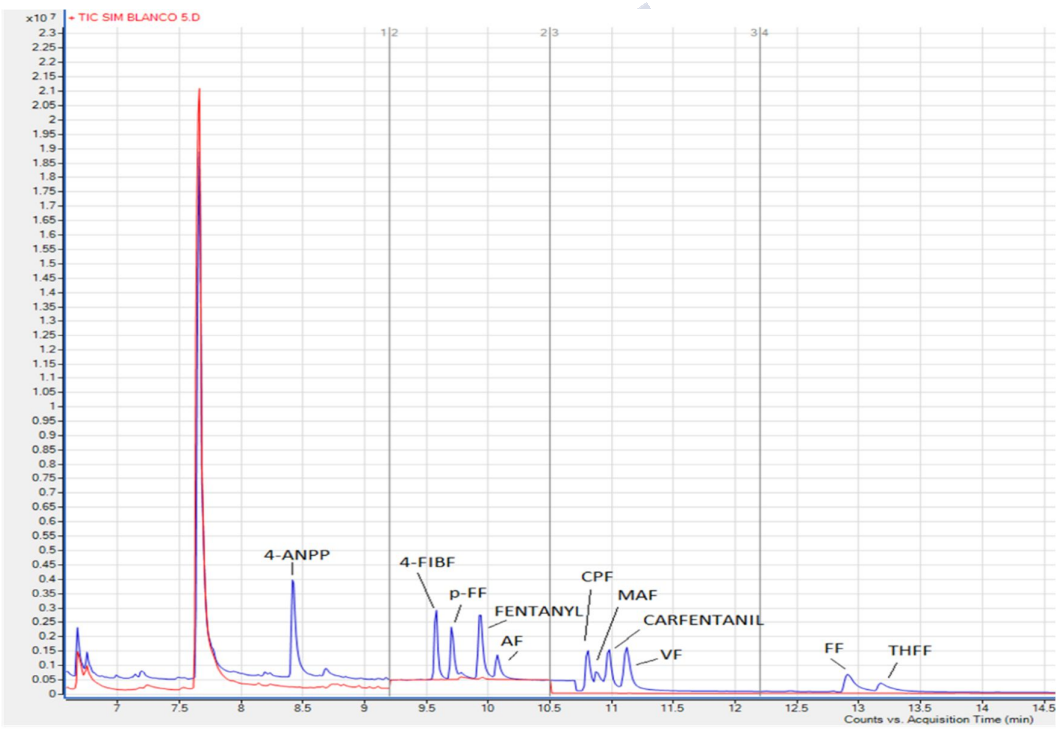


Figura 6.5. Cromatogramas de una muestra de OF blanco (*rojo*) y una muestra de OF enriquecida con 1 µg/mL con los fentanilos de interés (*azul*).

Las curvas de calibrado de adición estándar se contruyeron en el rango LOQ-1500 ng/mL, con cinco replicados por cada nivel de concentración. La linealidad se evaluó mediante el método de regresión de mínimos cuadrados. Los coeficientes de determinación (R^2) oscilaron entre 99.2630 y 99.9914%, lo que significa que los modelos ajustados explican la variabilidad en un porcentaje muy próximo al 100%. Además, los coeficientes de correlación (r) obtenidos en el rango de 0.9963-0.9999 indican una relación fuerte entre las variables del modelo.

La pendiente de la curva de calibrado es una medida de la sensibilidad del método analítico. En este caso, la sensibilidad más alta correspondió a THFF (0.003566), mientras que la sensibilidad más baja correspondió a AF (0.01530).

Tabla 6.5. Análisis de regresión para los fentanilos estudiados.

Compuesto	Rango lineal (ng/mL)	Coeficiente	Estimado	Error estándar	Coeficiente de correlación (*r*)	Error estándar	R^2 (%)
4-ANPP	50-1500	**Ordenada en el origen**	0.07305	0.01240	0.9998	0.05463	99.9681
		Pendiente	0.005604	0.00001669			
4-FIBF	50-1500	**Ordenada en el origen**	-0.07838	0.01364	0.9998	0.06010	99.9638
		Pendiente	0.005790	0.00001836			
***p*-FF**	15-1500	**Ordenada en el origen**	0.1514	0.01241	0.9997	0.06906	99.9469
		Pendiente	0.005757	0.00001916			
Fentanilo	25-1500	**Ordenada en el origen**	0.05499	0.007614	0.9998	0.03816	99.9794
		Pendiente	0.004979	0.00001102			
AF	50-1500	**Ordenada en el origen**	-0.2598	0.04918	0.9996	0.2166	99.9327
		Pendiente	0.01530	0.00006619			
CPF	15-1500	**Ordenada en el origen**	-0.009043	0.003233	0.9999	0.01798	99.9914
		Pendiente	0.003730	0.000004991			
MAF	50-1500	**Ordenada en el origen**	-0.05665	0.004478	0.9999	0.01973	99.9903
		Pendiente	0.003680	0.000006028			
Carfentanil	5-1500	**Ordenada en el origen**	0.1365	0.06861	0.9963	0.4168	99.263
		Pendiente					
VF	15-1500	**Ordenada en el origen**	0.02421	0.01862	0.9990	0.1036	99.8085
		Pendiente					

Tabla 6.5. Análisis de regresión para los fentanilos estudiados (*continuación*).

Compuesto	Rango lineal (ng/mL)	Coeficiente	Estimado	Error estándar	Coeficiente de correlación	Error estándar	R^2 (%)
FF	75-1500	**Ordenada en el origen**	-0.6319	0.03285	0.9996	0.1304	99.936
		Pendiente	0.009352	0.00004183			
THFF	50-1500	**Ordenada en el origen**	-0.1006	0.01684	0.9992	0.07420	99.9547
		Pendiente	0.003566	0.00002267			

Los LOD oscilaron entre 1 y 15 ng/mL, excepto para FF (25 ng/mL). Los LOQ variaron entre 5 y 50 ng/mL (75 ng/mL para FF) (**Tabla 6.6**). Son escasos los métodos publicados para la determinación de derivados de fentanilo mediante GC-MS. A diferencia de otros trabajos publicados, en este estudio se ha propuesto un método de extracción compatible con los principios de la Química Verde, ya que consume poco volumen, tanto de muestra como de reactivos. Misailidi *et al*. [18] determinaron FF y ocfentanilo, además de acetilfentanilo y butirfentanilo, en muestras de sangre entera mediante SPE, empleando mayores volúmenes de muestra y disolventes. Gardner *et al*. [23] compararon las técnicas LLE, SPE y DLLME para la extracción de fentanilo en muestras de orina. A diferencia del trabajo de estos autores, en el trabajo aquí presente, se han podido determinar además de fentanilo, diez análogos o derivados sintéticos de fentanilo, entre los que se encuentra el precursor 4-ANPP. Strano-Rossi *et al*. [45] desarrollaron un método basado en LLE para la determinación de fentanilo, norfentanilo, alfentanilo y sulfentanilo en muestras de orina. La cantidad de muestra y reactivos utilizados son mayores que en la técnica de FPSE empleada. Dybowsli *et al*. [17] cuantificaron FF en muestras de sangre mediante QuEChERS y GC-MS/MS, la cual proporciona una mayor sensibilidad que la técnica GC-MS, utilizada en este trabajo. No obstante, los límites propuestos en este trabajo abarcan los rangos tóxicos/letales encontrados en la literatura científica para los derivados de fentanilo [2, 46-48]. Por otro lado, los límites obtenidos son más bajos que los encontrados por Gilbert *et al*. [16], quienes desarrollaron un método de GC-MS confirmatorio para la identificación de 18 derivados de fentanilo; Buchalter *et al*. [19] que desarrollaron un método de GC interconectado con la espectrometría de masas de ionización de electrones fríos y detección ultravioleta de vacío mediante un divisor de flujo para la determinación de 24 análogos de fentanilo, y Boer *et al*. [49], los cuales determinaron *p*-FF en tabletas y cápsulas mediante LLE. Asimismo, los límites encontrados también son más bajos que los reportados por Shanks *et al*. [50] para carfentanil. Estos autores determinaron este compuesto en muestras de sangre, mediante una técnica analítica más sensible, como es LC-MS/MS.

La precisión intra- e inter-día no excedió del 8.2% y 8.6%, respectivamente, cumpliendo con el criterio de aceptación establecido (%CV < 20%). Los resultados de sesgo para la exactitud fueron del -5.5 al 9.1, que entran dentro del ± 20% de la concentración objetivo. Los valores de recuperación obtenidos en los tres niveles de concentración fueron cercanos al 100% (94.5-109.1%) (**Tabla 6.6**). Estos valores de recuperación fueron más altos que los obtenidas por da Cunha *et al*. [12], quienes determinaron 104 NPS, entre ellas, análogos de fentanilo, en muestras de OF mediante LLE-LC-MS/MS. La recuperación es superior a la publicada por da Cunha *et al.* [13] para derivados de fentanilo mediante MEPS-LC-MS/MS en muestras de orina, o Platosz *et al*. [21], que cuantificaron opioides sintéticos (entre los cuales se encontraban 4-ANPP, AF, FF, *p*-FF, fentanilo y carfentanil) en muestras de pelo mediante SPE-LC-MS/MS. Se ha observado un marcado efecto matriz para seis de los fentanilos estudiados (4-FIBF, AF, CPF, MAF, carfentanil y FF), por lo que se usó el método de adición estándar para la cuantificación de todos los compuestos en OF (**Tabla 6.6**).

Tabla 6.6. Validación del método FPSE-GC-MS.

Compuesto	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	*Nivel QC* (ng/mL)	Precisión (n=15)		Exactitud (n=15)	Recuperación (n=15)		Efecto Matriz (%)
				Intra-día (% CV)	Inter-día (% CV)	(% error relativo)	(%)	± SD	
			50	7.9	7.5	0.06	100.1	± 6.8	
4-ANPP	15	50	250	0.5	1.0	0.5	100.5	± 0.6	91.4
			1000	1.2	1.7	2.1	102.1	± 1.3	
			50	4.7	4.7	5.9	105.9	± 4.4	
4-FIBF	15	50	250	0.7	0.7	0.6	100.6	± 0.6	**138.9***
			1000	1.6	2.1	2.5	102.5	± 1.6	
			50	4.0	4.4	4.4	104.4	± 3.8	
***p*-FF**	5	15	250	0.7	1.0	0.4	100.4	± 0.7	98.4
			1000	1.1	1.4	1.6	101.6	± 1.1	
			50	5.3	5.9	-3.2	96.8	± 4.7	
Fentanilo	10	25	250	0.4	0.6	0.6	100.6	± 0.4	105.7
			1000	1.2	1.8	2.1	102.1	± 1.3	
			50	5.0	4.7	9.1	109.1	± 4.7	
AF	15	50	250	0.4	0.6	0.8	100.8	± 0.4	**152.6***
			1000	1.0	2.0	2.4	102.4	± 1.3	
			50	4.0	7.0	3.0	103.0	± 4.8	
CPF	5	15	250	0.4	0.7	0.7	100.7	± 0.4	**77.8***
			1000	2.4	2.8	2.9	102.9	± 2.3	
			50	3.4	4.3	-1.0	99.0	± 3.3	
MAF	15	50	250	0.6	0.6	0.5	100.5	± 0.6	**152.9***
			1000	1.4	2.1	2.1	102.1	± 1.5	
			50	8.2	8.6	-5.5	94.5	± 6.7	
Carfentanil	1	5	250	0.6	0.6	0.7	100.7	± 0.6	**174.7***
			1000	1.4	1.6	2.0	102.0	± 1.3	

Tabla 6.6. Validación del método FPSE-GC-MS (*continuación*).

Compuesto	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	*Nivel QC* (ng/mL)	Precisión (n=15)		Exactitud (n=15)	Recuperación (n=15)		Efecto Matriz (%)
				Intra-día (% CV)	Inter-día (% CV)	(% error relativo)	(%)	± SD	
			50	2.5	5.5	2.2	102.2	± 3.5	
VF	5	15	250	0.5	0.6	0.4	100.4	± 0.5	108.3
			1000	2.0	2.1	2.6	102.6	± 1.9	
			75	1.6	2.2	1.7	101.7	± 1.7	
FF	25	75	250	0.5	0.7	0.3	100.4	± 0.5	**153.8***
			1000	1.5	1.8	2.5	102.5	± 1.4	
			50	5.1	6.2	1.6	101.6	± 4.9	
THFF	15	50	250	0.5	0.7	0.7	100.7	± 0.5	100
			1000	1.4	2.1	1.8	101.8	± 1.5	

LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; QC: muestras control; SD: Desviación estándar.
*: compuestos que presentan un fuerte efecto matriz.

La estabilidad del ciclo de congelación-descongelación se estudió en muestras QC enriquecidas a concentración baja (50 ng/mL, excepto para FF (75 ng/mL)) y concentración alta (1000 ng/mL) con tres replicados cada una. Las muestras QC se almacenaron a -20 °C y se estudiaron en tres ciclos de congelación-descongelación cada 24 h y, posteriormente en dos ciclos de congelación-descongelación cada 7 días. Los resultados para el estudio de estabilidad (congelación-descongelación) recogidos en la **Figura 6.6**, muestran que ninguno de los analitos estudiados fueron estables a las dos semanas (14 días). 4-ANPP, 4-FIBF y fentanilo fueron estables durante una semana, mientras que *p*-FF fue estable durante 3 días (72 h), para los dos niveles de concentración estudiados. Para el resto de compuestos se observaron diferencias en las recuperaciones entre las muestras QC de nivel de concentración bajo y las muestras QC de nivel de concentración alto. Para el nivel bajo de concentración de muestras QC, AF y VF fueron estables durante 48 h, mientras que carfentanil y FF fueron estables hasta las 72 h. Sin embargo, la estabilidad para CPF, MAF y THFF disminuyó bastante durante las primeras 24 h, con recuperaciones de 76.8%, 79.3% y 66.4%, respectivamente. Para el nivel alto de concentración de muestras QC, los compuestos fueron estables entre 3 y 7 días, excepto para FF, que lo fue hasta las primeras 24 h (79.6%).

La estabilidad del automuestreador se evaluó también con muestras QC fortificadas con el nivel bajo de concentración y QC fortificadas con el nivel alto de concentración (n=3). Las muestras QC se almacenaron en el automuestreador a 20 °C ± 2 y se analizaron cada 3 h hasta cumplir las 24 h, y se volvieron a inyectar a las 48 h y 72 h. Los resultados (**Figura 6.7**) muestran que 4-FIBF y VF fueron los compuestos que presentaron mayor estabilidad (48h) para ambos niveles de concentración. Para el resto de analitos, se observó ciertas diferencias en los dos niveles de concentración. Para

muestras QC con concentración baja, CPF fue el más estable junto a 4-FIBF y VF (48 h), seguido de fentanilo (24 h), carfentanil (12 h), 4-ANPP y MAF (9 h), *p*-FF y FF (6 h), y finalmente FF (3 h). El compuesto THFF resultó estable menos de 3 h en el automuestreador. Para las QC con nivel de concentración alto, AF, carfentanil y VF fueron los compuestos más estables junto a 4-ANPP y 4-FIBF durante las 48 h. El compuesto menos estable fue MAF, que fue estable hasta las 3 h.

6.3.3. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES

El método FPSE-GC-MS totalmente optimizado y validado fue aplicado al análisis de muestras reales de OF. Se analizaron un total de 15 muestras de OF procedentes de individuos voluntarios y 6 muestras provenientes de pacientes con drogodependencias y en tratamiento de desintoxicación. Debido al limitado volumen recogido en los dispositivos Salivette®, las muestras fueron analizadas por duplicado. Los resultados resultaron negativos a los fentanilos estudiados. Sin embargo, en ausencia de muestras positivas, los estudios de recuperación con muestras QC fortificadas a varios niveles de concentración es una herramienta analítica eficaz que demuestra la validez e idoneidad del método desarrollado para su aplicación en toxicología clínica y forense, con el fin de identificar y confirmar la presencia de estos compuestos que pueden pasar desapercibidos debido a su similitud estructural en las pruebas de cribado, basadas en técnicas de inmunoensayo o colorimétricas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

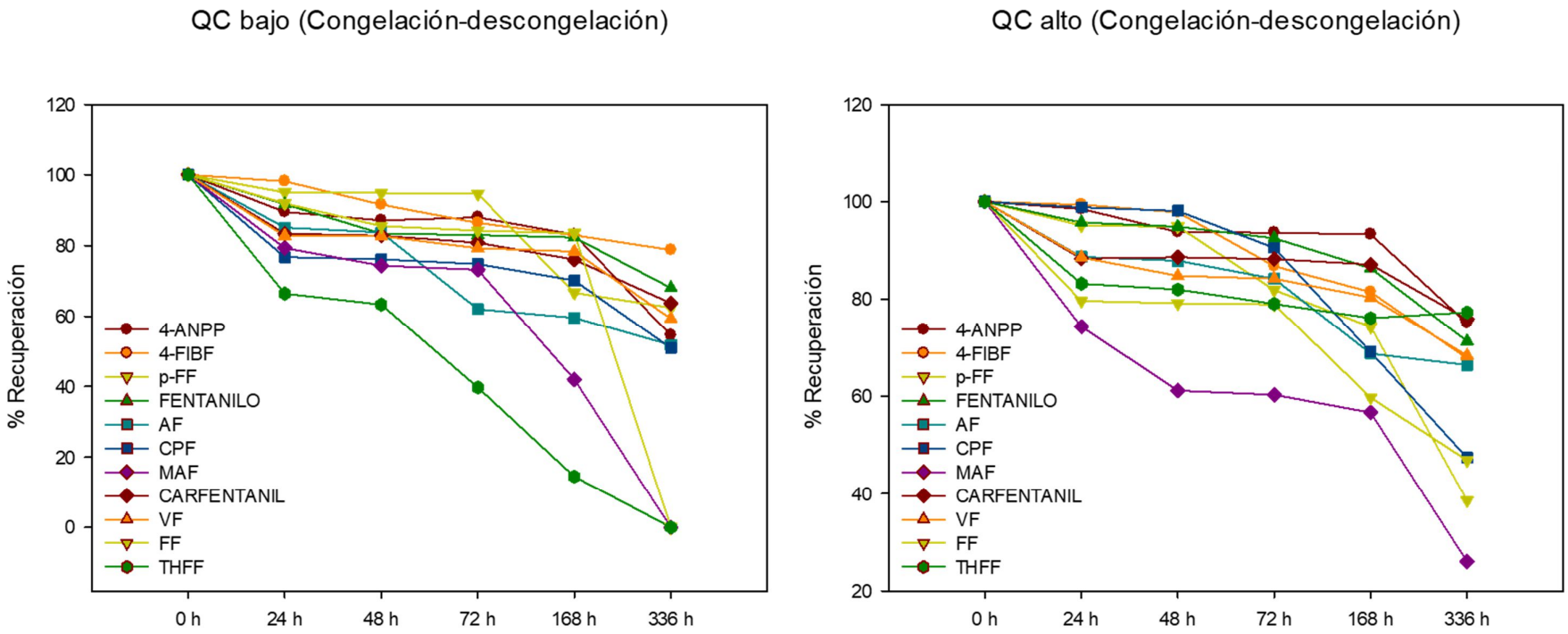


Figura 6.6. Estudio de estabilidad de ciclos de congelación (-20 °C) y descongelación (Tª ambiente) para los 11 fentanilos estudiados en muestras de fluido oral (n=3).
QC bajo: 50 ng/mL (75 ng/mL para FF); QC alto: 1000 ng/mL.

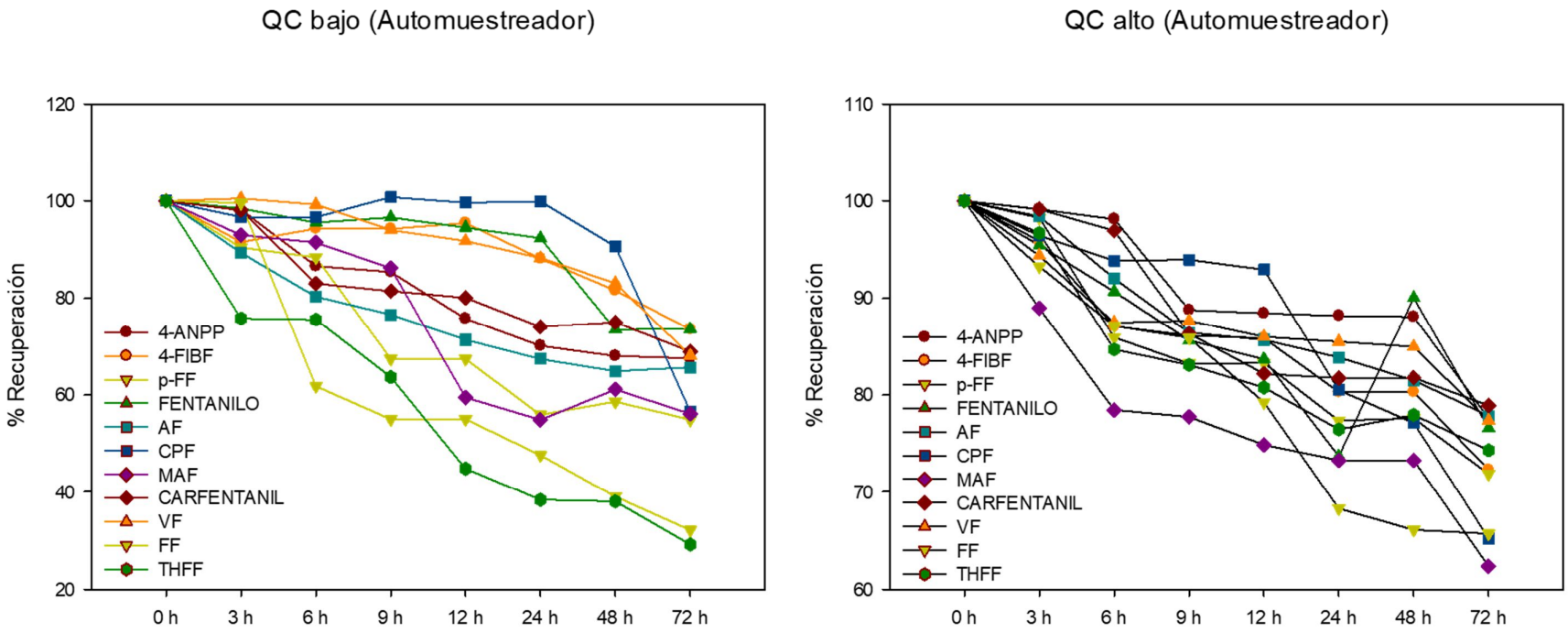


Figura 6.7. Estudio de estabilidad en el automuestreador (20 °C ± 2) para los 11 fentanilos estudiados en muestras de fluido oral (n=3). QC bajo: 50 ng/mL (75 ng/mL para FF); QC alto: 1000 ng/mL.

6.4. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha propuesto un método robusto basado en la técnica de FPSE combinada con GC-MS, para la determinación de fentanilo y diez derivados en muestras de fluido oral. El conjunto de las condiciones deseables, requeridas en el proceso de preparación de muestra, ha sido determinado de manera efectiva mediante el uso del diseño experimental de cribado asimétrico. Dicho diseño permite obtener los parámetros óptimos con un número mínimo de experimentos, tales como volumen y pH de muestra (500 µL, pH 7), volumen de disolvente de desorción (250 µL de acetato de etilo), modo de agitación (sonicación), así como los tiempos de extracción y desorción (30 min y 10 min, respectivamente). El método propuesto proporciona buena linealidad, así como precisión y exactitud (CV <20%) y buenas recuperaciones (aproximadamente 100%). Por otro lado, a pesar de que, en la aplicación a muestras reales, éstas resultaron negativas a todos los fentanilos estudiados, los valores obtenidos en el presente estudio atestiguan el buen desempeño del método propuesto y atestiguan la importancia de contar con métodos validados para detectar y cuantificar fentanilos, que pueden resultar difíciles de detectar con otros métodos. Además, según nuestro conocimiento, este estudio constituye la primera aplicación de FPSE al análisis de fentanilos en muestras de OF y su posterior determinación por GC-MS.

6.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Vardanyan R.S., Hruby V., Fentanyl-related compounds and derivatives: current status and future prospects for pharmaceutical applications, *Future Med. Chem.* 2014, *6*, 385-412.

[2] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), Recommended Methods for the Identification and Analysis of Fentanyl and Its Analogues in Biological Specimens, Vienna, 2018, pp 25-36. https://www.unodc.org/documents/scientific/Recommended_methods_for_the_identification_and_analysis_of_Fentanyl.pdf (acceso mayo 2021).

[3] U.S. Drug Enforcement Administration, Diversion Control Division. (2017). NFLIS Brief: Fentanyl, 2001–2015. Springfield, VA: U.S. Drug Enforcement Administration. https://www.nflis.deadiversion.usdoj.gov/DesktopModules/ReportDownloads/Reports/NFLISFentanylBrief2017.pdf (acceso mayo 2021).

[4] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Fentanils and synthetic cannabinoids: driving greater complexity into the drug situation. An uptdate from the EU Early Warning System (June 2018), Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2018. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/8870/2018-2489-td0118414enn.pdf (acceso mayo 2021).

[5] Gladden M. Martinez P., Seth P., Fentanyl Law Enforcement Submissions and Increases in Synthetic Opioid-Involved Overdose Deaths-27 States, 2013-2014, *Morb. Mort. Wkly. Rep*. 2016, *65*, 837-843.

[6] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, European Drug Report 2020: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2020. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13236/TDAT20001ENN_web.pdf (acceso mayo 2021).

[7] Mahlke N.S., Ziesenitz V., Mikus G., Skopp G., Quantitative low-volume assay for simultaneous determination of fentanyl, norfentanyl, and minor metabolites in human plasma and urine by liquid chromaotgrpahy-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), *Int. J. Legal Med*. 2014, *128*, 771-778.

[8] Strayer K.E., Antonides H.M., Juhascik M.P., Daniulaityte R., Sizemore I.E., LC-MS/MS-Based Method for the Multiplex Detection of 24 Fentanyl Analogues and Metabolites in Whole Blood at Sub ng mL^{-1} Concentrations, *ACS Omega* 2018, *3*, 514-523.

[9] Tyon Moody M., Diaz S., Shah P., Papsun D., Logan B.K., Analysis of fentanyl analogs and novel synthetic opioids in blood, serum/plasma, and urine in forensic casework, *Drug Test. Anal*. 2018, *10*, 1358-1367.

[10] Fogarty M.F., Papsun D.M., Logan B.K., Analysis of Fentanyl and 18 Novel Fentanyl Analogs and Metabolites by LC-MS-MS, and report of Fatalities Associated with Methoxyacetylfentanyl and Cyclopropylfentanyl, *J. Anal. Toxicol*. 2018, *42*, 592-604.

[11] Nan Q. Ping X., Baohua S., Xianyi Z., Yan S., Fenyun S., Application of a validated UHPLC-MS/Ms method for 28 fentnayl-analogue and novel synthetic opioids in whole blood in authentic forensic cases, *J. Chromatogr. B* 2019, *1124*, 82-99.

[12] Da Cunha K.F., Diniz Oliveira K., Huestis M.A., Costa J.L., Screening of 104 New Psychoactive Substances (NPS) and Other Drugs of Abuse in Oral Fluid by LC-MS-MS, *J. Anal. Toxicol*. 2020, *44*, 697-707.

[13] Da Cunha K.F., Costalonga Rodrigues L., Huestis M.A., Costa J.L., Miniaturized extraction method for analysis of synthetic opioids in urine by microextraction with packed sorbent and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 2020, *1624*, 461241.

[14] Mbughuni M.M., Jannetto P.J., Langman L.J., Mass spectrometry Applications for Toxicology, *EJIFCC* 2016, *27*, 272-287.

[15] Chen X., Wu X., Luan T., Jiang R., Ouyang G., Sample preparation and instrumental methods for illicit drugs in environmental and biological samples: A review, *J. Chromatogr. A* 2021, *1640*, 461961.

[16] Gilbert N., Antonides L.H., Schofield C.J., Costello A., Kilkelly B., Cain A.R., Dalziel P.R.V., Horner K., Mewis R.E., Sutcliffe O.B., Hitting the Jackpot-development of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and other rapid screening methods for the analysis of 18 fentanyl-derived synthetic opioids, *Drug Test. Anal*. 2020, *12*, 798-811.

[17] Dybowski M.P., Dawidowicz A.L., Furanylfentanyl in whole blood measured by GC-MS/Ms after QuEChERS extraction in a fatal case, *Forensic Toxicol.* 2020, *38*, 496-504.

[18] Misailidi N., Athanaselis S., Nikolaou P., Katselou M., Dotsikas Y., Spiliopoulou C., Papoutsis I., A GC-MS method for the determination of furanylfentanyl and ocfentanil in whole blood with full validation, *Forensic Toxicol*. 2019, *37*, 238-244.

[19] Buchalter S., Marginean I., Yohannan J., Lurie I.S., Gas chromatography with tandem cold electron ionization mass spectrometric detection and vacuum ultraviolet detection

for the comprehensive analysis of fentanyl analogues, *J. Chromatogr. A* 2019, *1596*, 183-193.

[20] Kahl J.H., Gonyea J., Humphrey S.M., Hime G.W., Boland D.M., Quantitative Analysis of Fentanyl and Six Fentanyl Analogs in Postmortem Specimens by UHPLC-MS-MS, *J. Anal. Toxicol*. 2018, *42*, 570-580.

[21] Platosz N.A., Binz T.M., Baumgartner M.R., Lendoiro E., de Castro A., Concheiro M., Quantification of Classic, Prescription and Synthetic Opioids in Hair by LC-MS-MS, *J. Anal Toxicol*. 2020, bkaa152. https://doi.org/10.1093/jat/bkaa152

[22] Saraji M., Boroujeni M.K., Bidgoli A.A.H., Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and hollow fiber liquid-liquid microextraction for the determination of fentanyl, alfentanil, and sufentanil in water and biological fluids by high-performance liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem*. 2011, *400*, 2149-2158.

[23] Gardner M.A., Sampsel S., Jenkins W.W., Owens J.E., Analysis of Fentanyl in Urine by DLME-GC-MS, *J. Anal. Toxicol*. 2015, *39*, 118-125.

[24] Kabir A., Furton K.G., Fabric phase sorptive extraction (FPSE), US Patent Application: 14/216121, 2014.

[25] Jiménez-Holgado C., Chrimatopoulos C., Stathopoulos V., Sakkas V., Investigating the Utility of Fabric Phase Sorptive Extraction and HPLC-UV-Vis/DAD to Determine Antidepressant Drugs in Environmental Aqueous Samples, *Separations* 2020, *7*, 39.

[26] Samanidou V., Kaltzi I., Kabir A., Furton K.G., Simplifying sample preparation using fabric phase sorptive extraction technique for the determination of benzodiacepines in blood serum by high-performance liquid chromatography, *Biomed. Chromatogr*. 2016, *30*, 829-836.

[27] Ruan X., Xing L., Peng J., Li S., Song Y., Sun Q., A simplified fabric phase sorptive extractin method for the determination of amphetamine drugs in water samples using liquid chromatography-mass spectrometry, *RSC Adv*. 2020, *10*, 10854.

[28] Tartaglia A., Kabir A., D´Ambrosio F., Ramundo P., Ulusoy S., Ulusoy H.I., Merone G.M., Savini F., D´Ovidio C., De Grazia U., Furton. K.G., Locatelli M., Fasto of-line FPSE-HPLC-PDA determination of six NSAIDs in saliva samples, *J. Chromatogr. B* 2020, *1144*, 122082.

[29] Alampanos V., Kabir A., Furton K.G., Samanidou V., Papadoyannis I., Fabric phase sorptive extraction for simultaneous observation of four penicillin antibiotics from human blood serum prior to high performance liquid chromatography and photo-diode array detection, *Microchem. J*. 2019, *149*, 103964.

[30] World Medical Association, Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, *JAMA* 2013, *310*, 2191–2194.

[31] https://acis.sergas.es/cartafol/Rede-de-comites-de-etica-da-investigacion (acceso mayo 2021).

[32] EU Guidelines on Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. SANTE 11813/2017 (modified version SANTE/12682/2019).

https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf (acceso mayo 2021).

[33] Scientific Working Group for Forensic Toxicology, Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, *J. Anal. Toxicol*. 2013, *37*, 452-472.

[34] Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, U.S: Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2018 Silver Spring, Maryland. USA. http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm (acceso mayo 2021).

[35] European Medicines Agency, Guideline on bioanalytical method validation, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (acceso mayo 2021).

[36] Shaner R.L., Schulze N.D., Seymour C., Hamelin E.I., Thomas J.D., Johnson R.C., Quantification of Fentanyl Analogs in Dried Blood Spots by Flow-Through Desorption Coupled to Online Solid Phase Extraction Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Methods* 2017, *9*, 3876-3883.

[37] Verplaetse R., Henion J., Quantitative determination of opioids in whole blood using fully automated dried blood spot desorption coupled to on-line SPE-LC-MS/MS, *Drug Test. Anal*. 2016, *8*, 30-38.

[38] Kabir A., Mesa R., Jurmain J., Furton K.G., Fabric Phase Sorptive Extraction Explained, *Separations* 2017, *4*, 21.

[39] Samanidou V., Kabir A., Fabric Phase Sorptive Extraction in Pharmaceutical Analysis, *Pharm. Anal. Acta* 2015, *6*, e177.

[40] Karageorgou E., Manousi N., Samanidou V., Kabir A., Furton K.G., Fabric phase sorptive extraction for the fast isolation of sulfonamides residues from raw milk followed by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *Food Chem*. 2016, *196*, 428-436.

[41] Kaur R., Kaur R., Groer A., Rani S., Malik A.K., Kabir A., Furton K.G., Fabric phase sorptive extraction/GC-MS method for rapid determination of broad polarity spectrum multi-class emerging pollutants in various aqueous samples, *J. Sep. Sci*. 2019, *42*, 2407-2417.

[42] Aznzr M., Úbeda S., Nerin C., Kabir A., Furton K.G., Fabric phase sorptive extraction as a reliable tool for rapid screening and detection of freshness markers in oranges, *J. Chromatogr. A* 2017, *1500*, 32-42.

[43] Kabir A., Samanidou V., Fabric Phase sorptive Extraction: A Paradigm Shift Approach in Analytical and Bioanalytical Sample Preparation, *Molecules* 2121, *26*, 865.

[44] Mathieu D., Noni J., Phan-Tan-Luu R., NemrodW®. Version 2011, LPRAT, Marseille, France 2011.

[45] Strano-Rossi S., Álvarez I., Tabernero M.J., Cabarcos P., Fernández P., Bermejo A.M., Determination of fentanyl, metabolite and analogs in urine by GC/MS, *J. Appl. Toxicol*. 2011, *31*, 649-654.

[46] Marchei E., Pacifici R., MAnnocchi G., Marinelli E., Busardo F.P., Pichini S., New synthetic opioids in biological and non-biological matrices: A review of current methods, *Trends Anal. Chem*. 2018, *102*, 1-15.

[47] Frisoni P., Bacchio E., Bilel S., Talarico A., Gaudio R.M., Barbieri M., Neri M., Marti M., Novel Synthetic Opioids: The Pathologist´s Point of View, *Brain Sci*. 2018, *8*, 170.

[48] Drummer O.H., Fatalities caused by novel opioids: a review, *Forensic Sci. Res*. 2019, *4*,95-110.

[49] De Boer D., Goemans W.P.J., Ghezavat V.R., van Ooijen R.D., Maes R.A.A., Seizure of illicitly produced *para*-fluorofentanyl: quantitative analysis of the content of capsules and tablets, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2003, *31*, 557-562.

[50] Shaks K.G., Behonick G.S., Detection of Carfentanil by LC-MS-MS and Reports of Associated Fatalitier in the USA, *J. Anal. Toxicol*. 2017, *41*, 466-472.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO V. PREPARACIÓN DE NUEVAS FASES DE EXTRACCIÓN

Publicaciones relacionadas:

- Ana M. Ares[1], Raquel Muiño[1], Alejandro Costoya[2], Rosa A. Lorenzo[1], Angel Concheiro[2], Antonia M. Carro[1], Carmen Alvarz-Lorenzo[2], Cyclodextrin-functionalized cellulose filter paper for selective capture of diclofenac, *Carbohydrate Polymers*. 2019, *220*, 43-52.

  Factor de impacto (2019): 7.182
  Cuartil (2019): Q1 (posición 3/71)
  Nº citas (Web of Science): 7
  Nº citas (SCOPUS): 9
  Nº citas (Google Académico): 9
  PMID: 31196549
  DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.05.055

[1] *Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química e Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España.*

[2] *Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia e Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Universidad de Santiago de Compostela, 15782, Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España.*

Declaración de contribución de autoría:

- A.M. Ares: Investigación, Validación, Análisis formal, Visualización, Escritura-borrador original.

Presentación a congresos relacionados con este capítulo:

Póster: "Cyclodextrin-functionalized cellulose paper for selective capture of diclofenac", 14th XIV Reunión de la Sociedad Española de Farmacéutica y Tecnología Farmacéutica, 23-25 enero 2019, Santiago de Compostela (España).

Flash: "New sorbent material based on β-cyclodextrin-grafted paper for selective removal of diclofenac", 6th European Conference on Cyclodextrins, 2-4 octubre 2019, Santiago de Compostela (España).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

G. PREPARACIÓN DE NUEVAS FASES DE EXTRACCIÓN.

7.1. INTRODUCCIÓN

La conservación de la naturaleza tiene un impacto directo en nuestra calidad de vida, bienestar y salud. En este sentido, el uso generalizado de medicamentos humanos y veterinarios se está convirtiendo en una amenaza relevante. Las drogas pueden ingresar fácilmente en el medio ambiente acuático como microcontaminantes que pueden causar efectos nocivos para la salud humana y los organismos acuáticos [1, 2, 3]. Tras la administración de un medicamento a humanos o ganado, estos compuestos y sus metabolitos pueden excretarse a través de la orina y las heces y descargarse en aguas superficiales a través de la acuicultura o actividades agrícolas o en aguas residuales a través de efluentes domésticos/hospitalarios [4-8]. Incluso utilizando plantas de tratamiento o Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR), los medicamentos y los metabolitos pueden contaminar las aguas superficiales, subterráneas e incluso el agua potable. Los antibióticos y los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son dos grupos ampliamente recetados de productos farmacéuticos y, por lo tanto, contaminantes comunes [5, 7, 9]. De hecho, la *Global Water Research Coalition* considera a ambos grupos de sustancias como objetivos prioritarios para los estudios de presencialidad [10]. El compuesto ciprofloxacino es un agente antimicrobiano de fluoroquinolona ampliamente utilizado tanto en humanos como en ganado [5, 11, 12]. El compuesto diclofenaco es un AINE que reduce el dolor y la fiebre. Debido al aumento en la expectativa de vida, el consumo de los AINEs también se ha visto incrementado [13], aunque en el período 2013-2016 se ha visto reducido el uso de diclofenaco según un informe de utilización de medicamentos U/AIN/V1/11/09/2017 del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad y la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) [14]. La lista de sustancias para el monitoreo en la Unión Europea de acuerdo con la Decisión de Implementación de la Comisión (UE) 2018/840 [15] evidencia las preocupaciones sobre la presencia de ambos, ciprofloxacino y diclofenaco, en ambientes acuáticos.

La eliminación de compuestos farmacéuticos de ambientes acuáticos es un desafío debido a sus características de biotransformación y acumulación [2, 12]. Se están aplicando diferentes métodos para eliminar los microcontaminantes de las aguas residuales, cormo la degradación biológica, la oxidación química y los procesos de eliminación física en las EDAR [16, 17]. Sin embargo, los métodos actuales no permiten la eliminación completa de compuestos farmacéuticos de aguas residuales [1, 3]. Se están probando diferentes enfoques alternativos para este propósito, como el proceso de adsorción [18-20], la extracción por sorción de fase de tejido (*fabric phase sorptive extraction*, FPSE) con recubrimiento de intercambio iónico-*sol-gel* [21, 22], carbón activo [23], o nanopartículas magnéticas [24].

La celulosa, un homopolisacárido de unidades de β-D-glucopiranosa unidas (β1→ 4), es uno de los biopolímeros más abundantes disponibles para la preparación de materiales funcionales [25]. Es un material no tóxico, biodegradable, renovable y económico que ofrece excelentes prestaciones para una gran cantidad de aplicaciones. El papel de celulosa apenas adsorbe contaminantes por sí mismo. Sin embargo, el papel de celulosa modificado químicamente puede permitir la extracción de diferentes compuestos de medios acuosos. El papel de filtro común se ha utilizado como soporte para la polimerización por injerto de monómeros adecuados para la captación de codeína en

muestras de orina [26] o nitrofenoles en muestras de aceites [27]. Las interacciones de la droga con el soporte generalmente dependen de interacciones iónicas con el polímero injertado, aunque se ha publicado el reconocimiento similar al de un aptámero [26, 28, 29]. Tanto las interacciones iónicas como las de tipo aptámero son bastante fuertes en ausencia de sales, pero se debilitan a medida que aumenta la fuerza iónica del medio [30]. Este inconveniente podría resolverse utilizando β-ciclodextrina (β-CD), un oligosacárido cíclico de 7 unidades de D-glucopiranosa, como agente atrapador funcional. La peculiar estructura de β-CD con una superficie externa hidrófila y una cavidad central hidrófoba permite la formación de complejos de inclusión con una gran variedad de moléculas, incluidos productos farmacéuticos relativamente hidrófobos [31-34]. La formación del complejo de inclusión está impulsada por una constante de afinidad que depende de un mecanismo múltiple de interacciones (con participación de enlaces hidrófobos e hidrógeno), que se puede ajustar a través de la concentración relativa de cada componente y la polaridad del medio externo, entre varias otras variables. Por lo tanto, en el agua la formación de complejos ocurre con bastante rapidez, pero se puede revertir disminuyendo la polaridad del medio, como se observó anteriormente para hidrogeles y esteras de fibras electrohiladas [33, 35]. Debido a su versatilidad y propiedades únicas, las CD se han investigado como componentes de redes de polímeros y compuestos de partículas metálicas para separaciones [31, 32, 36-38]. El injerto de CD en papeles de celulosa está recibiendo un interés cada vez mayor, ya que el papel es más flexible que otros sustratos 2D y puede manejarse con mayor facilidad que las nano estructuras y las microestructuras, mientras que aún ofrece una gran superficie de unión. De hecho, el uso de papel de celulosa como soporte de nano estructuras metálicas con restos de CD ha sido explorado como sensor de sustancias ilegales [39].

El objetivo de este trabajo fue diseñar un papel de filtro celulósico funcionalizado con β-CD para la eliminación, y posterior análisis de productos farmacéuticos comunes, del agua y los medios salinos. Este trabajo se basa en la hipótesis de que la funcionalización del papel de filtro de celulosa con β-CD puede transformar el filtro en una trampa eficiente para la eliminación de fármacos y posteriormente de drogas de abuso o psicofármacos que forman complejos de inclusión con las unidades de β-CD, y dado que las interacciones fármaco/β-CD no dependen de las interacciones iónicas sino de las hidrofóbicas, la captura del fármaco en medio salino debe ser tan eficiente al menos como en medio no salino. Esta fase de papel de celulosa-β-CD puede representar un enfoque verde y selectivo para aislar eficientemente los productos farmacéuticos de las aguas contaminadas, que posteriormente se pueden recuperar del papel para su análisis, mientras que el papel podría reutilizarse para otro ciclo de purificación del agua. Por primera vez que se presenta un papel de celulosa inmovilizado en CD para la extracción selectiva de diclofenaco del medio acuoso. Para llevar a cabo el trabajo, primero se preparó un derivado de β-CD [40] y luego el injerto en papel de filtro de celulosa se optimizó a través del método Fenton [41] (**Figura 7.1**). Este método es más simple e implica menos pasos que los publicados anteriormente para el injerto de CD en materiales de celulosa utilizando química de "click" [42] o aplicando otros pretratamientos de la celulosa en condiciones difíciles [43]. Una vez que se preparó el filtro funcionalizado con CD, se probó el efecto de diferentes variables (tiempo, concentración de fármaco, fuerza iónica, disolvente de elución, …) sobre los rendimientos de adsorción y desorción de diclofenaco. La selectividad se investigó utilizando ciprofloxacino, que también puede formar complejos de inclusión con β-CD con una constante de afinidad similar (278 M^{-1} para ciprofloxacino [44] frente a 100-400 M^{-1} para diclofenaco [45]). Las diferencias

estructurales entre ambos fármacos se resumen en la **Tabla 7.1**. de manera relevante, el carácter zwitteriónico del ciprofloxacino se ha explotado previamente para diseñar materiales sorbentes que combinen tanto con CD como restos aniónicos para una captación eficaz de fármacos antimicrobianos [46, 47]. De manera diferente, en el presente estudio, el propósito es diseñar un material sorbente neutro que evite la unión iónica no específica, pero que capte eficientemente los fármacos que forman complejos de inclusión.

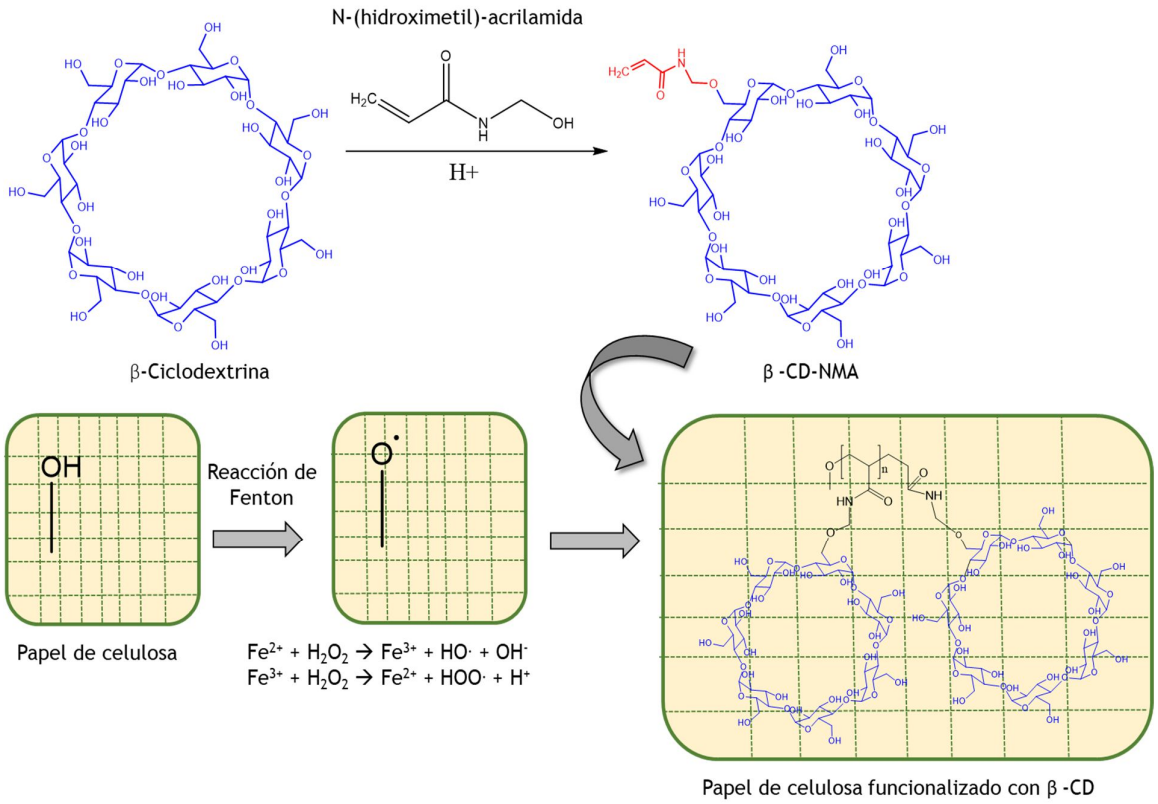
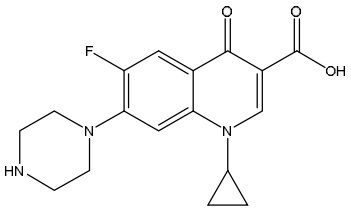
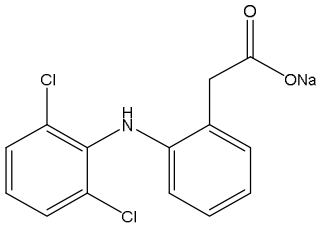


Figura 7.1. Esquema simplificado de preparación de β-CD-NMA y posterior injerto en papel de celulosa usando la reacción de Fenton.

Tabla 7.1. Estructura y propiedades químicas de los compuestos.

Compuesto	Acción	Estructura química	Peso molecular (g/mol)	Log Kow (25 °C)
Ciprofloxacino	Agente antimicrobiano		331.35	0.28

Diclofenaco	Agente antinflamatorio no esteroideo (AINE)		318.13	1.90

7.2. MATERIAL Y MÉTODOS

7.2.1. COMPUESTOS Y REACTIVOS

El papel de celulosa (100% de celulosa, papel de filtro de café; gramaje 50 g/m^2) era de Silvex (Portugal). β-CD fue suministrada por Roquette® (Francia). *N*-(hidroximetil) acrilamida (NMA), ácido clorhídrico al 37% (HCl), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y etanol se compraron a Merck® (Darmstadt, Alemania). Acetonitrilo y 2-propanol se obtuvieron de Panreac Química (Barcelona, España). Acetona procede de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, EEUU). Cloruro de sodio se obtuvo de Scharlau Cienytech (Barcelona, España). H_2O_2 al 30% fue suministrado por Sigma Aldrich (Darmstadt, Alemania). Hidróxido de sodio era de VWR® International Eurolab (Barcelona, España). Diclofenaco sódico se obtuvo de Guinama (Valencia, España). Clorhidrato de ciprofloxacino monohidrato se adquirió a Fagron® (Barcelona, España). Se utilizó agua ultra pura (mediante un sistema Milli-Q de Millipore, Bedford, MA, EEUU).

7.2.2. SÍNTESIS DE LA ACRILAMIDOMETIL-β-CICLODEXTRINA (β-CD-NMA)

El derivado de CD se preparó siguiendo una publicación anterior [40] con cambios menores. Brevemente, se añadieron β-CD (14.98 g) y NMA (13.37 mL) a 50 mL de disolución de HCl 1% en un matraz de fondo redondo (250 mL), con un baño termostático y agitador magnético y se calentaron a 80ºC, durante 30 min. Luego, se añadieron 300 mL de acetona para detener la reacción, formando un precipitado, y el sistema se mantuvo a 4ºC durante 24 h. El precipitado formado se filtró al vacío, se lavó con 200 mL de acetona cuatro veces y se colocó en un desecador de vacío a temperatura ambiente durante 24 h. Finalmente, la β-CD-NMA se almacenó a 4ºC. La formación de β-CD-NMA se confirmó mediante análisis elemental (Fisons ES 1108, Italia) y análisis de espectroscopía IR con transformada de Fourier por reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) (400-4000 cm^{-1}, Varian 670IR, EEUU).

7.2.3. PREPARACIÓN DE PAPELES DE CELULOSA FUNCIONALIZADOS

La funcionalización del papel de celulosa con β-CD-NMA se realizó siguiendo el procedimiento de Fenton, adaptando un método previo [41]. El papel de filtro de celulosa se cortó en fragmentos cuadrados (2 x 2 cm). Se transfirieron trozos de papel a un matraz de fondo redondo de un cuello (500 mL) que contenía 150 mL de agua ultra pura y se mantuvieron durante 10 min a 55ºC. Luego, se añadieron 4 mL de 0.05 M $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (catalizadores) y 25 mL de H_2O_2 al 30%. La reacción se llevó a cabo a 55ºC durante 25 min. Luego, se añadieron 15 mL de disolución de β-CD-NMA (0.125 M), manteniendo la temperatura a 55ºC. Después de 15 minutos, los fragmentos de papel funcionalizado con CD (F1) se retiraron del matraz con ayuda de unas pinzas, se lavaron dos veces con

acetona (200 mL) y se secaron en una estufa a 80ºC durante 20 minutos. Finalmente, se mantuvieron a 50ºC durante 24 h. Estos papeles fueron designados como F1.

Como alternativa, los papeles se funcionalizaron siguiendo un protocolo similar, pero cuando los papeles se transfirieron al agua, todos los demás reactivos se agregaron inmediatamente y la temperatura se ajustó a 50ºC. Estos papeles funcionalizados fueron designados como F2.

El injerto de ciclodextrina en el papel se confirmó mediante análisis ATR-FTIR (400-4000 cm^{-1}, Varian 670IR, EEUU). Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de papeles sin funcionalizar y funcionalizados se registraron en un FESEM Ultra Plus (Zeiss, Alemania) a 3 kV después del recubrimiento por pulverización con iridio.

7.2.4. EXPERIMENTOS DE ADSORCIÓN

Se evaluaron los papeles secos F1 y F2 funcionalizados y el papel control no funcionalizado (NF) para la carga o adsorción de ciprofloxacino y diclofenaco en tres medios acuosos: agua ultra pura, disolución de NaCl 0.9% (que simula la fuerza iónica de los fluidos biológicos) y disolución de NaCl 3.5% (imitando la concentración de sal del agua de mar). Los experimentos de adsorción se llevaron a cabo colocando un fragmento de papel previamente pesado (2 x 2 cm) en cada vial de vidrio de 20 mL que contenía 10 mL de disolución acuosa de hidrocloruro de ciprofloxacino (20 µg/mL) o disolución de diclofenaco sódico (40 µg/mL). Se registró el pH de todas las disoluciones (con un medidor de pH (Crison GLP22, España)). Los viales se colocaron en un agitador orbital VWR® Minishaker (Barcelona, España) con movimiento oscilatorio (200 osc/min) a temperatura ambiente y se mantuvieron durante diferentes períodos de tiempo (de 1 a 5 días). La concentración del fármaco remanente en el medio se determinó a partir de la absorbancia de alícuotas tomadas a diferentes intervalos de tiempo. La absorbancia se registró inmediatamente en un espectrofotómetro UV-Vis (HP Agilent, Alemania) a 276 nm, y las alícuotas fueron recuperadas inmediatamente a los viales correspondientes. Todos los experimentos se realizaron en 3 a 6 repeticiones. Después de cargar, los papeles se secaron bajo una corriente de nitrógeno y se almacenaron individualmente en tubos Eppendorf® de 5 mL hasta el ensayo de desorción.

Las isotermas de adsorción de diclofenaco se obtuvieron a partir de mediciones de adsorción registradas después de la inmersión de fragmentos de papel F1 (1 x 1 cm) en 10 mL de disoluciones de diclofenaco sódico con concentraciones de fármaco que varían de 6 a 100 µg/mL en medio de NaCl 0.9%, siguiendo el anterior protocolo descrito. Las disoluciones de carga se evaluaron directamente y también después del ajuste a pH 10 mediante la adición de NaOH. Los modelos de isotermas de Langmuir y Freundlich se ajustaron a los datos experimentales, como se publicó anteriormente para otros materiales injertados en CD [48-50] usando las siguientes ecuaciones.

Modelo de isoterma de Langmuir:

$$A = \frac{S * K * C_{\text{eq}}}{(1 + K * C_{\text{eq}})}$$

que fue linealizado a:

$$\frac{C_{\text{eq}}}{A} = \frac{1}{S * K} + \left(\frac{1}{S}\right) C_{\text{eq}}$$

En estas ecuaciones, *A* (mmol/g) representa la cantidad de diclofenaco cargada por gramo de fragmento de papel, *Ceq* (mM) es la concentración en equilibrio, *S* es el número

de sitios de adsorción o la cantidad de diclofenaco necesaria para saturar los sitios de adsorción, y *K* es la afinidad de un sitio de adsorción por una molécula de diclofenaco. A partir de la intersección en *Ceq* cero, se puede estimar la afinidad general *SK*.

Modelo de isoterma de Freundlich:

$$A = K_F * C_{eq}{}^{\frac{1}{n}}$$

que fue linealizado a:

$$Log\ A = Log\ K_F + \left(\frac{1}{n}\right) Log\ C_{eq}$$

En el modelo de Freundlich, *A* (mmol/g) y *Ceq* tienen el mismo significado que para el modelo de Langmuir, y K_F y *n* son constantes empíricas que indican la constante de Freundlich y el factor de heterogeneidad, respectivamente.

7.2.5. EXPERIMENTOS DE DESORCIÓN

Los papeles F1 y NF cargados con diclofenaco se colocaron en viales de vidrio de 20 mL con 5 mL de disolventes de elución: H_2O ultra pura, disolución de NaCl 0.9%, disolución de HCl 10 mM (pH 2), etanol, etanol/NaOH 10 mM (50:50, v:v, pH 10), acetonitrilo/NaOH 10 mM (50:50, v:v, pH 10), 2- propanol, o 2-propanol/NaOH 10 mM (50:50, v:v, pH 10). Se registró el pH de todas las disoluciones (utilizando un medidor de pH (Crison GLP22, España)). Todos los viales se agitaron usando un VWR® Minishaker (200 osc/min) durante 24 h a temperatura ambiente. En ciertos períodos de tiempo, el medio de elución se tomó para medir la absorbancia y se reemplazó con el mismo volumen de disolución fresca. Todos los experimentos se realizaron con 3-6 replicados.

Alternativamente, se aplicó sonicación durante la etapa de elución usando un baño ultrasónico Branson® (Düsseldorf, Alemania). Los papeles NF y F1 cargados con diclofenaco (después de la adsorción en disolución de fármaco en agua) se colocaron en viales de vidrio de 20 mL con 5 mL de una disolución de 2-propanol/NaOH 10 mM (50:50, v:v, pH 10) como disolvente de desorción. Luego se colocaron los viales en el baño de ultrasonido. Después de una sonicación de 0.1, 2, 5, 10 y 15 minutos, se determinó la cantidad de diclofenaco desorbido registrando la absorbancia a 276 nm. Todos los experimentos se realizaron con 3-6 replicados.

7.2.6. ESTUDIO DE READSORCIÓN

Los papeles F1 cargados con diclofenaco (en 10 mL de 40 µg/mL de diclofenaco en medio acuoso de NaCl 3.5%) se eluyeron en 5 mL de 2-propanol bajo agitación (200 osc/min) a temperatura ambiente. La absorbancia se registró en diferentes intervalos de tiempo. Luego, los papeles se transfirieron a viales que contenía agua (5 mL, un día) y etanol (5 mL, un día), se secaron a 40ºC (1.5 h) y se almacenaron. Posteriormente, los papeles se transfirieron nuevamente a la disolución de adsorción (10 mL de 40 µg/mL de diclofenaco en NaCl 3.5%) para recargar a temperatura ambiente y bajo agitación (200 osc/min) durante 24 h, monitoreando la absorbancia en ese intervalo de tiempo. Los experimentos se realizaron por triplicado.

7.2.7. ENSAYOS MECÁNICOS

Las pruebas de rasgado del material celulósico se llevaron a acabo utilizando un analizador de textura de microsistemas estables TA·XTPlus (Reino Unido). En cada prueba, se colocó un trozo de papel (2 x 2 cm) entre dos abrazaderas: una unida a la

plataforma y la otra conectada al brazo móvil del dispositivo. Las dos abrazaderas se colocaron a 8 mm de distancia. El trozo de papel fue estirado hasta que se rompió utilizando una celda de carga de 30 kg a una velocidad de alargamiento constante (1 mm/s). La fuerza de rotura máxima (N) se registró y luego se transformó en un índice de resistencia a la tracción dividido por el producto del ancho del papel y su gramaje. Los experimentos se llevaron a cabo con papeles NF y F1 preparados (secos) y después de experimentos de adsorción de diclofenaco en agua y eluidos en etanol/NaOH 10 mM (50:50, v:v, pH 10) o acetonitrilo/NaOH 10 mM (50:50, v:v, pH 10) y luego de secarlos al aire.

7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.3.1. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PAPELES MODIFICADOS CON β-CD-NMA

El injerto efectivo de β-CD en el papel de celulosa requirió la síntesis previa de un derivado de β-CD (ver esquema en la **Figura 7.1**). La formación de β-CD-NMA se confirmó mediante análisis elemental a través de la presencia de N (0.41%), que coincide con la sustitución de un solo grupo hidroxilo en cada uno de los siete anillos de la β-CD (considerando que los pesos moleculares de β-CD y β-CD-NMA son 1135.00 y 1940.91 g/mol, respectivamente; contenido teórico en N 0.50%). Además, en comparación con la β-CD, el espectro FTIR de la β-CD-NMA mostró tres bandas adicionales: dos bandas a 1709 y 1662 cm^{-1} debido al estiramiento de la amida I C=O y la amida II N-H, respectivamente, y una banda menor a 1547 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del C=C del grupo vinilo (**Figura 7.2**).

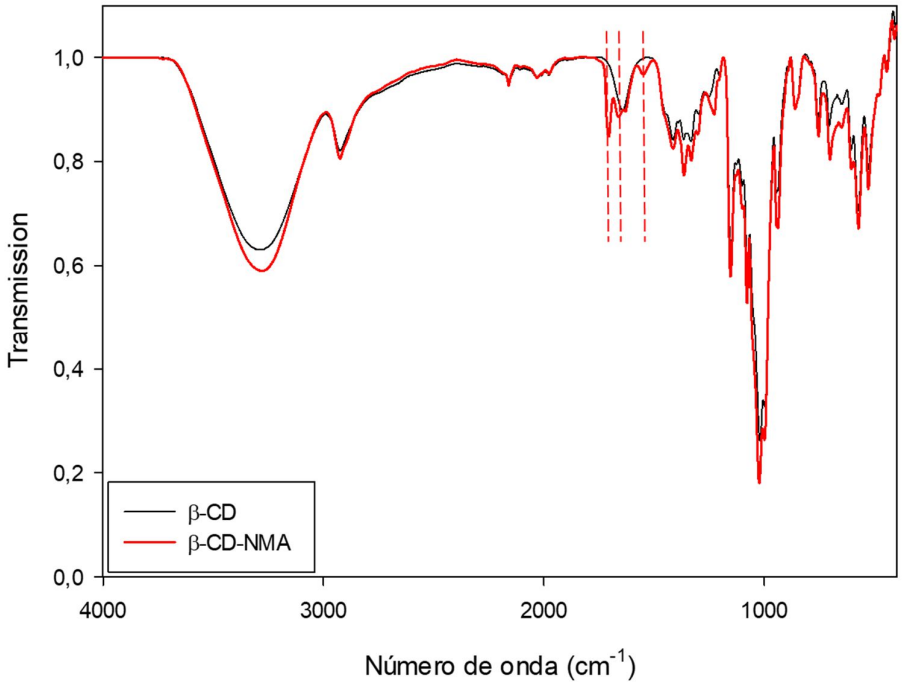


Figura 7.2. Espectros FTIR de β-CD (*línea negra*) y β-CD-NMA (*línea roja*). Las líneas rojas discontinuas muestras los principales cambios máximos en 1709, 1662 y 1547 cm^{-1}.

La reacción de β-CD-NMA con los fragmentos de papel de celulosa fue confirmada por FTIR. Se siguieron dos protocolos de funcionalización ligeramente diferentes

variando el tiempo de hidratación de los papeles. En la primera reacción (F1), el material se hidrató durante 10 minutos a 55ºC. En la segunda reacción (F2), no se utilizó un tiempo de hidratación y la temperatura fue de 50ºC. Los espectros FTIR de los papeles modificados con CD mostraron una banda adicional a 1735 cm^{-1} debido al grupo amida de la β-CD-NMA injertado (**Figura 7.3**). No se observaron diferencias entre F1 y F2. Sin embargo, se observaron resultados más reproducibles en las pruebas posteriores para el protocolo de funcionalización F1 y, por lo tanto, se descartó el protocolo F2.

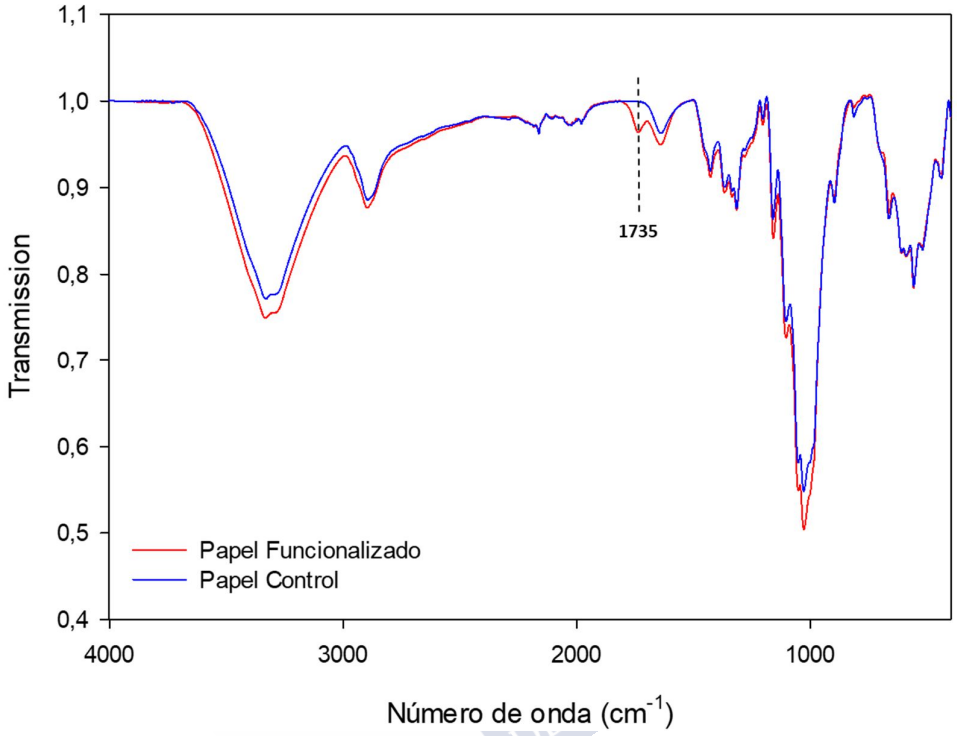


Figura 7.3. Espectros FTIR de papel control no funcionalizado (NF) (*línea azul*) y papel funcionalizado en CD (*línea roja*) que muestran un pico adicional a 1735 cm^{-1}.

Curiosamente, la apariencia de los papeles funcionalizados según F1 fue similar a la del papel control no funcionalizado. Las imágenes SEM grabadas a 1000x aumentos no mostraron cambios notables en las fibras de papel después del tratamiento con CD (**Figura 7.4**). Sin embargo, un estudio más detallado a 50000x y 100000x reveló que las fibras del material funcionalizado según F1 tenían numerosas nano estructuras similares a glóbulos adheridas en su superficie. El diámetro de estas nano estructuras oscilaba entre 60 y 120 nm. Cabe señalar que el diámetro externo de la β-CD es de aproximadamente 1.54 nm y, por lo tanto, estas nano estructuras pueden corresponder a agregados de β-CD debido al crecimiento de la cadena durante el injerto. La β-CD-NMA tiene grupos funcionales reactivos (dobles enlaces) que pueden facilitar el crecimiento de cadenas de poli-β-CD durante el injerto de radicales libres en la celulosa. Este fenómeno es común a otros monómeros, y también se ha descrito un aumento en la heterogeneidad de la superficie después del injerto de metacrilato de glicidilo en papel de filtro de celulosa [51].

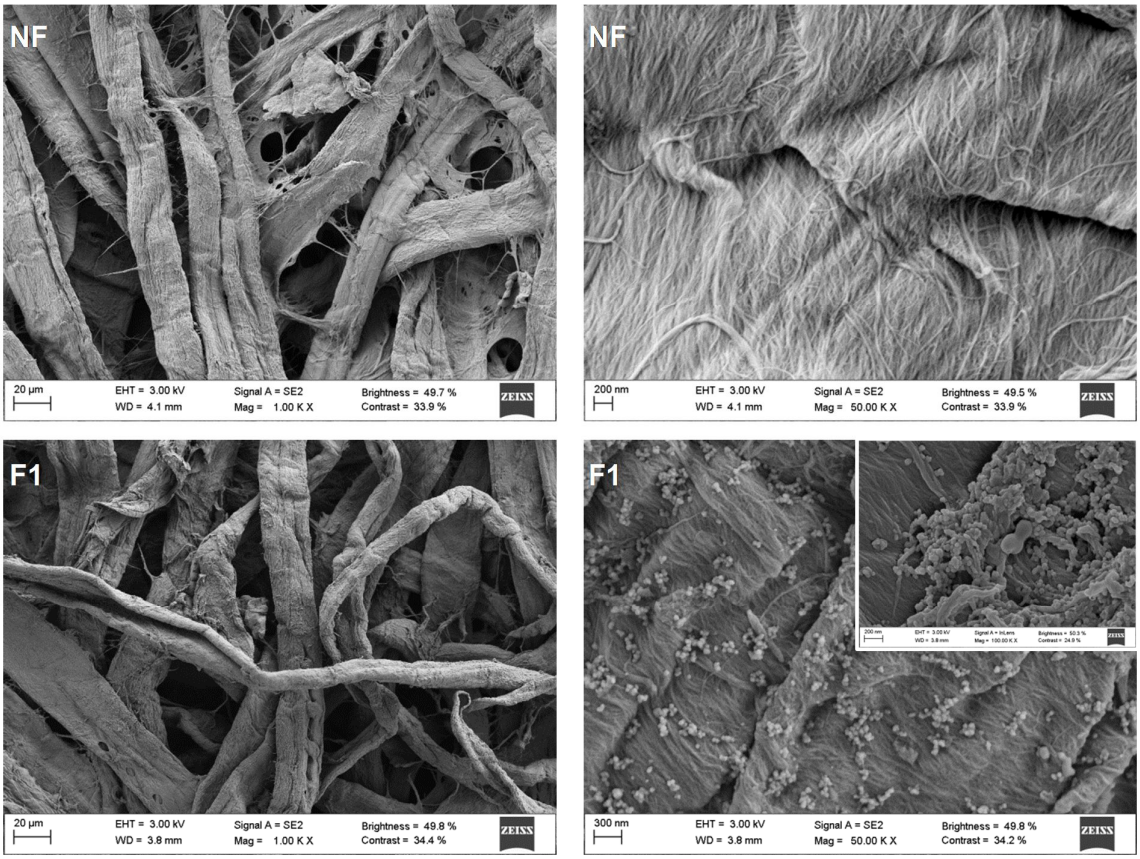


Figura 7.4. Imágenes SEM de la estructura del papel control no funcionalizado (*NF; primera fila*) y papel funcionalizado con CD (*F1; segunda fila*) grabado a 1000x (*barra de escala 20 µm*) y 50000x (*barra de escala 200 nm arriba, 300 nm abajo*). El inserto en la imagen F1 se registró a 100000x (*barra de escala 200 nm*).

7.3.2. EXPERIMENTOS DE ADSORCIÓN/DESORCIÓN CON CIPROFLOXACINO

Los papeles funcionalizados con β-CD se probaron con respecto a la carga de ciprofloxacino. Como otros compuestos fluoroquinolonas, el ciprofloxacino es una molécula zwitteriónica [52]. A pH ácido, los grupos amino y ácido carboxílico del fármaco están protonados y la molécula exhibe una carga positiva general, mientras que a pH> 8 predominan los grupos de ácido carboxílico cargados negativamente. Señalar que, a la concentración probada, la presencia de ciprofloxacino no modificó los valores iniciales de pH del medio acuoso y todas las muestras tenían valores de pH en el rango de 5.5 a 6.0. Los fragmentos de papel no funcionalizado (NF) y funcionalizado (F1) expuestos a disoluciones de ciprofloxacino (20 µg/mL) pudieron adsorber el compuesto en cantidades similares, aprox. 2.8 mg/g (**Figura 7.5**). Las cantidades atrapadas por los papeles fueron del 35 al 40% de la cantidad total de ciprofloxacino inicialmente en el medio. Por lo tanto, no se observaron diferencias relevantes entre los papeles funcionalizados y de control. Curiosamente, estos valores de adsorción fueron similares a los publicados previamente para otros materiales de celulosa (fibras de madera blanca) empapados en disoluciones concentradas de ciprofloxacino (2 mg/mL) [47]. También es

relevante que el pH 6.0 se haya identificado como el pH de la adsorción máxima de ciprofloxacino en la montmorillonita a través de interacciones electrostáticas [53]. A este pH, tanto las moléculas cargadas positivamente como las zwitterión coexisten en una relación molar igual. Un aumento adicional en el pH hasta 7.5 conduce a moléculas de zwitterión únicamente y la solubilidad del ciprofloxacino se vuelve mínima, aproximadamente 70 µg/mL [54]. Por lo tanto, la concentración de ciprofloxacino evaluada fue superior a la encontrada en las aguas residuales convencionales (en el rango de µg/L), pero inferior al coeficiente de solubilidad para evitar la precipitación del fármaco durante los ensayos.

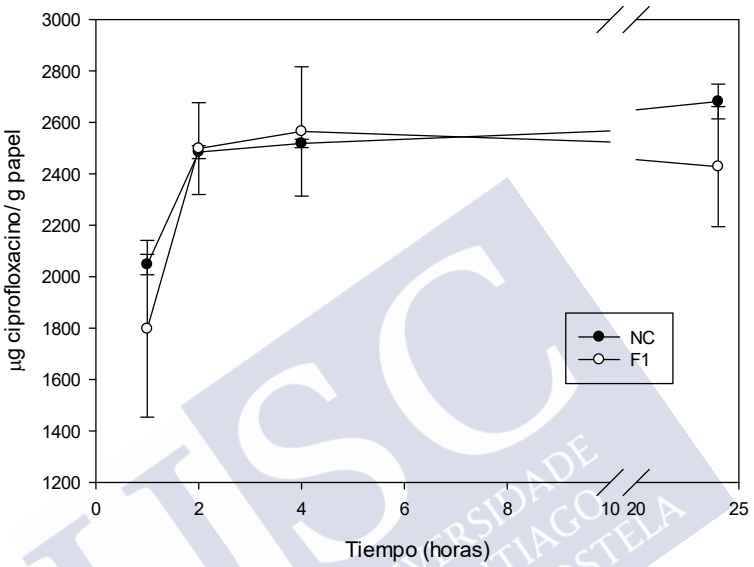


Figura 7.5. Adsorción de ciprofloxacino por papel control no funcionalizado (NF) y papel funcionalizado por CD (F1) de una disolución en agua (20 µg/mL).

El injerto de β-CD-NMA no mejoró la adsorción probablemente debido a la importante retención mostrada por el papel de celulosa no funcionalizado. Algunos grupos ácidos de papel de filtro de celulosa pueden ionizarse parcialmente en el medio acuoso [55] siendo bastante propensos a interactuar con las moléculas de clorhidrato de ciprofloxacino cargadas positivamente. Señalar que el proceso de blanqueo y la fabricación de papel (aplicado para producir papel de filtro) generan grupos aniónicos, principalmente grupos de ácido carboxílico y sulfónico, en la estructura de celulosa, que se ionizan permanentemente en un amplio rango de valores de pH [56]. Esta hipótesis de interacción iónica se confirmó cuando los experimentos de adsorción se llevaron a cabo en medio NaCl 0.9% (**Figura 7.6**). La capacidad de adsorción disminuyó drásticamente, en comparación con la registrada previamente en medio de agua purificada, debido a la detección de las interacciones iónicas causadas por la sal. Las interacciones con grupos aniónicos también explican el aumento en la captación de ciprofloxacino publicado previamente para polímeros que combinan CD y restos de ácido carboxílico [46, 47]. Por lo tanto, el papel de filtro de celulosa funcionalizado con β-CD no parece ser un material adecuado para la eliminación selectiva de este fármaco, porque las interacciones iónicas superan la unión a través de los complejos de inclusión.

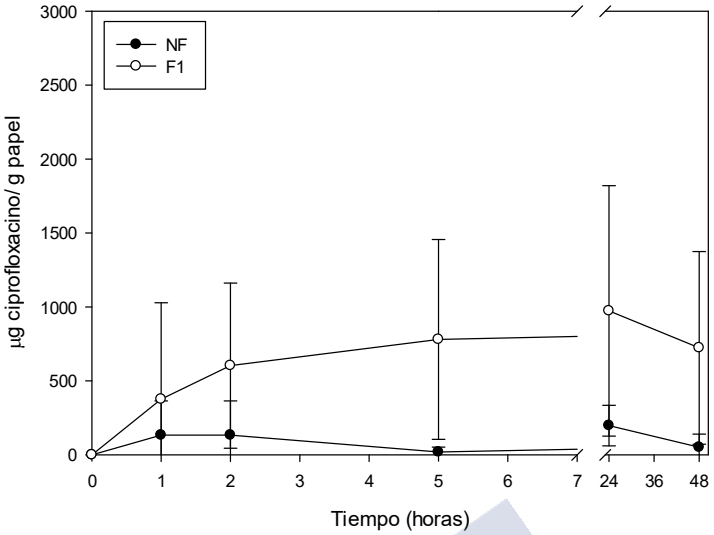


Figura 7.6. Adsorción de ciprofloxacino por papel control no funcionalizado (NF) y papel funcionalizado (F1) de una disolución de fármaco (20 µg/mL) preparada en NaCl 0.9%.

La recuperación de ciprofloxacino de los papeles cargados en medio acuoso (datos de la **Figura 7.5**) se investigó utilizando agua ultra pura, etanol y disolución de HCl 10 mM (**Figura 7.7**). Los resultados mostraron que casi el 100% de la cantidad de ciprofloxacino adsorbida por los papeles funcionalizados con CD se eluyó usando una disolución de HCl 10 mM, mientras que, el papel control NF eluyó el 80% del fármaco (**Figura 7.7**). En el medio acidificado, las interacciones iónicas con la celulosa se atenúan y el comportamiento zwitterónico del ciprofloxacino mejora la solubilidad del fármaco, facilitando la transferencia al ambiente acuoso externo.

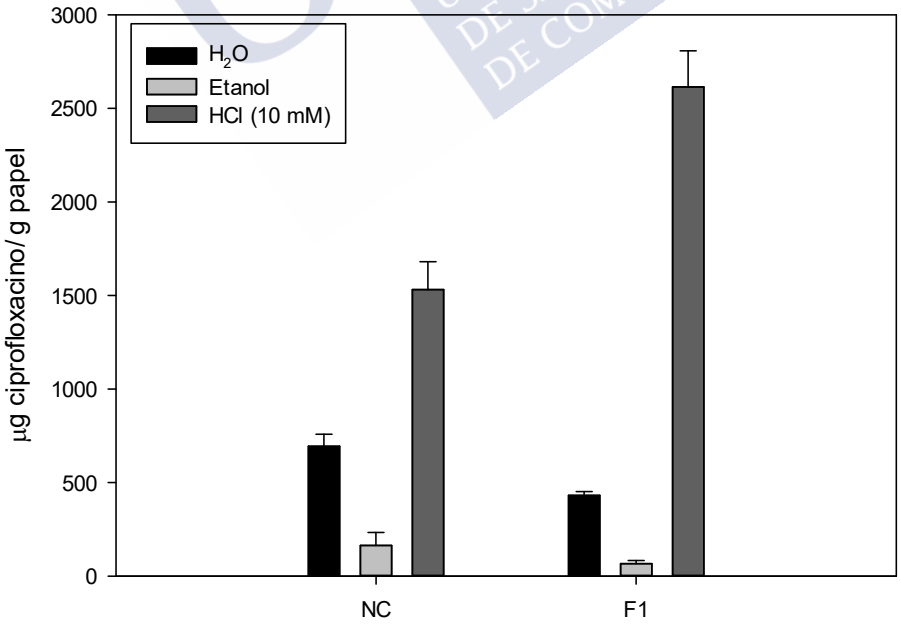


Figura 7.7. Desorción de ciprofloxacino a partir de papel control no funcionalizado (NF) y papel funcionalizado con CD (F1) después de inmersión en agua, etanol y HCl 10 mM (las cantidades adsorbidas se muestran en la **Figura 7.5**).

7.3.3. ENSAYOS DE ADSORCIÓN CON DICLOFENACO

La adsorción de diclofenaco por papeles funcionalizados siguiendo el procedimiento F1 y NF también se investigó en medios acuosos de diferente concentración salina a lo largo del tiempo y usando diferentes volúmenes de medio y concentraciones de fármaco. Todas las disoluciones de carga tenían valores de pH en el rango de 5.5 a 6.0. Luego, se identificaron las condiciones adecuadas para la recuperación de diclofenaco de los papeles mediante el estudio de los efectos de diferentes parámetros experimentales que afectan al rendimiento de extracción.

7.3.3.1. FUERZA IÓNICA

Los primeros experimentos realizados en agua (40 µg de fármaco por mL) revelaron que los papeles funcionalizados según el protocolo F1 fue capaz de adsorber cantidades notablemente mayores de diclofenaco (aproximadamente 64% del fármaco total en el medio) que el papel NF, que sólo capturó un 1% de diclofenaco del medio (**Figura 7.8**). Este hallazgo señaló que este fármaco aniónico (pKa 4.15) no tiene afinidad por la celulosa en sí misma (se une por debajo de 0.2 mg/g), probablemente porque las repulsiones iónicas superan las posibles interacciones hidrofóbicas. A pH 5.5-6.0, las moléculas de diclofenaco están casi completamente ionizadas y la solubilidad es dos órdenes de magnitud mayor que la solubilidad intrínseca registrada pH 4 (aprox. 32 µg/mL) [57]. Por lo tanto, en todos los ensayos de carga, la concentración de diclofenaco fue inferior al coeficiente de solubilidad y no se observó precipitación. Además, un aumento adicional en el pH sólo causaría un leve aumento en la fracción ionizada. Señalar que el diclofenaco es más lipofílico (Log $K_{o/w}$ 1.90) [58] que el ciprofloxacino (Log $K_{o/w}$ 0.28). De manera diferente, el injerto de β-CD dotó al papel de celulosa de una afinidad notablemente alta por el diclofenaco (aprox. 10 mg/g) que claramente superó al del ciprofloxacino. Los anillos aromáticos de diclofenaco pueden formar fácilmente complejos de inclusión con las ciclodextrinas como se informó anteriormente [59] y esta alta afinidad se transfiere al soporte de celulosa confirmando que las β-CD injertadas están inmovilizadas en una conformación que permite un libre acceso del fármaco a las cavidades de la ciclodextrina.

En el medio de NaCl 0.9%, el papel control NF no adsorbió cantidades cuantificables de diclofenaco, mientras que el papel F1 aumentó aún más la capacidad de adsorción atrapando aproximadamente el 75% del fármaco inicialmente presente en el medio. Probablemente, los iones causaron un efecto salino (*salting out effect*) que favoreció la formación del complejo de inclusión fármaco-β-CD. También se estudió la adsorción de diclofenaco en un medio más salino (NaCl 3.5%) que imita el agua de mar (**Figura 7.8**). Los resultados mostraron una captura del compuesto incluso mejorada por el papel F1 (88%), mientras que, la adsorción por el papel control NF fue menor (7%). Por lo tanto, un aumento en la fuerza iónica produjo un efecto positivo en la capacidad de los papeles funcionalizados para eliminar el diclofenaco del agua. En general, se descubrió que el injerto de β-CD es una herramienta muy eficaz para eliminar el diclofenaco de los ambientes acuosos.

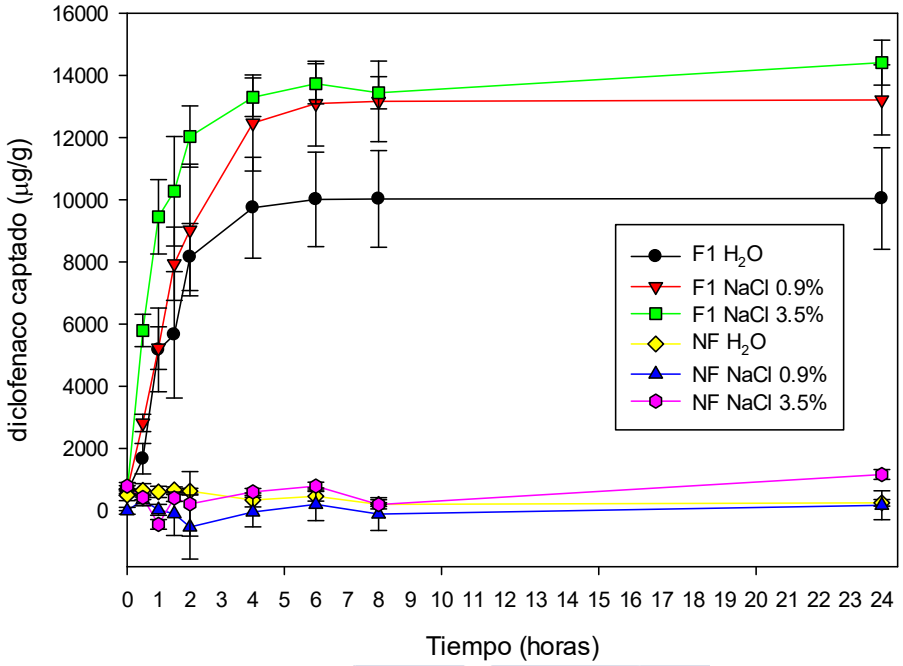


Figura 7.8. Adsorción de diclofenaco por papel control no funcionalizado (NF) y papel funcionalizado con CD (F1) de disoluciones de diclofenaco (40 µg/mL) preparadas en agua, NaCl 0.9% y NaCl 3.5%.

7.3.3.2.TIEMPO Y VOLUMEN DEL MEDIO DE ADSORCIÓN

La evolución de la adsorción de diclofenaco en los tres medios acuosos se controló durante 24 h para fragmentos de papel sumergidos en 10 mL de disoluciones de diclofenaco (40 µg/mL) (**Figura 7.8**). La adsorción de diclofenaco se produjo a un ritmo casi constante durante las primeras 4 h y luego, se registraron incrementos menores durante las siguientes 24 h. Por lo tanto, se considera que 4 h puede ser un tiempo adecuado para un protocolo de remediación. Los papeles que contenían diclofenaco se secaron bajo corriente de nitrógeno y se almacenaron hasta el ensayo de desorción.

Los posteriores ensayos de adsorción de diclofenaco se llevaron a cabo en agua, manteniendo la misma masa de analito (400 µg), pero variando el volumen del medio y, por lo tanto, la concentración del fármaco (**Figura 7.9**). Los fragmentos de papel fueron expuestos a los siguientes entornos: 10 µg/mL en un volumen de 40 mL, 20 µg/mL en un volumen de 20 mL y 40 µg/mL en un volumen de 10 mL. No se registraron diferencias significativas después de 4 h de inmersión.

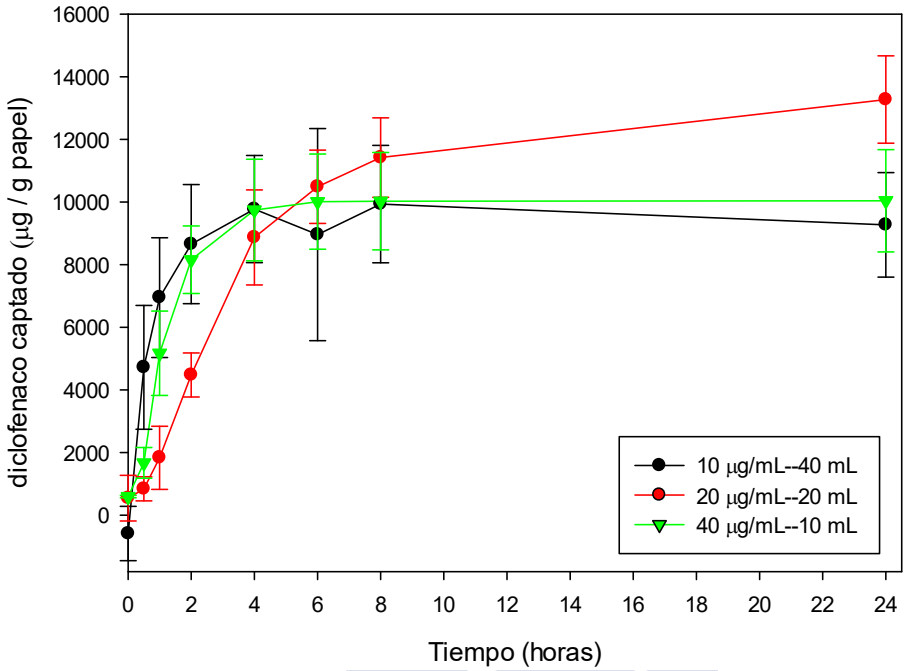


Figura 7.9. Adsorción de diclofenaco por papeles funcionalizados (F1) de disoluciones preparadas en agua a diferentes concentraciones y volúmenes de inmersión (*ver leyenda*).

El siguiente experimento consistió en mantener una concentración constante de diclofenaco (40 µg/mL), pero variando el volumen; 10, 20, 40 y 80 mL (**Figura 7.10**). La inmersión en los volúmenes mayores (de 40 a 80 mL) permitió que los papeles funcionalizados lograran la mayor adsorción, atrapando 24 a 25 mg de fármaco por gramo de papel F1. No se observó ningún incremento adicional cuando el volumen aumentó de 40 a 80 mL, lo que sugiere que se alcanzó el equilibrio de adsorción en esas condiciones. En términos de porcentaje de adsorción, la eficiencia de eliminación fue mayor cuando se usó un volumen de 10 mL (62.4% eliminado de un volumen de 10 mL en comparación con 29% eliminado de un volumen de 40 mL, ambos 4 h). Por lo tanto, los papeles F1 expuestos a volúmenes de 10 mL de disolución de diclofenaco (40 µg/mL) fueron seleccionados para dilucidar posteriormente la viabilidad de la desorción cuantitativa del fármaco y la reutilización del papel.

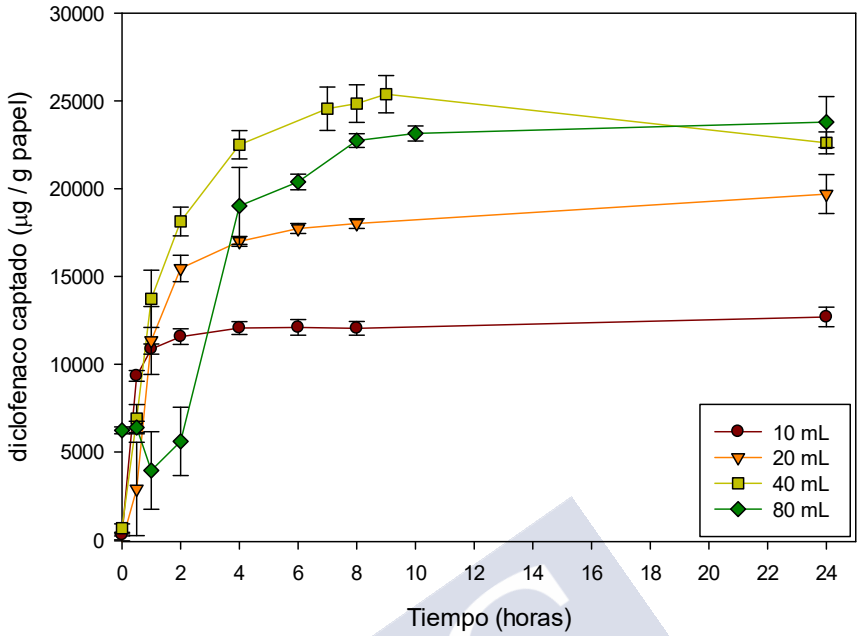


Figura 7.10. Adsorción de diclofenaco por papel funcionalizado (F1) a partir de disoluciones de diclofenaco (40 µg/mL) preparadas en agua. El volumen del medio de inmersión se indica en la leyenda.

7.3.3.3. ISOTERMAS DE ADSORCIÓN

Las isotermas de adsorción de diclofenaco se registraron para obtener una mayor comprensión de los valores de afinidad y saturación de los papeles F1 (**Figura 7.11**). Los experimentos se llevaron a cabo en medio NaCl 0.9%, ya que este medio facilita las interacciones fármaco-F1 (como se muestra en la **Figura 7.8**) e imita mejor que el agua la fuerza iónica de los ambientes acuáticos y los fluidos biológicos. El efecto del pH se evaluó registrando las cantidades adsorbidas del medio sin ajuste de pH (5.5-6.0) y del medio previamente ajustado a pH 10. En este último medio, la cantidad adsorbida fue insignificante. Se observó que los papeles F1 se inactivaron después de la exposición al medio pH 10 (ajustado añadiendo NaOH) durante 24 h, ya que el lavado posterior con agua y las pruebas de readsorción en medio NaCl 0.9% no mostraron adsorción de diclofenaco. Este hallazgo concuerda con la ruptura del enlace amida de las CD injertadas, que se rompe en condiciones alcalinas. Por lo tanto, las CD se liberan de los fragmentos de papel F1.

La termodinámica de adsorción de diclofenaco del medio NaCl 0.9% sin ajuste de pH se analizó aplicando modelos de isotermas de Langmuir y Freundlich, como se publicó anteriormente para otros materiales injertados con CD [48-50]. El ajuste de Langmuir fue mejor (R^2= 0.9556) que el registrado para el modelo Freundlich (R^2= 0.6888).

Según el modelo de Langmuir, la saturación, *S*, correspondió a 0.1886 mmol de diclofenaco por gramo de papel (es decir, aproximadamente 60 mg/g), y la afinidad, *K*, fue de 25.467 mM^{-1}. La afinidad global se estimó en 4.8031. Por lo tanto, suponiendo un complejo de inclusión 1:1, la cantidad de CD funcionales puede estimarse en 214 mg/g de papel. Los artículos previos sobre la adsorción de diclofenaco en el carbón activado de cáscara de coco indican que se produjo valores de saturación de 103 mg/g [60]. Por lo tanto, los papeles F1 con valores de *S* de 60 mg/g son trampas prometedoras para este contaminante.

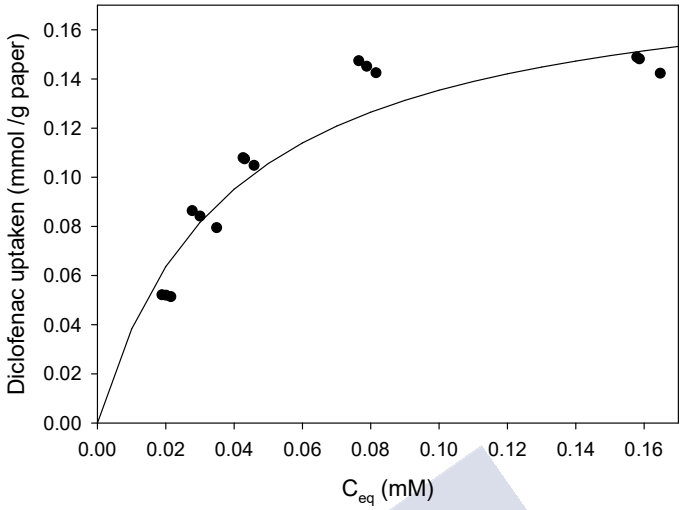


Figura 7.11. Isoterma de adsorción de diclofenaco en papel F1 (*puntos de datos*) y la adaptación del modelo de Langmuir (*línea negra*). El medio era disoluciones acuosas de NaCl 0.9% a 20ºC.

7.3.4. ENSAYOS DE DESORCIÓN PARA DICLOFENACO

Una vez que el diclofenaco se retuvo en el material celulósico, se investigaron las condiciones de desorción adecuadas. Los estudios se llevaron a cabo primero con papeles F1 y NF previamente cargados con el fármaco por inmersión en disoluciones de agua (es decir, en ausencia de NaCl), que se transfirieron a agua ultra pura o etanol y se mantuvieron a temperatura ambiente bajo agitación durante 24 a 48 h. La cantidad promedio eluida de los papeles F1 fue 14% y 29% usando agua ultra pura y etanol, respectivamente. Como se esperaba, los complejos de inclusión de diclofenaco fueron más estables en medio acuoso que en etanol ya que las interacciones hidrófobas se promueven en agua, mientras que el etanol puede competir y desplazar el diclofenaco de la cavidad de ciclodextrina. Sin embargo, de acuerdo con informes anteriores, el etanol tiene un efecto menor en la formación de diclofenaco en el complejo de inclusión en comparación con otros AINEs [61], lo que explica que no se logrará la elución completa del papel funcionalizado con β-CD. Para el papel control no funcionalizado, la elución fue completa pero casi insignificante debido a la baja cantidad adsorbida.

De manera similar, los papeles F1 que capturaron diclofenaco del medio NaCl 0.9% se sumergieron en medio acuoso con NaCl 0.9% o etanol y la cantidad eluida se cuantificó después de 24 a 72 h bajo agitación. Las cantidades promedio eluidas fueron 9% y 17%, respectivamente. Paralelamente, se realizaron algunas pruebas preliminares de elución en medio alcalino (NaOH 10 mM) para evaluar si un cambio en el pH podría mejorar la elución del diclofenaco. Los experimentos de desorción confirmaron que la cantidad de diclofenaco eluido por gramo de papel aumentó con el pH (hasta aproximadamente 30%). La elución en un medio alcalino puede ocurrir porque la afinidad del complejo fármaco-β-Cd se atenúa a medida que el fármaco está completamente ionizado.

Para optimizar las condiciones del proceso de elución, se amplió el estudio de desorción y los papeles F1 y NF que habían sido expuestos a la disolución de diclofenaco (40 µg/mL, 10 mL) en los tres medios acuoso (0%, 0.9% y 3.5% NaCl) se sometieron a elución usando cuatro medios disolventes: etanol (EtOH)/NaOH 10 mM (50:50, v:v),

acetonitrilo (ACN)/NaOH 10 mM (50:50, v:v), 2- propanol (IPA) y mezclas de 2-propanol/NaOH 10 mM (50:50, v:v). La cinética de extracción se controló a lo largo de 24 h (**Figura 7.12**). El equilibrio de elución se alcanzó en 4 a 6 h, dependiendo del medio. El equilibrio se alcanzó antes cuando el medio de extracción era alcalino. El mayor rendimiento de elución (73%) de los papeles cargados con diclofenaco en agua ultra pura se obtuvo usando como disolvente de elución IPA/NaOH 10 mM. Para los papeles cargados en el medio acuoso de NaCl 0.9%, los mejores resultados fueron propiciados por ACN/NaOH 10 mM con aproximadamente el 72% de rendimiento de elución, seguido de cerca por EtOH/NaOH 10 mM. Del mismo modo, las pruebas de desorción de papeles cargados en medio acuoso de NaCl 3.5% mostraron los mejores resultados (71% de rendimiento) en ACN/NaOH 10 mM. El acetonitrilo fue más eficiente que el etanol o el isopropanol debido a su mayor polaridad. La combinación del disolvente orgánico y el pH alcalino disminuyó la constante de estabilidad del complejo de inclusión y también puede desencadenar la ruptura del enlazador lábil β-CD al papel, provocando una liberación rápida del diclofenaco capturado por el papel funcionalizado con β-CD.

El uso de ultrasonidos se evaluó como una forma de acelerar el proceso de elución. Los papeles cargados previamente en disoluciones de diclofenaco (40 μg/mL, 10 mL) preparados en agua ultra pura se eluyeron en 5 mL de IPA/NaOH 10 mM durante 0.1, 2, 5, 10 y 15 minutos en un baño de ultrasonidos (**Figura 7.13a**). Los resultados revelaron la efectividad del uso de un baño de ultrasonidos durante 10 minutos para eluir el diclofenaco del papel funcionalizado, con casi un 66% de desorción sin dañar la estructura del papel (**Figura 7.13b**). Cuando se aplican los ultrasonidos durante 15 minutos, el porcentaje aumentó al 81%; sin embargo, el papel se destruye o deteriora en este intervalo de tiempo (**Figura 7.13c**). La comparación de los resultados obtenidos con el agitador orbital y el baño de ultrasonidos (**Figura 7.13a**) evidenció que el porcentaje de desorción aplicando 10 min de ultrasonidos fue similar al registrado después de 4 h con el agitador orbital. Como se esperaba, el proceso de transferencia de masa del adsorbente a la disolución se ve favorecido por la cavitación ultrasónica, lo que acorta el tiempo requerido para la elución. Sin embargo, si el papel funcionalizado está destinado a ser reutilizado, el paso del ultrasonido debe limitarse a 10 minutos.

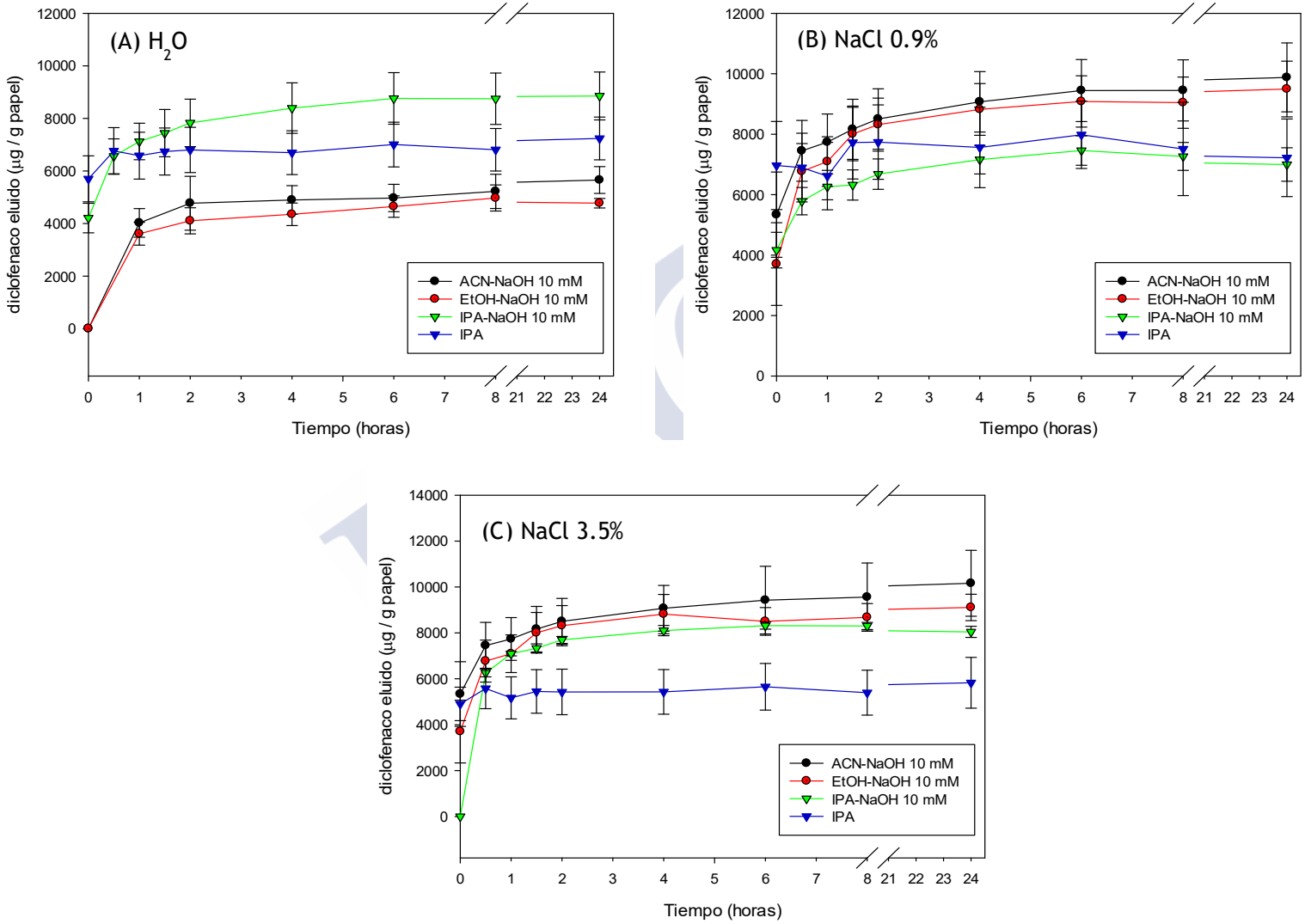
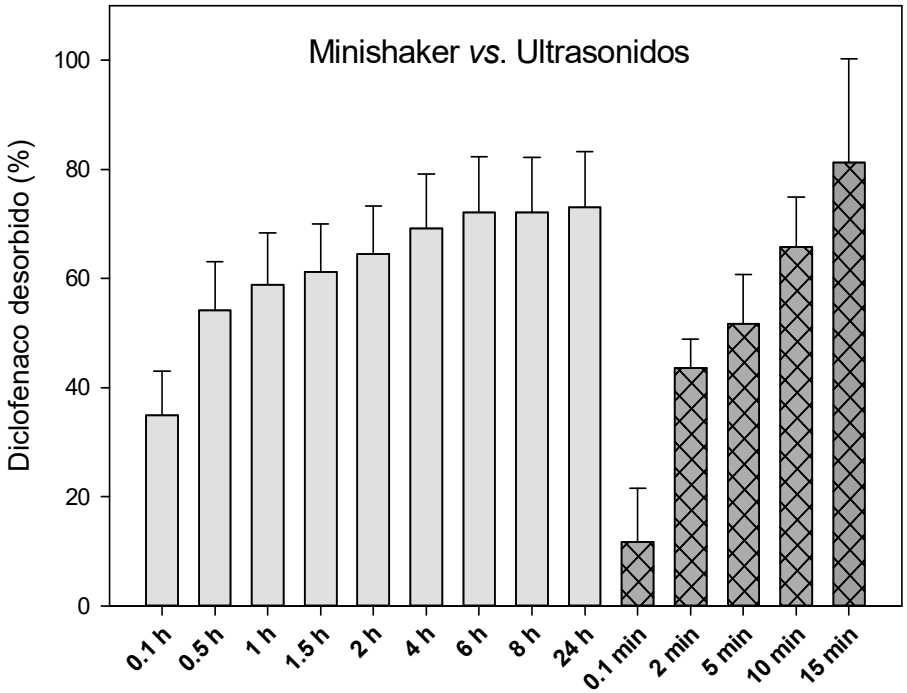


Figura 7.12. Curvas cinéticas de desorción registradas para papeles funcionalizados con CD que previamente habían sido cargados en diclofenaco por inmersión en disoluciones preparadas en (A) agua, (B) NaCl 0.9% y (C) NaCl 3.5%. Los disolventes de extracción evaluados fueron etanol/NaOH 10 mM (50:50, v:v) (*línea roja*), acetonitrilo/NaOH 10 mM (50:50, v:v) (*línea negra*), 2-propanol (*línea azul*) y 2-propanol/NaOH 10 mM (50:50, v:v) (*línea verde*).



(A)



Figura 7.13. (A) Porcentaje de diclofenaco desorbido del papel funcionalizado con CD en medio IPA/NaOH 10 mM (50:50, v:v) cuando los viales se agitaron durante varias horas (datos a la izquierda de 0.1 a 24 h) o expuestos a ultrasonido durante unos minutos (datos a la derecha de 0.1 a 15 min). Apariencia del papel funcionalizado después de (B) 10 minutos y (C) 15 minutos de exposición al ultrasonido.

7.3.5. ESTUDIO DE READSORCIÓN

Después de los ensayos de elución, los papeles F1 fueron sometidos a otro ciclo de adsorción para evaluar la reutilización del material. Las mismas pruebas se llevaron a cabo también con papeles NF tratados de la misma manera, utilizados como controles. Estos papeles F1 y NF se habían expuesto en el primer ciclo a una disolución con diclofenaco (40 µg/ mL, 10 mL) en medio acuoso de NaCl 3.5% y eluidos en medio IPA. El uso de NaOH se omitió en este protocolo de elución para evitar daños en la celulosa y el injerto de β-CD, pero los fragmentos de papel se lavaron con agua (un día) y etanol (un día) para garantizar la eliminación completa de diclofenaco previamente capturado y para permitir el acondicionamiento de los papeles para el siguiente paso de adsorción.

Por lo tanto, los papeles se transfirieron nuevamente a la disolución de adsorción (10 mL de 40 µg/mL de diclofenaco en disolución acuosa de NaCl 3.5%) a temperatura ambiente y se mantuvieron bajo agitación (200 osc/min) durante 24 h. Los papeles F1 recargaron 9533 µg/g (s.d. 196 µg/g) después de 4 h y 11823 µg/g (s.d. 190 µg/g) después de 24 h. Estas cantidades fueron casi 10% más bajo que las adsorbidas en el primer ciclo. Sin embargo, la capacidad de los papeles F1 para adsorber diclofenaco aún es importante. En un segundo ciclo de elución/readsorción se registró un comportamiento similar. Por lo tanto, los papeles F1 podrían soportar al menos dos ciclos de carga/elución.

7.3.6. ENSAYOS MECÁNICOS

Finalmente, se llevaron a cabo ensayos de rasgado para obtener una idea de los efectos de la funcionalización con CD de los papeles y los posteriores ciclos de adsorción/elución sobre las propiedades mecánicas de los papeles. Para realizar el análisis, se fijaron fragmentos de papel NF y F1 utilizando un par de pinzas mini-extensibles (**Figura 7.14**). La fuerza máxima en la rotura se transformó en índice de resistencia a la tracción. Los valores registrados para el papel NF estaban de acuerdo con los publicados previamente para otros filtros de celulosa [62, 63]. La funcionalización de CD causó una disminución en el índice de resistencia a la tracción del mismo orden de magnitud que el registrado para otros tratamientos de superficie [62]. De manera relevante, el proceso de adsorción/elución no modificó más las propiedades mecánicas de F1 de acuerdo con el comportamiento mostrado también por el papel NF.

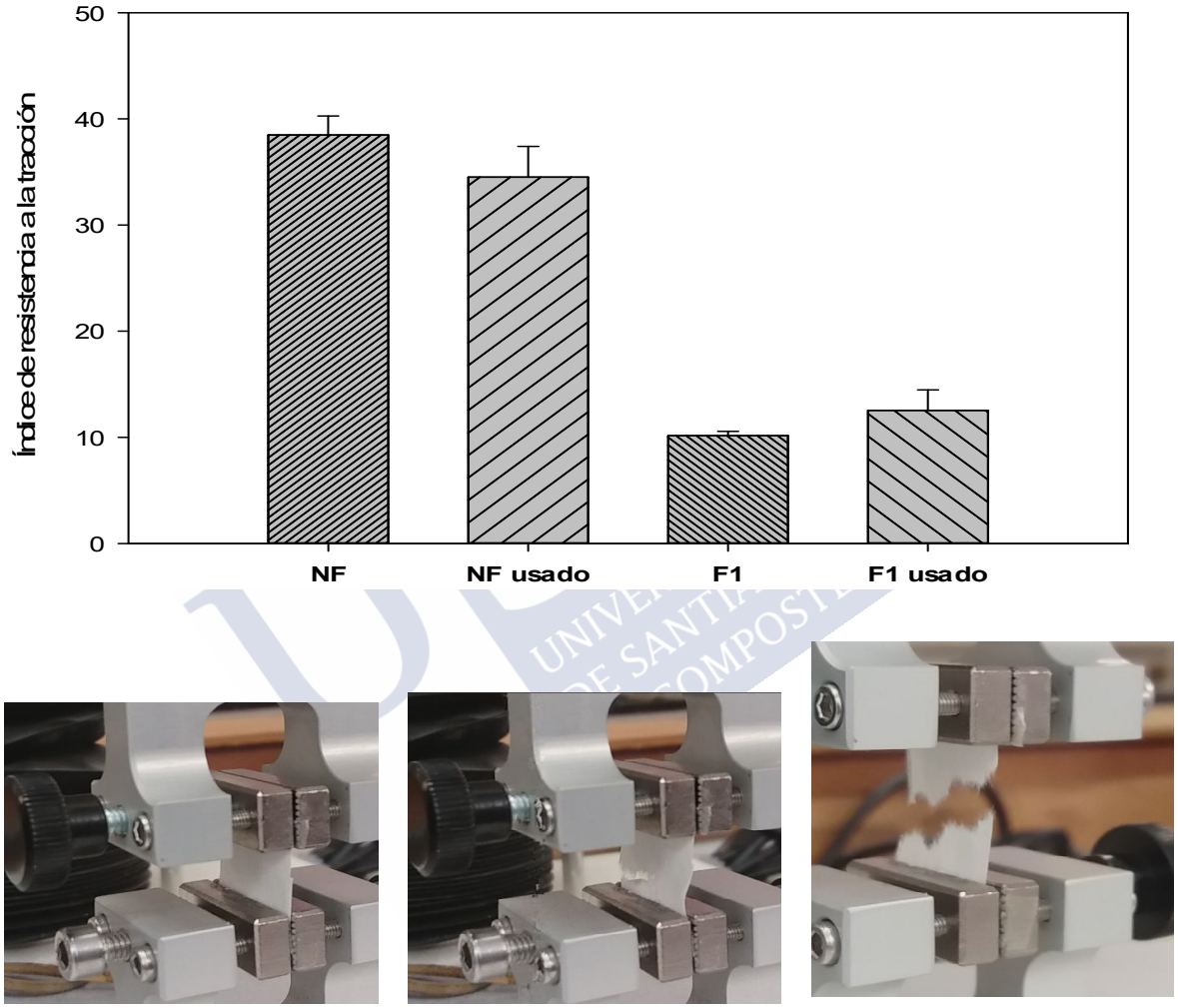


Figura 7.14. Configuración para las pruebas mecánicas realizadas hasta el desgarro con papeles control (NF) y papeles funcionalizados (F1) según lo preparado y después de un ciclo completo de adsorción/elución con diclofenaco y secado al aire.

7.4. CONCLUSIONES

El injerto de β-CD transformó un papel de celulosa común en un material adsorbente que capturaba eficientemente diclofenaco de medios acuosos. A diferencia de las interacciones basadas en iones del papel con ciprofloxacino, que fueron similares tanto para los papeles control como para los funcionalizados con CD, el diclofenaco se adsorbió a través de la formación de complejos de inclusión selectiva. Es importante destacar que el rendimiento de la captura de diclofenaco incluso se ha visto favorecido en el entorno salino, lo que amplía la idoneidad del papel funcionalizado con CD para aplicaciones analíticas y de remediación. En términos absolutos, el protocolo de funcionalización de CD implementado proporcionó papeles que tenían propiedades mecánicas aceptables y fueron capaces de capturar hasta 25 mg de diclofenaco por gramo en un tiempo relativamente corto (4 h). La viabilidad de la recuperación de la cantidad de diclofenaco adsorbido (que se puede acelerar aplicando ultrasonidos) agrega valor a los papeles funcionalizados con CD como fases analíticas que pueden concentrar el fármaco objetivo para la cuantificación posterior. Además, la reutilización en los siguientes ciclos de adsorción/elución puede ampliar la vida útil del filtro funcionalizado. Por lo tanto, el el protocolo de funcionalización de papel con CD proporciona una vía a investigar en estudios futuros para la captación de otros compuestos, tales como drogas de abuso o psicofármacos.

7.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Barbosa M.O., Moreira N.F.F., Ribeiro A.R., Pereira M.F.R., Silva A.M.T., Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water Res*., 2016, *94*, 257–279.

[2] Khan U., Nicell J., Human health relevance of pharmaceutically active compounds in drinking water. *AAPS Journal*, 2015, *17*, 558–585.

[3] Verlicchi P., Al Aukidy M., Zambello E., Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Sci. Total Environ*., 2012, *429*, 123–155.

[4] Azanu D., Styrishave B., Darko G., Weisser J.J., Abaidoo R.C., Occurrence and risk assessment of antibiotics in water and lettuce in Ghana. *Sci. Total Environ*., 2018, *622*, 293–305.

[5] Johnson A.C., Keller V., Dumont E., Sumpter J.P., Assessing the concentrations and risks of toxicity from the antibiotics ciprofloxacin, sulfamethoxazole, trimethoprim and erythromycin in European rivers. *Sci. Total Environ*., 2015, *511*, 747–755.

[6] Mirzaei R., Yunesian M., Nasseri S., Gholami M., Jalilzadeh E., Shoeibi S., Mesdaghinia A., Occurrence and fate of most prescribed antibiotics in different water environments of Tehran, Iran. *Sci. Total Environ*., 2018, *619-620*, 446–459.

[7] Rivera-Jaimes J.A., Postigo C., Melgoza-Alemán R.M., Aceña, J., Barceló D., López de Alda M., Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ*., 2018, *613–614*, 1263–1274.

[8] Sticchi C., Alberti M., Artioli S., Assensi M., Baldelli I., Regional point prevalence study of healthcare-associated infections and antimicrobial use in acute care hospitals in Liguria, Italy. *J. Hosp. Infect*., 2018, *99*, 8–16.

[9] Pan M., Chu L.M., Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in soils from wastewater irrigation areas in the Pearl River Delta region, southern China. *Sci. Total Environ*., 2018, *624*, 145–152.

[10] GWRC, Development of an international priority list of pharmaceuticals relevant for the water cycle. 2008. http://edepot.wur.nl/138086 (acceso mayo 2021).

[11] Mondal S.K., Saha A.K., Sinha A., Removal of ciprofloxacin using modified advanced oxidation processes: kinetics, pathways and process optimization. *J. Clean. Prod*., 2018, *171*, 1203–1214.

[12] Perini J.A.L., Tonetti A.L., Vidal C., Montagner C.C., Nogueira R.F.P., Simultaneous degradation of ciprofloxacin, amoxicillin, sulfathiazole and sulfamethazine and disinfection of hospital effluent after biological treatment via Photo-Fenton process under ultraviolet germicidal irradiation. *Appl. Catal. B-Environ*., 2018, *224*, 761–771.

[13] Moore R.A., Derry C., Efficacy of OTC analgesics. *Int. J. Clin. Pract*., 2013, *67*, 21–25.

[14] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Utilización de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos en España durante el periodo 2013-2016. Informe de utilización de medicamentos U/AIN/V1/11/09/2017. https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/antiinflamatorios-AINEs-periodo-2013-2016.pdf (acceso mayo 2021).

[15] Commission Implementing Decision (EU) 2018/840 of 5 June 2018 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Implementing Decision (EU) 2015/495. https://eur-lex.europa.eu/eli/dec_impl/2018/840/oj (acceso mayo 2021).

[16] Ahmed M.B., Zhou J.L., Ngo H.H., Guo W., Thomaidis N.S., Xu J., Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: a critical review. *J. Hazard. Mater.*, 2017, *323*, Part A, 274-298.

[17] Ganiyu S.O., van Hullebusch E.D., Cretin M., Esposito G., Oturan M.A., Coupling of membrane filtration and advanced oxidation processes for removal of pharmaceutical residues: a critical review. *Sep. Purif. Technol*., 2015, *156*, Part 3, 891–914.

[18] Gil A., Santamaría L., Korili S.A., Removal of caffeine and diclofenac from aqueous solution by adsorption on multiwalled carbon nanotubes. *Colloid Interfac. Sci*., 2018, *22*, 25-28.

[19] Lucas D., Castellet-Rovira F., Villagrasa M., Badia-Fabregat M., Barceló D., (2018). The role of sorption processes in the removal of pharmaceuticals by fungal treatment of wastewater. *Sci. Total Environ*., 2018, *610-611*, 1147-1153.

[20] Styszko K., Szczurowski J., Czuma N., Makowska D., Kwastler M., Uruski Ł., Adsorptive removal of pharmaceuticals and personal care products from aqueous solutions by chemically treated fly ash. *Int. J. Environ. Sci. Technol*., 2018, *15*, 493-506.

[21] Kazantzi V., Anthemidis A., Fabric sol–gel phase sorptive extraction technique: A Review. *Separations*, 2017, *4*, 1–20.

[22] Samanidou V.F., Kabir A., Fabric phase sorptive extraction in pharmaceutical analysis. Pharm. Anal. Acta, 2015, 6, e177.

[23] Mansour F., Al-Hindi M., Yahfoufi R., Ayoub G.M., Ahmad M.N., The use of activated carbon for the removal of pharmaceuticals from aqueous solutions: a review. *Rev. Environ. Sci. Bio*, 2018, *17*, 109-145.

[24] Hassani A., Karaca M., Karaca S., Khataee A., Açişili Ö., Yilmaz B., Preparation of magnetite nanoparticles by high-energy planetary ball mil and its application for ciprofloxacin degradation through heterogeneous Fenton process. *J. Environ. Manage*., 2018, *211*, 53–62.

[25] Heinze T., Liebert T., Unconventional methods in cellulose functionalization. *Prog. Polym. Sci*., 2001, *26*, 1689–1762.

[26] Hashemian Z., Khayamian T., Saraji M., Anticodeine aptamer immobilized on a Whatman cellulose paper for thin-film microextraction of codeine from urine followed by electrospray ionization ion mobility spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem*., 2015, *407*, 1615–1623.

[27] Ye C., Wu Y., Wang Z., Modification of cellulose paper with polydopamine as a thin film microextraction phase for detection of nitrophenols in oil samples. *RSC Advances*, 2016, *6*, 9066–9071.

[28] Carrasquilla C., Little J.R.L., Li Y.F., Brennan J.D., Patterned paper sensors printed with long-chain DNA aptamers. *Chem. Eur. J*., 2015, *21*, 7369-7373.

[29] Chitpong N., Husson S.M., Polyacid functionalized cellulose nanofiber membranes for removal of heavy metals from impaired waters. *J. Membr. Sci*., 2017, *523*, 418-429.

[30] Kabir A., Mesa R., Jurmain J., Furton, K.G., Fabric phase sorptive extraction explained. *Separations*, 2017, *4*, 1-21.

[31] Celebioglu A., Yildiz Z.I., Uyar, T., Electrospun crosslinked polycyclodextrin nanofibers: Highly efficient molecular filtration through host-guest inclusion complexation. *Sci. Rep*., 2017, *7*, 7369.

[32] Huang D., Tang Z., Peng Z., Lai C., Zeng G., Fabrication of water-compatible molecularly imprinted polymer based on β-cyclodextrin modified magnetic chitosan and its application for selective removal of biasphenol A from aqueous solution. *J. Taiwan Inst. Chem. E*., 2017, *77*, 113–121.

[33] Jansook P., Ogawa N., Loftsson T., Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm*., 2018, *535*, 272–284.

[34] Pose-Vilarnovo B., Rodriguez-Tenreiro C., dos Santos J.F.R., Vazquez-Doval J., Concheiro A., Modulating drug release with cyclodextrins in hydroxypropyl methylcellulose gels and tablets. *J. Control. Release*, 2004, *94*, 351-363.

[35] Alvarez-Lorenzo C., García-González C.A., Concheiro A., Cyclodextrins as versatile building block for regenerative medicine. *J. Control. Release*, 2017, *268*, 269-281.

[36] Sikder M.T., Rahman M.M., Jakariya M., Hosokawa T., Kurasaki M., Saito T., Remediation of water pollution with native cyclodextrins and modified cyclodextrins: A comparative overview and perspectives. *Chem. Eng. J*., 2019, *355*, 920-941.

[37] Xiao P., Weibel N., Dudal Y., Corvini P.F.X., Shahgaldian P., A cyclodextrin-based polymer for sensing diclofenac in water. *J. Hazard. Mater*., 2015, *299*, 412–416.

[38] Zhang J., Liu D., Shi Y., Sun C., Ni M., Determination of quinolones in wastewater by porous β-cyclodextrin polymer based solid-phase extraction coupled with HPLC. *J. Chromatogr. B*, 2017, *1068-1069*, 24–32.

[39] Wu M., Li P., Zhu Q., Wu M., Li H., Lu F., Functional paper-based SERS substrate for rapid and sensitive detection of Sudan dyes in herbal medicine. *Spectrochim. Acta A*, 2018, *196*, 110-116.

[40] Siemoneit U., Schmitt C., Alvarez-Lorenzo C., Luzardo A., Otero-Espinar F., Acrylic/cyclodextrin hydrogels with enhanced drug loading and sustained release capability. *Int. J. Pharm*., 2006, *312*, 66-74.

[41] Vismara E., Melone L., Gastaldi G., Cosentino C., Torri G., Surface functionalization of cotton cellulose with glycidyl methacrylate and its application for the adsorption of aromatic pollutants from wastewater. *J. Hazard. Mater*., 2009, *170*, 798-808.

[42] Sun L.J., Xiao G.F., Qian X.R., An X.H., Alkyne functionalized cellulose fibers: A versatile "clickable" platform for antibacterial materials. *Carbohydr. Polym*., 2019, *207*, 68-78.

[43] Grgac S.F., Malinar R., Application of environment-friendly processes aimed at bonding beta-cyclodextrine onto cellulosic materials. *Fibres Text. East. Eur*., 2018, *26*, 63-69.

[44] Jianbin C., Liang C., Hao X., Dongpin M., Preparation and study on the solid inclusion complex of ciprofloxacin with β-cyclodextrin. *Spectrochim. Acta A*, 2002, *58*, 2809-2815.

[45] Dargó G., Boros K., Péter L., Malanga M., Sohajda T., Novel medium-throughput technique for investigating drug-cyclodextrin complexation by pH-metric titration using the partition coefficient method. *Int. J. Pharm*., 2018, *542*, 100–107.

[46] Blanco-Fernandez B., Lopez-Viota M., Concheiro A., Alvarez-Lorenzo C., Synergistic performance of cyclodextrin–agar hydrogels for ciprofloxacin delivery and antimicrobial effect. *Carbohydr. Polym*., 2011, *85*, 765-774.

[47] Dong C., Ye Y., Qian L., Zhao G., He B., Xiao H., Antibacterial modification of cellulose fibers by grafting β-cyclodextrin and inclusion with ciprofloxacin. *Cellulose*, 2014, *21*, 1921–1932.

[48] Okoli C.P., Adewuyi G.O., Zhang Q., Diagboya P.N., Guo Q., Mechanism of dialkyl phthalates removal from aqueous solution using β-cyclodextrin and starch based polyurethane polymer adsorbents. *Carbohydr. Polym*., 2014, *114*, 440–449.

[49] Wang Z., Cui F., Pan Y., Hou L., Zhang B., Li Y., Zhu L., Hierarchically micro-mesoporous β-cyclodextrin polymers used for ultrafast removal of micropollutants from water. *Carbohydr. Polym*., 2019, *213*, 352–360.

[50] Wang X.L., Guo D.M., An Q.D., Xiao Z.Y., Zhai S.R., High-efficacy adsorption of Cr(VI) and anionic dyes onto beta-cyclodextrin/chitosan/hexamethylenetetramine aerogel beads with task-specific, integrated components. *Int. J. Biol. Macromol*., 2019, *128*, 268-278.

[51] Tyagi C., Tomar L.K., Singh H., Surface modification of cellulose filter paper by glycidyl methacrylate grafting for biomolecule immobilization: influence of grafting parameters and urease immobilization. *J. Appl. Polym. Sci*., 2009, *111*, 1381-1390.

[52] Hernández-Borrel J., Montero M.T., Calculating microspecies concentration of zwitterion amphoteric compounds: Ciprofloxacin as example. *J. Chem. Educ*., 1997, *74*, 1311-1314.

[53] Roca Jalil M.E., Baschini M., Sapag K., Influence of pH and antibiotic solubility on the removal of ciprofloxacin from aqueous media using montmorillonite. *Appl. Clay Sci*., 2015, *114*, 69–76.

[54] Olivera M.E., Manzo R.H., Junginger H.E., Midha K.K., Shah V.P., Stavchansky S., Dressman J.B., Barends D.M., Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: ciprofloxacin hydrochloride. *J. Pharm. Sci*., 2011, *100*, 22-33.

[55] Stana-Kleinschek K., Ribitsch V., Kreze T., Fras L., Determination of the adsorption character of cellulose fibres using surface tension and surface charge. *Mater. Res. Innov*., 2002, *6*, 13–18.

[56] Fardim P., Moreno T., Holmbom B., Anionic groups on cellulosic fiber surfaces investigated by XPS, FTIR-ATR, and different sorption methods. *J. Colloid Interf. Sci*., 2005, *290*, 383-391.

[57] Pobudkowska A., Domańska U., Study of pH-dependent drugs solubility in water. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q*., 2014, *20*, 115−126.

[58] Scheytt T., Mersmann P., Lindstädt R., Heberer T., 1-Octanol/water partition coefficients of 5 pharmaceuticals from human medical care: carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, and propyphenazone. *Water Air Soil Pollut*., 2005, *165*, 3–11.

[59] Sahra K., Dinar, K., Seridi A., Kadri M., Investigation on the inclusion of diclofenac with β-cyclodextrin: a molecular modeling approach. *J. Struct. Chem*., 2015, *26*, 61–69.

[60] Vedenyapina M.D., Stopp P., Weichgrebe D, Vedenyapin A.A., Adsorption of diclofenac sodium from aqueous solutions on activated carbon. *Solid Fuel Chem*., 2016, *50*, 46–50.

[61] Wei W., Ju, H.X., Affinity capillary electrophoresis studies on the influence of alcohols on the interaction of β-cyclodextrin with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Chromatographia*, 2003, *58*, 449-453.

[62] Huang L., Chen K., Li C., Yang R., Gerhardt R.A., Fabrication and characterization of superhydrophobic high opacity paper with titanium dioxide nanoparticles. *J. Mater. Sci*., 2011, *46*, 2600–2605.

[63] Li H., Yang J., Li P., Lan T., Peng L., A facile method for preparation superhydrophobic paper with enhanced physical strength and moisture-proofing property. *Carbohydr. Polym*., 2017, *160*, 9–17.

CHAPTER VI. CYTOTOXIC TESTING OF CATHINONES.

Presentación a congresos relacionados con este capítulo:

Póster: "Ensaio de citotoxicidade de catinonas nun modelo celular renal humano", VIII Encontro da Mocidade Investigadora, 26-28 mayo 2021, Santiago de Compostela (España).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

H. CYTOTOXIC TESTING OF CATHINONES IN A HUMAN KIDNEY MODEL.

8.1. INTRODUCTION

New psychoactive substances (NPS) have appeared on the European market as "legal alternatives" to internationally controlled substances in recent years. By 31st October 2020, the EU Early Warning System has monitored more than 820 substances since 1997 [1]. The number of NPS introduced to the drug market have increased dramatically in 2008. Between 2008 and 2018 around 90% of these compounds have been identified, having the maximum number of NPS notified in 2014-2015 with approximately 100 substances [2-4]. However, probably due to efforts to control NPS in Europe, as well as legal changes in countries of origin to restric production, the number of substances introduced into the European illicit market has decreased in recent years, with 53 substances notified for the first time in 2019 and 38 substances in 2020. Despite this downward trend, around 400 previously reported NPS have been detected in the European market each year since 2015 [1]. Due to their constant chemical modification and rapid introduction on the market, they are not being controlled by international control mechanisms [5]. They make up a wide range of compounds, such as synthetic cannabinoids, stimulants, opioids and benzodiazepines. Therefore, they are marketed as an alternative to already legislatively controlled illicit drugs, usually labelled under name of "legal highs", "designer drugs" or "research chemicals". In other cases, they are destined for minority groups who want to test them to see their potential novel effects [4]. This produces a high-risk to public health and a challenge to drug policies.

Synthetic cathinones, often named "bath salts" or "plant feeders", are a subgroup of NPS. They were introduced into the illicit market in 2004 first time as replacements for stimulant drugs, such as 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) or cocaine [4, 6]. According to the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) report, 138 cathinones have been monitored by the end of 2018. In addition, most seizures of NPS are dominated by synthetic cannabinoids and cathinones in Europe, approximately 77% of all seizures reported in 2018 [4, 7]. Synthetic cathinones are derived from of cathinone (*S*-(-)-2-amino-1-phenyl-1-propanone), a natural stimulant present in *khat* leaves plant (*Catha edulis Forsk*) and a β-ketone analogue of amphetamine, both from phenethylamine family. Structurally, synthetic cathinones are formed by a phenethylamine core, with an alkyl group attached to α position and a ketone group attached to β carbon, together with additional substitutions [8, 9]. The most popular synthetic cathinones used as drugs of abuse include 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) and methylone [10-13]. Consumption of these amphetamine-like stimulants can produce adverse effects as tachycardia, vasoconstriction, hypertension, hyperthermia, respiratory distress, spams, chest pain, hepatic dysfunction, acute kidney injury, coma and death [9, 14, 15]. Even so, toxicological information on the possible harmful effects of these types of compounds remains scarce. Synthetic cathinones exert their stimulating effects by modifying the synaptic concentration of catecholamines in the central nervous system [16, 17]. MDPV has the ability to block the reuptake of dopamine, acting as a selective inhibitor of dopamine transporter activity (DAT). On the other hand, methylone behaves as a non-selective inhibitor of monoamine transports, which induces the release mediated by the transporter of dopamine (DA), norepinephrine (NE) and serotonin (5-HT), similar to the actions of MDMA [9, 17-20]. Studies at the cellular level to evaluate the neurotoxic potential of synthetic cathinones were evaluated in cultured human

dopaminergic SH-SY5Y cells [12, 20, 21]. Otherwise, the liver is a major target for many amphetamine-like stimulants. Several *in vitro* hepatotoxicity studies have been described using different hepatic cell lines or primary hepatocytes of different species to determine the possible cytotoxic effect of synthetic cathinones [15, 22, 23], or amphetamines [23, 24]. In general, most of the data obtained by these studies show the similarities between the toxic events caused by synthetic cathinones such as MDPV, and amphetamines such as MDMA. This suggests a correlation in the toxicity mechanism of these drugs [15, 20, 21]. In addition, synthetic cathinones induced the loss of cell viability in a concentration- and time-dependent manner, showing neurotoxicity [20, 21] or hepatotoxicity [15, 22].

The kidney is one of the major organs of excretion and is exposed to a greater proportion of drugs and chemicals, which can be excreted unchanged or in the form of metabolites that may be more toxic than the parent compound [25]. The glomerular filtrate is concentrated in the proximal tubules of kidneys by reabsorption of essential molecules [26]. Proximal tubes are the place predisposed to injury by drugs, especially when those normally eliminated through kidneys. It is therefore important screening and understanding of the potential toxicity of drugs cause in this place to minimizes risks of nephrotoxicity [27]. The adverse effects produced by synthetic cathinones described in the scientific literature include hyperthermia or rhabdomyolysis, leading to acute renal injury [28-31]. However, the cellular mechanisms behind the nephrotoxic effects of synthetic cathinones are not yet known. Therefore, this work aimed to carry out a preliminary study to evaluate *in vitro* the cytotoxic potential of two cathinones in human kidney cells, derived from proximal tubules of kidneys (Hk-2).

8.2. MATERIAL AND METHODS

8.2.1. REAGENTS

RPM1-1640 medium, Triton X-100 and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), antibiotic mixture of penicillin/streptomycin (10,000 U/ml/10,000 mg/ml) and trypsin 0.25 %-EDTA were obtained from GIBCO Invitrogen (Barcelona, Spain). All other chemicals of analytical grade were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Hydrochloride salts of methylone and MDPV were purchased online from the Sensearomatic website (http://sensearomatic.net, currently unavailable), during March 2013. The salts were fully characterized by mass spectrometry, NMR and elemental analysis (data not shown), and purity was >98%. Hk-2 cells (human kidney cell line) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC®, VA, USA).

8.2.2. CELL CULTURE

HK-2 cells were cultured in 75 cm^2 canted-neck tissue culture flasks in RPM1-1640 medium (pH 7.4), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin (10000 U mL^{-1}/10000 µg mL^{-1}). Cells were maintained in a humidified incubator, at 37 °C, with 5% CO_2. Cells were sub-cultured at approximately 80% confluence over a maximum of 10 passages. For this, the medium was removed, the cells were washed with 1 mL of trypsin/EDTA 0.25% and another 2 mL trypsin/EDTA 0.25% was added to the flask and incubated at 37 °C for 5 minutes. Once the cells were detached from the surface of the flask, trypsin/EDTA was inactivated with fresh culture medium (1:4) and the suspension was passed to a culture flask and/or plate.

8.2.3. STOCK AND WORKING SOLUTIONS

Stock solutions of methylone and MDPV were prepared individually in sterile water by weighing the corresponding compounds at 50 mM and stored at -20 °C. At the time of the experiments, stock solutions were diluted in serum-free RPMI medium until the concentrations of 0.02, 0.1, 0.2, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 20 mM. Hk-2 cells were exposed to concentrations of 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 7, 8 and 10 mM, by dilution (1:2) in wells with serum-free culture medium.

8.2.4. EXPOSITION OF DRUGS AND MTT REDUCTION ASSAY

Briefly, Hk-2 cells were seeded in 96-wells plates, at a density of 1 x 10^4 cell per well. Peripheral wells on the plate were filled with sterile water to prevent evaporation and concentration of test solutions. Twenty-four hours after seeding, the medium was gently aspirated and the cells were incubated with the test drugs, methylone and MDPV, individually, in a humidified air atmosphere containing 5% CO_2, at 37 °C. The concentrations were selected to cover the whole effect range, from undetectable effects (when compared with negative controls) to 100% mortality. Each plate included six replicates of negative controls (i.e. serum-free culture medium without test agents) and six replicates of positive controls (full media with 1% Triton X-100) (**Figure 8.1a**). After 24 h of exposure to drugs, at 37 °C, the medium was removed followed by the addition of 100 µL of fresh serum-free culture medium containing 0.5 mg/L 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Plates were incubated at 37 °C, for 2 h. Finally, the cell culture medium was aspirated and the formed intracellular formazan crystals dissolved in 200 µL of 100% DMSO (**Figure 8.1b**) and measured on the spectrophotometer. The spectrophotometric analysis was run at 550 and 690 nm using a multi-wells plate reader (Stat Fax 3200, Awareness Technology, USA). Data were obtained from at least five (MDPV) and six (methylone) independent experiments, with each test plate containing three replicates of 16 increasing concentrations of the tested individual drugs.

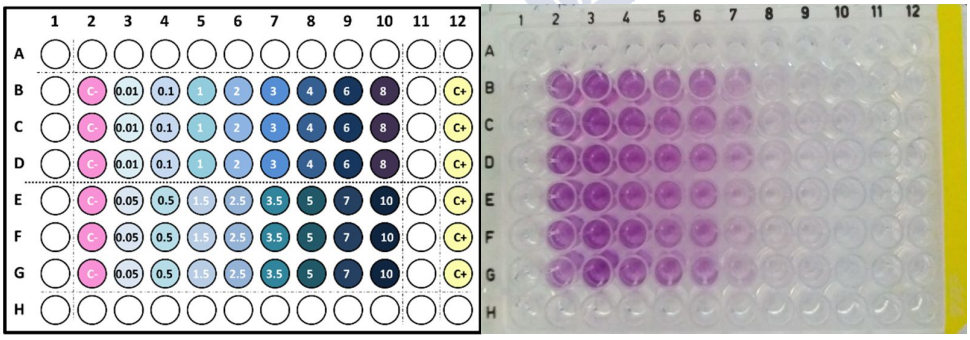


Figure 8.1. (A) Seeding of Hk-2 cells and exposure to concentrations of methylone and MDPV (in mM). The negative control is serum-free culture medium (*C- in the pink circle*) and positive control is 2% Triton (*C+ in yellow circle*). (B) An example of the MTT assay for methylone.

8.2.5. STATISTICAL ANALYSIS

Curves of normalized MTT assay data were adjusted and analyzed to the dosimetric logit model based on a goodness-fit approach [32], following the equation:

$$y = \frac{\theta min + (\theta max - \theta)}{1 + \exp[-\theta 1 - \theta 2 * \log(x)]}$$

where θ_{min} and θ_{max} represent the minimal and maximal observed effects, respectively. x is the concentration of test compound, θ_1 is the parameter for location and θ_2 is the slope parameter. MTT data were obtained from a least five or six independent experiments, performed in triplicate, and are presented including the 95% confidence intervals (CI) of the mean values and as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical comparisons were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) following by Dunn´s multiple comparison test. Significance was accepted at $p<0.05$. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7 (version 7.01) for Windows.

8.3. RESULTS AND DISCUSSION

The potential cytotoxic effects of cathinones derivatives were screened *in vitro* in the human renal cells (Hk-2 cell line). Hk-2 is an immortalized cell line retaining functional and phenotypic characteristics of normal adult human proximal tubular epithelium, which is suitable for the study of nephrotoxic agents such as drugs of abuse [27]. Hk-2 cells were exposed to different concentrations of cathinones for 24 h. Cell viability was indirectly evaluated through the assessment of mitochondrial function (*MTT reduction assay*) by reducing the tetrazolium salts. Briefly, in MTT reduction assay, yellow tetrazolium MTT is reduced by metabolically active cells (mitochondrial reductase enzymes) to generate reducing equivalents, such as NADH and NADPH. The resulting intracellular purple formazan can be solubilized and quantified by spectrophotometric means (550 and 690 nm) (**Figure 8.2**).

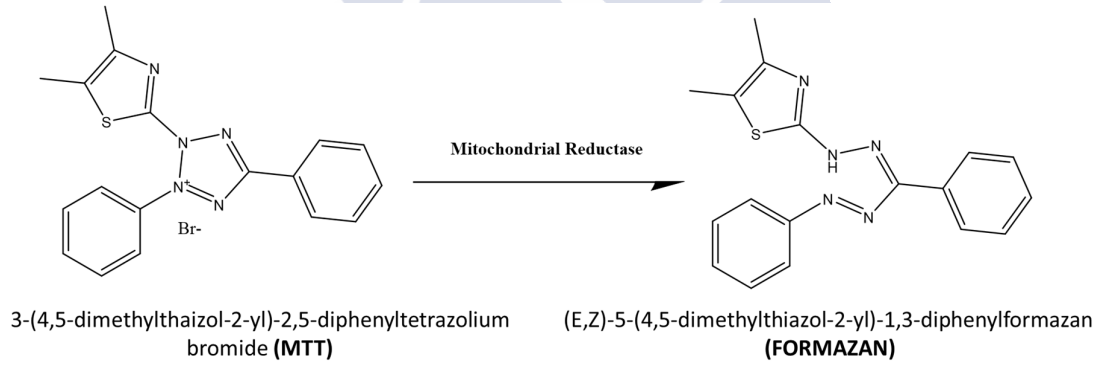


Figure 8.2. MTT reduction reaction.

In this work, it was observed by the MTT assay, that both individual cathinone derivatives tested, induced cell death in a concentration-dependent manner. The data were obtained through five (MDPV) or six (methylone) independent experiments, using independently prepared serial dilutions of all tested compounds. The cytotoxicity dose-response curves for each of the tested drugs, including the upper and lower 95% CI, are displayed in **Figure 8.3**. Several parameters were determined, namely the EC_{50}, the lower and upper limits of the curve, as well as the Hill Slope. Cathinones showed variable potencies according to their structure.

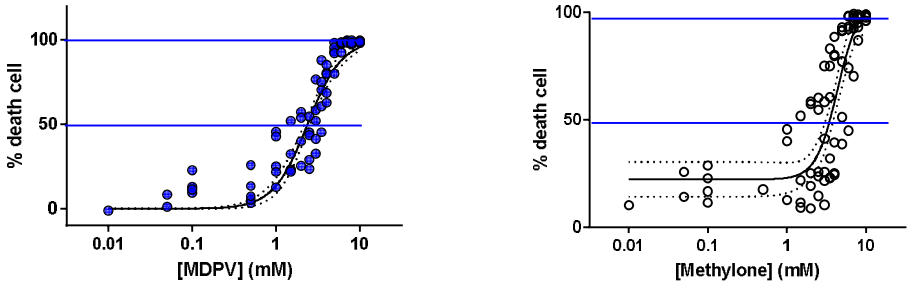


Figure 8.3. Complete concentration-response curves obtained with the MTT reduction cytotoxicity assay for MPDV and methylone, using Hk-2 cell line after 24 h incubations at 37 °C. The blue and open circles represent data from five and six independent experiments for MDPV and methylone, respectively. The solid lines represent the regression model (logit) and the dotted lines represent the corresponding 95% CI. The *blue line* shows the EC_{50} and EC_{max} for each response curve.

Significance differences were observed in the studied compounds. Methylone presents an EC_{50} value of 4.35 mM, whereas MDPV presents an EC_{50} value of 2.377 mM. Therefore, methylone decreased the viability of Hk-2 cells in a concentration-dependent manner, inducing a significant decrease in cell viability at a concentration of 5 mM. MDPV also decreased the viability of Hk-2 cells in a concentration-dependent manner, instead induce a significant decrease in cell viability at a concentration of 1 mM or higher, being more cytotoxic than methylone (**Figures 8.4** and **8.5**).

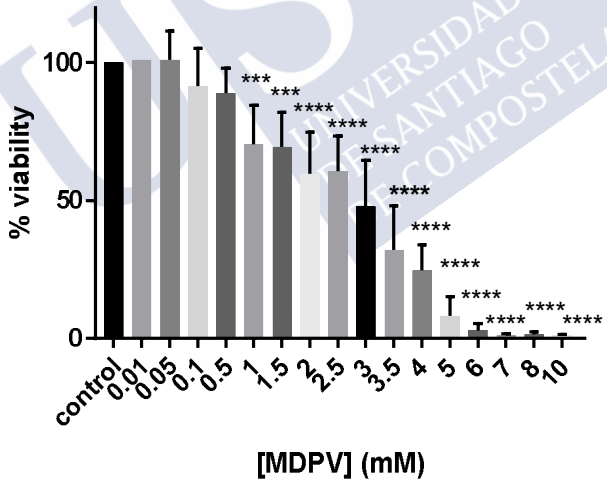


Figure 8.4. Effects of MDPV on MTT reduction in Hk-2 cells. Cells were exposed for 24 h, at 37 °C, to 0.01–10 mM MDPV concentrations. Results are presented as mean ± SEM from at least five independent experiments, performed in triplicate (***p < 0.001, ****p < 0.0001 versus control).

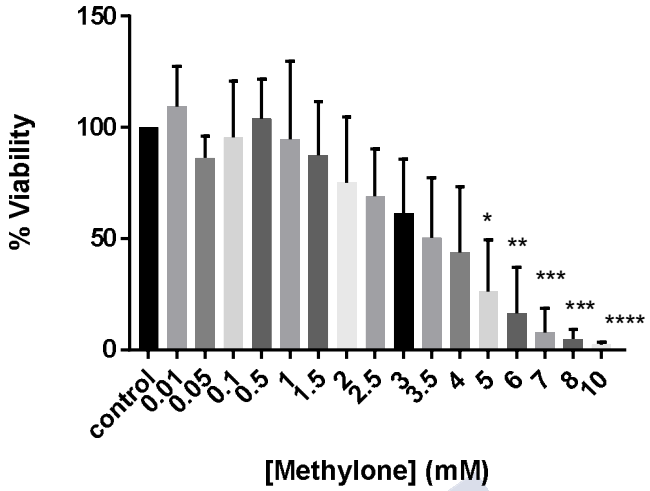


Figure 8.5. Effects of Methylone on MTT reduction in Hk-2 cells. Cells were exposed for 24 h, at 37 °C, to 0.01-10 mM methylone concentrations. Results are presented as mean ± SEM from at least six independent experiments, performed in triplicate (*p < 0.1, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 versus control).

Potential harms arising from the use of cathinones are currently scarce. Cathinones are used as an alternative for long-studied amphetamines, due to chemical similarity. Thus, similar pharmacodynamics and toxicological mechanisms for β-keto amphetamine-derivative drugs could be expected [33]. In addition, research into the toxicological mechanism responsible for kidney injury due to drug nephrotoxicity has been limited and unclear [27].

This work provides a preliminary step in the evidence of nephrotoxicity by methylone and MDPV in human kidney cells (Hk-2). The results showed that methylone was the least cytotoxic compound in this *in vitro* model, whereas MDPV was a more potent substance. Methylone (3,4-methylenedioxymethcathinone) is a substituted cathinone analogue of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, commonly known as "ecstasy"). It differs from MDMA in a ketone group in the beta position of the phenethylamine core, located in methylone. Due to the presence of the β-keto group, methylone has a lower log P value (-0.396) compared with MDMA (2.05), which indicates lower lipophilicity. In another way, MDPV has a pyrrolidine ring and a nitrogen atom attached to three carbon atoms composing a tertiary amino group in the structure causing high lipophilicity (log P 2.43) and creating a less polar molecule more able to cross the blood-brain barrier [16, 34]. In addition, a longer α-alkyl chain causes higher lipophilicity, hence, MDPV exhibits a higher plasma concentration than methylone after dosing the same amount of the pure substance [9, 14]. Therefore, results are in accordance with those found in previous studies for cathinones derivatives and some other amphetamine-like derivatives [15, 24, 35, 36] carried out in hepatic *in vitro* cell models. In the same way, the data obtained in this investigation are in agreement with those found in subsequent published study of these cathinones in Hk-2 cells [27]. These authors obtained similar results in terms of potency, despite having obtained slightly higher EC_{50} for methylone (EC_{50} 6.31 vs 4.35) and MDPV (EC_{50} 3.83 vs 2.37).

On the other hand, the concentrations used in this *in vitro* study were selected to cover a wide cytotoxic effect range. However, these concentrations exceeded those found in biological samples, which are usually in the low micromolar range [37-40]. Even so,

the concentrations used can be considered physiological relevant, due to the unique property of the renal tubular epithelium of concentrating urine and its components, including drugs, which makes the kidney particularly susceptible to toxicity. According to this, recently published data [41] showed that the concentration found in urine samples are commonly higher than those found in blood. In addition, the actual levels of synthetic cathinones detected in urine samples range from 0.2 to than 500 µg/mL, which is relatively high considering the EC values analyzed here (2.4-31180 µg/mL). In addition, due to their high lipophilicity, these cathinones have a high volume of distribution, which means that concentrations of alpha-pyrrolidinophenone derivatives are not directly related to blood levels. In some postmortem studies, methylone [40] and MDPV [42, 43] concentrations were found higher in tissues such as brain, liver and kidneys than in blood. Furthermore, postmortem concentrations can be lower than after drug intake due to metabolic procedure and postmortem redistribution. Methylenedioxy-types cathinones with a secondary amine have the highest central/peripheral blood ratios, so they are susceptible to postmortem redistribution. Due to the instability of beta-keto amphetamines, the distribution of cathinones postmortem is complicated. Therefore, the concentrations of these cathinones were found higher in hepatocytes [35, 44] and renal [27] than those found in blood.

8.4. CONCLUSIONS

The results obtained from this study revealed that nephrotoxicity occurred at relatively high concentrations of the tested cathinones compared to the low micromolar concentrations found in blood or urine samples. In addition, the same concentration range used in these experiments was similar to that used in *in vitro* toxicity studies with cathinones and amphetamines derivatives, e.g. MDMA, and hepatocytes or renal cells (Hk-2) as a model cellular. Therefore, the results are in accordance with those obtained for methylone and MDPV in hepatocytes and renal cells (HK-2), establishing the kidney as a target organ for nephrotoxicity by synthetic cathinones.

8.5. REFERENCES

[1] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2020), New psychoactive substances: global markets, glocal threats and the COVID-19 pandemic. An update from the EU Early Warning System (December 2020), Publications Office of the European Union, Luxembourg. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13464/20205648_TD0320796ENN_PDF_rev.pdf (access May 2021).

[2] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction and Europol (2019), EU Drug Markets Report 2019, Publications Office of the European Union, Luxembourg. http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/12078/20192630_TD0319332ENN_PDF.pdf (access May 2021).

[3] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2018), European Drug Report 2018: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg. http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/8585/20181816_TDAT18001ENN_PDF.pdf (access May 2021).

[4] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2019), European Drug Report 2019: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg. http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11364/20191724_TDAT19001ENN_PDF.pdf (access May 2021).

[5] Chung H., Lee J., Kim E., Trends of novel psychoactive substances (NPSs) and their fatal cases. *Forensic. Toxicol*., 2016, *34*, 1-11.

[6] Gaspar H., Bronze S., Oliveira C., Victor B.L., Machuqueiro M., Pacheco R., Caldeira M.J., Santos S., Proactive response to tackle the threat of emerging drugs: Synthesis and toxicity evaluation of new cathinones. *Forensic. Sci. Int*., 2018, *290*,146-156.

[7] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2020), European Drug Report 2020: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13236/TDAT20001ENN_web.pdf (access May 2021).

[8] Valente M.J., Araújo A.M., Bastos M. L., Fernandes E., Carvalho F., Guedes de Pinho P., Carvalho M., Characterization of Hepatotoxicity Mechanisms Triggered by Designer Cathinone Drugs (β-Keto Amphetamines). *Toxicol. Sci*., 2016, *153(1)*, 89-102.

[9] Calinski D.M., Kisor D.F., Sprague J.E., A review of the influence of functional group modifications to the core scaffold of synthetic cathinones on the drug pharmacokinetics. *Psychopharmacology*, 2019, *236*, 881-890.

[10] Lugo-Vargas A.F., Chaves-silva D.C., Quevedo-Buitrago W.G., Martínez-Suárez J.F., Catinonas sintéticas: una revisión del panorama actual y las estrategias de detección analítica, *Rev. Toxicol*. 2020, *37*, 31-40.

[11] German C.L., Fleckenstein A.E., Hanson G.R., Bath salts and synthetic cathinones: an emerging designer drug phenomenon, *Life Sci*. 2014, *97*, 2-8.

[12] Leong H.S., Philp M., Simone M., Witting P.K., Fu S., Synthetic cathinones induce cell death in dopaminergic SH-SY5Y cells via stimulating mitochondrial dysfunction, *Int. J. Mol. Sci*. 2020, *21*, 1370.

[13] Silva B., Palmeira A., Silva R., Fernandes C., Guedes de Pinho P., Remiao F., S-(+)-Pentedrone and R-(+)-methylone as the most oxidateive and cytotoxic enantiomers to dopaminergic SH-SY5Y cells: Role of MRP1 and P-gp in cathinones enentioselectivity, *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2021, *416*, 115442.

[14] Spálovská D., Maríková T., Kohout M., Králík F., Kuchar M., Setnicka V., Methylone and pentylone: structural analysis of new psychoactive substances. *For. Toxicol*., 2019, *37*, 366-377.

[15] Valente M.J., Araújo A.M., Silva R., Bastos M.L., Carvalho F., Guedes de Pinho P., 3,4-Methylendioxypyrovalerone (MDPV): in vitro mechanism of hepatoxicity under normothermic and hyperthermic conditions. *Arch. Toxicol*., 2016, *90*, 1959-1973.

[16] Coppola M., Mondola R., Synthetic cathinones: Chemistry, pharmacology and toxicology of a new class of designer drugs of abuse marketed as “bath salts” or “plant food”. *Toxicol. Letters*, 2012, *211*, 144-149.

[17] Baumann M.H., Walters H.M., Niello M., Sitte H.H., Neuropharmacology of synthetic cathinones, *Handb. Exp. Pharmacol*. 2018, *252*, 113-142.

[18] Allen S.A., Tran L.H., Oakes H.V., Brown R.W., Pond B.B., Dopaminergic Effects of Major Bath Salt Constituents 3,4-Methylenedioxypyrovalerone (MDPV), Mephedrone, and Methylone Are Enhanced Following Co-exposure. *Neurotox. Res*., 2019, *36*, 132-143.

[19] Zwartsen A., Olijhoek M.E., Westerink R.H.S., Hondebrink L., Hazard Characterization of Synthetic Cathinones Using Viability, Monoamine Reuptake, and Neuronal Activity Assays. *Front. Neurosci.* 2020, *14*:9. doi: 10.3389/fnins.2020.00009.

[20] Valente M.J., Amaral C., Correia-da-Silva G., Duarte J.A., Bastos M.L., Carvalho F., Guedes de Pinho P., Carvalho M., Methylone and MDPV actívate autophagy in human dopaminergic SH-SY5Y cells: a new insight into the context of β-keto amphetamines-related neurotoxicity, *Arch. Toxicol*. 2017, *91*, 3663-3676.

[21] Valente M.J., Bastos M.L., Fernandes E., Carvalho F., Guedes de Pinho P., Carvalho M., Neurotoxicity of β-keto amphetamines: deathly mechanisms elicited by methylone and MDPV in human dopaminergic SH-SY5Y cells, *ACS Chem. Neurosci*. 2017, *8*, 850-859.

[22] Silva B., Fernandes C., Tiritan M.E., Pinto M.M.M., Valente M.J., Carvalho M., Guedes de Pinho P., Remiao F., Chiral enantioresolution of cathinone derivatives present in "legal highs", and enantioselectivity evaluation on cytotoxicity of 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV), *Forensic Toxicol*. 2016, *34*, 372-385.

[23] Richter L.H.J., Beck A., Flockerzi V., Maurer H.H., Meyer M.R., Cytotoxicity of new psychoactive substances and other drugs of abuse studied in human HepG2 cells using an adopted high content screening assay, *Toxicol. Letters* 2019, *301*, 79-89.

[24] Dias da Silva D., Silva E., Carmo H., Combination effects of amphetamines under hyperthermia-the role played by oxidative stress. *J. Appl. Toxicol*., 2014, *34*, 637-650.

[25] Li W., Lam M., Choy D., Birkeland A., Sullivan M.E., Post J.M., Human primary renal cells as a model for toxicity assessment of chemo-therapeutic drugs, *Toxicol. In Vitro* 2006, *20*, 669-676.

[26] Wu Y., Connors D., Barber L., Jayachandra S., Hanumegowda U.M., Adams S.P., Multiplexed assay panel of cytotoxicity in Hk-2 cells for detection of renal proximal tubule injury potential of compounds. *Toxicol. Vitro*, 2009, *23*, 1170-1178.

[27] Vaz I., Carvalho T., Valente M.J., Castro A., Araújo A.M., Bastos M.L., Carvalho M., The interplay between autophagy and apoptosis mediates toxicity triggered by synthetic cathinones in human kidney cells, *Toxicol. Letters* 2020, *331*, 42-52.

[28] Banks M.L., Worst T.J., Rusyniak D.E., Sprague J.E., Synthetic Cathinones ("Bath Salts"), *J. Emerg. Med*. 2014, *45*, 632-642.

[29] Regunath H., Ariyamuthu V.K., Dalal P., Misra M., *Hemodial. Int*. 2012, *16*, 47-49.

[30] McNeely J., Parikh S., Valentine C., Haddad N., Shidham G., Rovin B., Hebert L., Agarwal A., Bath Salts: A Newly Recognized Cause of Acute Kidney Injury, *Case Rep. Nephrol*. 2012, *2012*, 560854.

[31] Borek H.A., Holstege C.P., Hyperthermia and Multiorgan Failure After Abuse of "Bath Salts" containing 3,4-methylenedioxypyrovalerone, *Ann. Emerg. Med*. 2012, *60*, 103-105.

[32] Scholze, M., Boedeker, W., Faust, M., Backhaus, T., Altenburger, R., Grimme, L.H., A general best-fi method for concentration-response curves and the estimation of low-effct concentrations, *Environ. Toxicol. Chem*. 2001, *20*, 448-457.

[33] Carvalho M., Carmo H., Costa V.M., Capela J.P., Pontes H., Remiao F., Carvalho F., Bastos M.L., Toxicity of amphetamines: an update, *Arch. Toxicol*. 2012, *86*, 1167-1231.

[34] Coppola M., Mondola R., 3,4-Methylenedioxypyrovalerone (MDPV): Chemistry, pharmacology and toxicology of a new designer drug of abuse marketed online. *Toxicol. Letters*, 2012, *208*, 12-15.

[35] Araújo A.M., Valente M.J., Carvalho M., Dias da Silva D., Gaspar H., Carvalho F., Bastos M.L., Guedes de Pinho P., Raising awareness of new psychoactive substances: chemical analysis and in vitro toxicity screening of "legal high" packages containing synthetic cathinones. *Arch. Toxicol*., 2015, *89*, 757-771.

[36] Araújo A. M., Bastos M.L., Fernandes E., Carvalho F., Carvalho M., Guedes de Pinho P., GC-MS metabolomics reveals disturbed metabolic pathways in primary mouse hepatocytes exposed to subtoxic levels of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Arch. Toxicol*., 2018, *92*, 3307-3323.

[37] Diestelmann M., Zangl A., Herrle I., Koch E., Graw M., L.D. Paul. MDPV in forensic routine cases: Psychotic and aggressive behavior in relation to plasma concentrations. *For. Sci. Int*., 2018, *283*, 72-84.

[38] Marinetti L.J., Antonides H.M., Analysis of Synthetic Cathinones Commonly Found in Bath Salts in Human Performance and Postmortem Toxicology: Method Development, Drug Distribution and Interpretation of Results. *J. Anal. Toxicol*., 2013, *37*, 135-146.

[39] Froberg B.A., Levine M., Beuhler M.C., Judge B.S., Moore P.W., Engebretsen K.M., Mckeown N.J., Rosenbaum C.D., Young A.C., Rusyniak D.E., Acute Methylenedioxypyrovalerone Toxicity. *J. Med. Toxicol*., 2015, *11(2)*, 185-194.

[40] Cawrse B.M., Levine B., Jufer R.A., Fowler D.R., Vorce S.P., Dickson A.J., Holler J.M., Distribution of methylone in four postmortem cases. *J. Anal. Toxicol*., 2012, *36(6)*, 434-439.

[41] Kraemer M., Boehmer A., Madea B., Maas A., Death cases involving certain new psychoactive substances: A review if the literature, *For. Sci. Int*. 2019, *298*, 186-267.

[42] Wojcieszak J., Andrzejczak D., Woldan-Tambor A., Zawilska J.B., Cytotoxic Activity of Pyrovalerone Derivatives, an Emerging Group of Psychostimulant Designer Cathinones. *Neurotox. Res*., 2016, *30*, 239-250.

[43] Wyman JF., Lavins E.S., Engelhart D., Armstrong E.J., Snell K.D., Boggs P.D., Taylor S.M., Norris R.N., Miller F.P., Postmortem Tissue Distribution of MDPV Following Lethal Intoxication by "Bath Salts", *J. Anal. Toxicol*. 2013, *37*, 182-185.

[44] Richter L.H.J., Beck A., Flockerzi V., Maurer H.H., Meyer M.R., Cytotoxic of new psychoactive substances and other drugs of abuse studied in human HepG2 cells using an adopted high content screening assay. *Toxicol. Letters*, 2019, *301*, 79-89.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONCLUSIONES

El consumo de drogas de abuso, incluidas las sustancias psicoactivas de reciente aparición en el mercado, representa un grave riesgo para la salud, por no mencionar el gran desafío que supone para el sistema de salud pública. Los informes facilitados por las Naciones Unidas y otras agencias mundiales, como el Observatorio Europeo de Drogas y Toxicomanías o la Administración de Control de Drogas de Estados Unidos, indican que la incidencia del abuso de drogas y la muerte por sobredosis de drogas ha aumentado rápidamente en los últimos años, alcanzando niveles epidémicos. Además, las nuevas drogas de abuso conllevan un desafío para los analistas y profesionales de la salud, debido a la falta de métodos de detección y cuantificación de estos compuestos para los análisis de rutina o el escaso conocimiento sobre la toxicidad de la mayoría de los nuevos compuestos. Por estos motivos, en esta Tesis se han desarrollado metodologías analíticas para el análisis de diferentes clases de drogas de abuso en muestras biológicas.

Las técnicas de preparación de muestra propuestas durante el desarrollo de esta memoria fueron rápidas, simples y fáciles de implementar en laboratorios de rutina. Se han empleado técnicas de microextracción, tales como: microextracción con adsorbentes empaquetados (MEPS), microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y *fabric phase sorptive extraction* (FPSE). Esto permitió disminuir el consumo de disolventes orgánicos, la cantidad de muestra, el tiempo de análisis y los costes, siguiendo las directrices de la Química Verde. El uso de herramientas quimiométricas, como los diseños experimentales para optimizar los procesos de extracción, ha contribuido a evaluar aquellos factores influyentes en dichos procesos con un mínimo número de experimentos, reduciendo también el coste y trabajo experimental del análisis.

Un aspecto importante en la investigación bioanalítica es la validación de los métodos analíticos desarrollados que permiten implementar las metodologías en diferentes laboratorios de análisis. Los parámetros de calidad de los métodos propuestos se evaluaron en términos de linealidad, precisión, exactitud, y límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs). En general, se han obtenido resultados satisfactorios en todos los casos. Además, se han obtenido LODs y LOQs aceptables, usando cromatografía líquida y/o de gases con diferentes detectores como red de diodos (DAD) y espectrometría de masas simple (MS) o en tándem (MS/MS), que proporcionan una mayor selectividad y sensibilidad.

En resumen, la investigación realizada en esta Tesis Doctoral, ha contribuido ampliamente al desarrollo y validación de nuevos métodos analíticos, basados en técnicas de microextracción y análisis cromatográfico para el análisis de diferentes familias de compuestos bioactivos y drogas de abuso en matrices biológicas.

Las conclusiones generales extraídas de cada capítulo de esta Tesis se presentan a continuación:

1. Determinación de antidepresivos.

- Se ha optimizado un método de preparación de muestra basado en MEPS para la extracción de seis antidepresivos (mirtazapina, venlafaxina, escitalopram, fluvoxamina, fluoxetina y sertralina) en muestras de orina. Las condiciones óptimas han permitido usar una cantidad de muestra mínima (300 µL de orina), así como de disolvente de elución (50 µL de metanol). Además, no se ha

necesitado de etapas previas a la extracción, como la hidrólisis o precipitación de proteínas, para tratar las muestras de orina.

- La separación y determinación de los ATD se han llevado a cabo mediante UHPLC-DAD. El uso de una columna con tamaño de partícula menor de 2 µm ha permitido llevar a cabo el análisis cromatográfico en un tiempo total de 2 minutos.
- Los parámetros de validación analítica fueron satisfactorios siguiendo las directrices de las guías de validación de métodos bioanalíticos.
- El método analítico demostró su utilidad en el análisis toxicológico de rutina, al ser aplicado muestras reales de orina procedentes de pacientes voluntarios bajo tratamiento con antidepresivos.

2. Determinación de benzodiacepinas.

- Se han desarrollado dos métodos de preparación de muestra, basados en MEPS para la extracción de benzodiacepinas de prescripción (BZD), y benzodicepinas de diseño (DBZD), junto con hipnóticos *Z*, en muestras de plasma. Las condiciones operacionales de extracción se estudiaron mediante diseño de experimentos, requiriendo una cantidad de muestra mínima (300 µL de plasma), y pH neutro (pH 6-7) en ambas metodologías.
- En el primer trabajo, se ha desarrollado un método de separación y determinación de siete BZD (bromazepam, alprazolam, lorazepam, clonazepam, lormetazepam, diazepam y tetrazepam) mediante UHPLC-DAD con un tiempo total de análisis cromatográfico menor de 5 minutos. En el segundo trabajo, se ha desarrollado un método de UHPLC-MS/MS para la determinación de cinco DBZD (nifoxipam, descloroetizolam, clonazolam, flubromazolam, meclonazepam) y tres hipnóticos *Z* (zopiclone, zolpidem y zaleplon). Ambos detectores (DAD y MS/MS) proporcionaron una alta sensibilidad y selectividad para los compuestos estudiados, consiguiendo unos LODs de ng/mL, en ambos casos.
- No se han publicado estudios previos utilizando MEPS-LC-MS/MS para extraer simultáneamente DBZD e hipnóticos *Z* en muestras forenses.

3. Determinación de drogas de abuso.

- Se ha propuesto un método basado en DLLME-UHPLC-PDA para la determinación de ocho drogas convencionales (morfina, 6-MAM, cocaína, BEG, cocaetileno, metadona, EDDP, buprenorfina) y seis catinonas sintéticas (metilona, etilcatinona, mefedrona, pentedrona, MDPV y pirovalerona) en muestras de humor vítreo.
- El método validado se ha aplicado al análisis de 11 muestras reales de humor vítreo, obteniéndose siete muestras positivas a alguna droga de abuso convencional.
- Es la primera vez que se aplica la DLLME a la extracción de catinonas sintéticas en humor vítreo, lo que supone un hito en el análisis de este tipo de muestra biológica, ya que se puede utilizar como alternativa a la sangre, cuando ésta no está disponible.
- Se ha desarrollado un método analítico basado en MEPS-UHPLC-MS/MS para la determinación de drogas de abuso convencionales que incluían opioides (morfina,

6-MAM, naloxona, buprenorfina, metadona, EDDP), cocaína y metabolitos (BEG, cocaetileno) y la droga recreativa escopolamina, en muestras de fluido oral (OF). Además, se incluyó once nuevas sustancias psicoactivas, pertenecientes al grupo de las catinonas sintéticas (metilona, flefedrona, etilcatinona, etilcatinona efedrina, etilona, metilefedrina, butilona, mefedrona, pentedrona, MDPV, pirovalerona).

- La técnica de MEPS proporciona una preparación de muestra rápida y respectuosa con el medio ambiente al usar volúmenes muy bajos de muestra y reactivos.
- El método validado satisfactoriamente, fue aplicado a 12 muestras de OF mostrando su efectividad en los análisis de muestras de individuos en programas de desintoxicación, y también para casos de sujetos potencialmente susceptibles al consumo de drogas en tráfico rodado.
- El método propuesto MEPS-UHPLC-MS/MS desarrollado permite la cuantificación de estos compuestos, relacionados estructuralmente con las anfetaminas, lo cual puede dar lugar a falsos positivos en dispositivos de cribado in-situ.

4. Determinación de fentanilos.

- Se ha propuesto un método de preparación de muestra, basado en FPSE para la extracción de fentanilo y seis análogos sintécticos en muestras de OF. Así mismo, se ha desarrollado un método de GC-MS para la separación y determinación de estos compuestos.
- Este trabajo es el primero en aplicar esta técnica de extracción para la determinación simultánea de este tipo de opioides en muestras biológicas. Debido a su similitud estructural entre ellos, los fentanilos pueden proporcionar falsos positivos en los métodos de cribado cualitativos, como los métodos de inmunoensayo o colorimétricos. La metodología propuesta utiliza la GC-MS, que permite la separación selectiva y cuantificación de este tipo de compuestos.
- Al igual que con las técnicas de microextracción, MEPS y DLLME, la técnica FPSE permite el uso de volúmenes muy bajos de muestra y disolventes, así como la reutilización de la membrana FSPE.

5. Preparación de nuevas fases de extracción.

- Se ha desarrollado un nuevo tipo de fase de extracción en soporte plano para la retención/liberación de compuestos bioactivos en disoluciones acuosas con diferente grado de salinidad. La fase se ha basado en un polímero biodegradable como el papel de celulosa, modificado químicamente con β-ciclodextrina.
- Se han estudiado la selectividad y la eficacia del papel funcionalizado frente al papel no funcionalizado con dos compuestos diferentes, diclofenaco y ciprofloxacino, mostrando diclofenaco la formación de complejos de inclusión selectiva.
- El protocolo final muestra que el papel funcionalizado puede captar una cantidad de 25 mg/g de diclofenaco en un tiempo relativamente corto (4h). Además, la liberación de diclofenaco de la β-ciclodextrina puede acelerarse mediante el uso

de ultrasonidos y la reutilización en los siguientes ciclos de adsorción/elución puede ampliar la vida útil del filtro funcionalizado.

- Este estudio representa un primer paso en la investigación de la capacidad de estas nuevas fases selectivas de microextracción en formato plano para el aislamiento de nuevas sustancias psicoactivas en muestras biológicas o para controlar su presencia en aguas residuales.

6. Citotoxicidad de catinonas en células renales humanas.

- La continua aparición de nuevas sustancias psicoactivas es todo un desafío para aportar datos sobre el conocimiento de su toxicidad. En este trabajo se ha iniciado un primer estudio sobre la toxicidad a nivel renal de dos catinonas sintéticas, metilona y MDPV. Para ello, se ha elegido como modelo celular, una línea de células renales humanas (Hk-2).
- El estudio revela que la viabilidad de las células Hk-2 disminuye de una manera dependiente de la concentración de las catinonas sintéticas. Además, MDPV resultó ser el compuesto con mayor potencial tóxico de las catinonas sintéticas estudiadas.
- Los datos obtenidos en este estudio preliminar están en concordancia con los encontrados en otros modelos celulares, como las células hepáticas humanas, y la posterior investigación en células renales (Hk-2); estableciendo el riñón como un órgano diana de la nefrotoxicidad de las catinonas sintéticas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CONCLUSIÓNS

O consumo de drogas de abuso, incluídas as substancias psicoactivas que apareceron recentemente no mercado, representa un grave risco para a saúde, sen esquecer o gran desafío que supón para o sistema público de saúde. Os informes proporcionados polas Nacións Unidas e outros organismos mundiais, como o Observatorio Europeo de Drogas e Drogodependencias ou a Administración de Control de Drogas dos Estados Unidos, indican que a incidencia do abuso de drogas e a morte por sobredose de drogas aumentou rapidamente nos últimos anos, alcanzando niveis epidémicos. Ademais, as novas drogas de abuso supoñen un desafío para analistas e profesionais da saúde, debido á falta de métodos de detección e cuantificación destes compostos para a análise rutineira ou ao escaso coñecemento sobre a toxicidade da maioría dos novos compostos. Por estas razóns, nesta Tese desenvolvéronse métodos analíticos para a análise de diferentes clases de drogas de abuso en mostras biolóxicas.

As técnicas de preparación de mostra propostas durante o desenvolvemento desta memoria foron rápidas, sinxelas e fáciles de implementar en laboratorios rutineiros. Utilizáronse técnicas de microextracción, tales como: microextracción con adsorbentes empaquetados (MEPS), microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) e *fabric phase sorptive extraction* (FPSE). Isto permitiu reducir o consumo de disolventes orgánicos, a cantidade de mostra, o tempo de análise e os custes, seguindo as directrices da Química Verde. O uso de ferramentas quimiométricas, como deseños experimentais para optimizar os procesos de extracción, contribuíu a avaliar os factores que inflúen nestes procesos cun número mínimo de experimentos, reducindo tamén o custe e o traballo experimental da análise.

Un aspecto importante na investigación bioanalítica é a validación dos métodos analíticos desenvolvidos que permiten a implementación das metodoloxías en diferentes laboratorios de análise. Os parámetros de calidade dos métodos propostos foron avaliados en termos de linealidade, precisión, exactitude, e límites de detección (LODs) e cuantificación (LOQs). En xeral, obtivéronse resultados satisfactorios en todos os casos. Ademais, obtivéronse LODs y LOQs aceptables, empregando cromatografía de líquidos e/ou gases con diferentes detectores como rede de díodos (DAD) e espectrometría de masas simple (MS) ou en tándem (MS/MS), que proporcionan unha maior selectividade e sensibilidade.

En resumo, a investigación realizada nesta Tese de Doutoramento contribuíu amplamente ao desenvolvemento e validación de novos métodos analíticos, baseados en técnicas de microextracción e análise cromatográfica para a análise de diferentes familias de compostos bioactivos e drogas de abuso en matrices biolóxicas.

As conclusións xerais extraídas de cada capítulo desta Tese preséntanse a continuación:

1. Determinación de antidepresivos.

- Optimizouse un método de preparación de mostra baseado en MEPS para a extracción de seis antidepresivos (mirtazapina, venlafaxina, escitalopram, fluvoxamina, fluoxetina e sertralina) a partir de mostras de urina. As condicións óptimas permitiron o uso dunha cantidade mínima de mostra (300 µL de urina), así como de disolvente de elución (50 µL de metanol). Ademais, non se

precisaron etapas de pre-extracción, como a hidrólise ou a precipitación de proteínas, para tratar las mostras de ouriños.

- A separación e determinación dos ATD realizáronse mediante UHPLC-DAD. O uso dunha columna cun tamaño de partícula inferior a 2 µm permitiu realizar a análise cromatográfica nun tempo total de 2 minutos.
- Os parámetros de validación analítica foron satisfactorios seguindo as pautas das guías de validación dos métodos bioanalíticos.
- O método analítico demostrou a súa utilidade na análise toxicolóxica de rutina, aplicando mostras de urina reais de pacientes voluntarios baixo tratamento con antidepresivos.

2. Determinación de benzodiacepinas.

- Desenvolvéronse dous métodos de preparación de mostra, baseados en MEPS para a extracción de benzodiacepinas prescritas (BZD), e benzodicepinas de deseño (DBZD), xunto con hipnóticos *Z*, en mostras de plasma. As condicións operacionais de extracción estudáronse mediante o deseño de experimentos, que requirían unha cantidade mínima de mostra (300 µL de plasma), e pH neutro (pH 6-7) en ambas metodoloxías.
- No primeiro traballo desenvolveuse un método de separación e determinación de sete BZD (bromazepam, alprazolam, lorazepam, clonazepam, lormetazepam, diazepam e tetrazepam) empregado UHPLC-DAD cun tempo total de análise cromatográfica inferior a 5 minutos. No segundo traballo, desenvolveuse un método UHPLC-MS/MS para a determinación de cinco DBZD (nifoxipam, descloroetizolam, clonazolam, flubromazolam, meclonazepam) e tres hipnóticos *Z* (zopiclone, zolpidem e zaleplon). Os dous detectores empregados (DAD e MS/MS) proporcionaron alta sensibilidade e selectividade para os compostos estudados, logrando LODs de ng/mL, nos dous casos.
- Non se publicaron estudos previos usando MEPS-LC-MS/MS para extraer simultaneamente DBZD e hipnóticos *Z* en mostras forenses.

3. Determinación de drogas de abuso.

- Propúxose un método baseado en DLLME-UHPLC-PDA para a determinación de oito drogas convencionais (morfina, 6-MAM, cocaína, BEG, cocaetileno, metadona, EDDP, buprenorfina) e seis catinonas sintéticas (metilona, etilcatinona, mefedrona, pentedrona, MDPV e pirovalerona) en mostras de humor vítreo.
- O método validado aplicouse á análise de 11 mostras reais de humor vítreo, obtendo sete mostras positivas dalgunha droga de abuso convencional.
- É a primeira vez que se aplica DLLME á extracción de catinonas sintéticas no humor vítreo, o que supón un fito na análise deste tipo de mostra biolóxica, xa que se pode usar como alternativa ao sangue, cando este non estea dispoñible.
- Desenvolveuse un método analítico baseado en MEPS-UHPLC-MS/MS para a determinación de drogas de abuso convencionais que incluían opioides (morfina, 6-MAM, naloxona, buprenorfina, metadona, EDDP), cocaína e metabolitos (BEG, cocaetileno) e a droga recreativa escopolamina, en mostras de fluído oral (OF). Ademais, incluíronse once novas substancias psicoactivas, pertencentes ao grupo

das catinonas sintéticas (metilona, flefedrona, etilcatinona, etilcatinona efedrina, etilona, metilefedrina, butilona, mefedrona, pentedrona, MDPV, pirovalerona).

- A técnica MEPS proporciona unha preparación de mostra rápida e respectuosa co medio ambiente, empregando volumes moi baixos de mostra e reactivos.
- Aplicouse o método validado satisfactoriamente a 12 mostras de OF que mostran a súa eficacia na análise de mostras de individuos en programas de desintoxicación, e tamén para casos de suxeitos potencialmente susceptibles ao consumo de drogas no tráfico rodado.
- O método MEPS-UHPLC-MS/MS desenvolvido permite a cuantificación destes compostos, estruturalmente relacionados con anfetaminas, que poden levar a falsos positivos en dispositivos de cribado in-situ.

4. Determinación de fentanilos.

- Propúxose un método de preparación de mostra, baseado en FPSE, para a extracción de fentanilo e seis análogos sintéticos en mostras de OF. Do mesmo xeito, desenvolveuse un método GC-MS para a separación e determinación destes compostos.
- Este traballo é o primeiro en aplicar esta técnica de extracción para a determinación simultánea deste tipo de opioides en mostras biolóxicas. Debido á súa similitude estrutural entre si, os fentanilos poden dar falsos positivos nos métodos de cribado cualitativos, como o inmunoensaio ou os métodos colorimétricos. A metodoloxía proposta utiliza GC-MS, que permite a separación cuantificación selectivas deste tipo de compostos.
- Como ocorre coas técnicas de microextracción, MEPS e DLLME, a técnica FPSE permite o uso de volumes moi baixos de mostra e disolventes, así como a reutilización da membrana FSPE.

5. Preparación de novas fases de extracción.

- Desenvolveuse un novo tipo de fase de extracción nun soporte plano para a retención/liberación de compostos bioactivos en disolucións acuosas con diferentes graos de salinidade. A fase baseouse nun polímero biodegradable como o papel de celulosa, modificado quimicamente con β-ciclodextrina.
- Estudáronse a selectividade e a eficacia do papel funcionalizado fronte ao papel non funcionalizado con dous compostos diferentes, diclofenaco e ciprofloxacino, mostrando o diclofenaco a formación de complexos de inclusión selectiva.
- O protocolo final mostra que o papel funcionalizado pode captar unha cantidade de 25 mg/g de diclofenaco nun tempo relativamente curto (4h). Ademais, a liberación de diclofenaco da β-ciclodextrina pódese acelerar mediante o uso de ultrasóns e a reutilización en ciclos posteriores de adsorción/elución pode prolongar a vida útil do filtro funcionalizado.
- Este estudo representa un primeiro paso na investigación da capacidade destas novas fases selectivas de microextracción en formato plano para o illamento de novas substancias psicoactivas en mostras biolóxicas ou para controlar a súa presenza nas augas residuais.

6. Citotoxicidade de catinonas en células renais humanas.

- A aparición continua de novas substancias psicoactivas é un desafío para proporcionar datos sobre o coñecemento da súa toxicidade. Neste traballo iniciouse un primeiro estudo sobre a toxicidade a nivel renal de dúas catinonas sintéticas, metilona e MDPV. Para iso, escolleuse como modelo celular unha liña de células do ril humano (Hk-2).
- O estudo revela que a viabilidade das células Hk-2 diminúe de xeito dependente da concentración das catinonas sintéticas. Ademais, MPDV resultou ser o composto con maior potencial tóxico das catinonas sintéticas probadas.
- Os datos obtidos neste estudo preliminar están de acordo cos atopados noutros modelos celulares, como as células hepáticas humanas, e a investigación posterior en células renais (Hk-2); establecendo o ril como órgano diana da nefrotoxicidade das catinonas sintéticas.

CONCLUSIONS

The use of drugs of abuse, including newly emerging psychoactive substances on the market, poses a serious health risk, not to mention the major challenge to the public health system. Reports provided by the United Nations and other global agencies, such as the European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction or the United States Drug Control Administration, indicate that the incidence of drug abuse and drug overdose death has increased rapidly in recent years, reaching epidemic levels. In addition, new abuse drugs pose a challenge to health analysts and professionals, because of the lack of methods for the detection and quantification of these compounds for routine analysis or the limited knowledge of the toxicity of most new compounds. For these reasons, in this thesis, analytical methodologies have been developed for the analysis of different classes of drugs of abuse in biological samples.

The sample preparation techniques proposed during the development of this dissertation were quick, simple, and easy to implement in routine laboratories. Microextraction techniques have been used, such as microextraction by packed sorbent (MEPS), dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), and fabric phase sorptive extraction (FPSE). This allowed reducing the consumption of organic solvents, the amount of sample, the time of analysis, and costs, following the guidelines of Green Chemistry. The use of chemometric tools, such as experimental designs to optimize extraction processes, has helped to assess those influencing factors in such processes with a minimum number of experiments, also reducing the cost and experimental work of the analysis.

An important aspect of bioanalytical research is the validation of the analytical methods developed to implement the methodologies in different analytical laboratories. The quality parameters of the proposed methods were evaluated in terms of linearity, precision, accuracy, and limits of detection (LODs) and quantification (LOQs). In general, satisfactory results have been achieved in all cases. In addition, acceptable LODs and LOQs have been obtained, using liquid and/or gas chromatography with different detectors such as diode array (DAD) and simple mass spectrometry (MS) or tandem (MS / MS), which provide greater selectivity and sensitivity.

In summary, the research carried out in this Doctoral Thesis has contributed extensively to the development and validation of new analytical methods, based on microextraction techniques and chromatographic analysis for the analysis of different families of bioactive compounds and drugs of abuse in biological matrices.

The general conclusions drawn from each chapter of this Doctoral Thesis are presented below:

1. Determination of antidepressants.

- A MEPS-based sample preparation method has been optimized for the extraction of six antidepressants (mirtazapine, venlafaxine, escitalopram, fluvoxamine, fluoxetine, and sertraline) in urine samples. Optimal conditions have allowed the use of a minimum amount of sample (300 µL of urine), as well as of elution solvent (50 µL of methanol). In addition, no pre-extraction steps, such as hydrolysis or protein precipitation, have been required to treat urine samples.

- The separation and determination of ATD have been carried out by UHPLC-DAD. The use of a column with a particle size smaller than 2 μm has allowed to carry out chromatographic analysis in a total time of 2 minutes.
- The analytical validation parameters were satisfactory following the guidelines of the validation for bioanalytical methods.
- The analytical method demonstrated its usefulness in the routine toxicological analysis when applied real urine samples from voluntary patients under treatment with antidepressants.

2. Determination of benzodiazepines.

- Two sample preparation procedures have been developed, based on MEPS for prescription benzodiazepines (BZD) extraction, and designer benzodiazepines (DBZD), along with Z-hypnotics, in plasma samples. Operational extraction conditions were studied by experimental design, requiring a minimum sample amount (300 μL plasma), and neutral pH (pH 6-7) in both methodologies.
- In the first study, a method of separation and determination of seven BZD (bromazepam, alprazolam, lorazepam, clonazepam, lormetazepam, diazepam, and tetrazepam) was developed using UHPLC-DAD with a total chromatographic analysis time of less than 5 minutes. In the second work, a UHPLC-MS/MS method has been developed for the determination of five DBZD (nifoxipam, deschloroetizolam, clonazolam, flubromazolam, meclonazepam) and three Z-hypnotics (zopiclone, zolpidem, and zaleplon). Both detectors (DAD and MS/MS) provided high sensitivity and selectivity for the compounds studied, achieving LODs of ng/mL, in both cases.
- No previous studies using MEPS-LC-MS/MS to simultaneously extract DBZD and Z-hypnotics in forensic samples have been published.

3. Determination of drugs of abuse.

- A method based on DLLME-UHPLC-PDA has been proposed for the determination of eight conventional drugs (morphine, 6-MAM, cocaine, BEG, cocaethylene, methadone, EDDP, buprenorphine) and six synthetic cathinones (methylone, ethylcathinone, mephedrone, pentedrone, MDPV, and pyrovalerone) in samples of vitreous humor.
- The validated procedure has been applied to the analysis of 11 real samples of vitreous humor, obtaining seven positive samples to some conventional drug of abuse.
- It is the first time that DLLME is applied to the extraction of synthetic cathinones in vitreous humor, which is a milestone in the analysis of this type of biological sample since it can be used as an alternative to blood when it is not available.
- An analytical method based on MEPS-UHPLC-MS/MS has been developed for the determination of conventional abuse drugs that included opioids (morphine, 6-MAM, naloxone, buprenorphine, methadone, EDDP), cocaine and metabolites (BEG, cocaethylene), and the recreational drug scopolamine, in samples of oral fluid (OF). In addition, eleven new psychoactive substances belonging to the group of synthetic cathinones (methylone, flephedrone, ethylcathinone,

ethylcathinone, ephedrine, ethylone, methylephedrine, butylone, mephedrone, pentedrone, MDPV, pyrovalerone) were included.

- The MEPS technique provides fast and environmentally friendly sample preparation by using very low sample volumes and reagents.
- The validated procedure was applied to 12 OF samples showing its effectiveness in the analysis of samples from individuals in detoxification programs, and also for cases of subjects potentially susceptible to drug use in road traffic.
- The proposed MEPS-UHPLC-MS/MS method developed allows the quantification of these compounds, structurally related to amphetamines, which can lead to false positives in in-situ screening devices.

4. Determination of fentanyls.

- A sample preparation method based on FPSE has been proposed for the extraction of fentanyl and six syntactic analogs in OF samples. A GC-MS method has also been developed for the separation and determination of these compounds.
- This work is the first to apply this extraction technique for the simultaneous determination of this type of opioid in biological samples. Due to their structural similarity, fentanyls can provide false positives in qualitative screening methods, such as immunoassay or colorimetric methods. The proposed methodology uses GC-MS, which allows the selective separation and quantification of this type of compound.
- As with MEPS and DLLME techniques, the FPSE technique allows the use of very low sample volumes and solvents, as well as the reuse of the FSPE membrane.

5. Preparation of new extraction phases.

- A new type of flat support has been developed as extraction media for the retention/release of bioactive compounds in aqueous solutions with different salinity levels. The phase has been based on a biodegradable polymer such as cellulose paper, chemically modified with β-cyclodextrin.
- The selectivity and effectiveness of the functionalized paper versus the non-functionalized paper with two different compounds, diclofenac and ciprofloxacin, have been studied, showing diclofenac formation of selective inclusion complexes.
- The final protocol shows that the functionalized paper can capture an amount of 25 mg/g of diclofenac in a relatively short time (4h). In addition, the release of diclofenac from β-cyclodextrin can be accelerated by the use of ultrasound, and reuse in subsequent adsorption/elution cycles can extend the lifetime of the functionalized filter.
- This mentioned research represents a first step in the investigation of the capacity of these new selective phases of microextraction in flat support for the isolation of new psychoactive substances in biological samples or to control their presence in wastewater.

6. Cytotoxicity of cathinones in human renal cells.

- The continued emergence of new psychoactive substances is a challenge to provide data on the knowledge of their toxicity. A first study on the renal toxicity of two synthetic cathinones, methylone, and MDPV, has been initiated in this study. For this, a line of human renal cells (Hk-2) has been chosen as a cell model.
- The study reveals that the viability of Hk-2 cells decreases in a concentration-dependent manner of synthetic cathinones. In addition, MDPV was found to be the most cytotoxic compound of the synthetic cathinones studied.
- These preliminary scientific tests are consistent with those found in other cell models, such as human liver cells, and subsequent research in renal cells (Hk-2); establishing the kidney as a target organ for nephrotoxicity of synthetic cathinones.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



ANEXOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es

galicia

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Juan Manuel Vázquez Lago, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 20/10/2015 el estudio:

Título: Técnicas de microextracción aplicadas al control de drogas emergentes en seguridad vial
Promotor: Rosa Antonia Lorenzo Ferreira
Tipo de estudio: Outros
Código de Registro: 2015/488

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humana, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Postautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, y la Circular nº 07/2004, de investigaciones clínicas con productos sanitarios.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos da Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para la realización del estudio **por la investigadora del centro:**

Centros	Investigadores Principales
Universidad de Santiago de Compostela	Rosa Antonia Lorenzo Ferreira

En Santiago de Compostela, a 21 de octubre de 2015
El secretario

NOMBRE VAZQUEZ LAGO JUAN MANUEL - NIF 44829259M

Juan M. Vázquez Lago

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es

galicia

DITAME DO COMITÉ DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Carlos Rodríguez Moreno, presidente do Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo

CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 9/15/2016 o estudo:

Título: Métodos miniaturizados para la cuantificación de Nuevas Sustancias Psicoacivas (NSP) en fluidos biológicos
Promotor: Rosa Antonia Lorenzo Ferreira
Tipo de estudo: Outros
Versión: v2
Código do Promotor:
Código de Rexistro: 2016/335

E, tomando en consideración as seguintes cuestións:

- A pertinencia do estudo, tendo en conta o coñecemento dispoñible, así coma os requisitos legais aplicables, e en particular a Lei 14/2007, de investigación biomédica, o Real Decreto 1716/2011, de 18 de novembro, polo que se establecen os requisitos básicos de autorización e funcionamento dos biobancos con fins de investigación biomédica e do tratamento das mostras biolóxicas de orixe humana, e se regula o funcionamento e organización do Rexistro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, a ORDE SAS/3470/2009, de 16 de decembro, pola que se publican as Directrices sobre estudos Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, e o RD 1090/2015, de 4 de decembro, polo que se regulan os ensaios clínicos con medicamentos, os Comités de Ética da Investigación con medicamentos e Rexistro Español de Estudos Clínicos
- A idoneidade do protocolo en relación cos obxectivos do estudo, xustificación dos riscos e molestias previsibles para o suxeito, así coma os beneficios esperados.
- Os principios éticos da Declaración de Helsinki vixente.
- Os Procedementos Normalizados de Traballo do Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para a realización do estudo **polo/a investigador/a do centro**:

Centros	Investigadores Principais
Universidad de Santiago de Compostela (Facultad de Químicas)	Rosa Antonia Lorenzo Ferreira

En Santiago de Compostela, a
O presidente

XUNTA DE GALICIA SECRETARÍA XERAL TÉCNICA COMITÉS DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN CONSELLERÍA DE SANIDADE

Firmado digitalmente por: RODRIGUEZ MORENO CARLOS - 05614327G
ND: CN = RODRIGUEZ MORENO CARLOS - 05614327G C = ES
Fecha: 2016.09.16 09:58:22 +02'00'

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

SERVIZO GALEGO de SAÚDE | Xerencia do Servizo Galego de Saúde

galicia

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Ana Estany Gestal, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 19 de enero de 2021 el estudio:

Título: Investigación de nuevas sustancias psicoactivas (NSP) en fluidos biológicos
Versión: 2.0
Promotor/a: Antonia María Carro Díaz
Código de Registro: 2020/547

Y que este Comité, tomando en consideración la pertinencia del estudio, el conocimiento disponible, los requisitos legales aplicables y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité, emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del citado estudio.

Documento asinado dixitalmente por:
Ana Estany Gestal (27/01/2021 14:06)
https://sede.xunta.gal/cve?idcve=SAOC-J4C4-8OAH-OF4O-TEQS-YPJR-Q97L-4161-1752-8087-86

NOTA: Se le recuerda que en el caso de que en este estudio se recluten pacientes, el equipo investigador debe tener disponible el Documento de Consentimiento Informado (Hojas de Información y Hojas de Firma) tanto en *galego* como en castellano en el momento de comenzar el reclutamiento.

Xacobeo 2021

RELACIÓN DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS:

- Ana M. Ares-Fuentes, R.A. Lorenzo, P. Fernández, A.M. Carro, An analytical strategy for designer benzodiacepines and Z-hypnotics determination in plasma samples using ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry after microextraction by packed sorbent, *J. Pharma. Biomed. Anal.* 2021, *194*, 1 13779. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113779.

- Ana M. Ares Fuentes, Purificación Fernández, Ana M. Fernández, Antonia M. Carro, Rosa A. Lorenzo, Microextraction by packed sorbent followed by ultra high performance liquid chromaotgraphy for the fast extraction and determination of six antidepressants in urine, *J. Sep. Sci.* 2019, *42*, 2053-2061. DOI: 10.1002/jssc.201900060.

- Ana M. Ares, Raquel Muiño, Alejandro Costoya, Rosa A. Lorenzo, Angel Concheiro, Antonia M. Carro, Carmen Alvarez-Lorenzo, Cyclodextrinfunctionalized cellulose filter paper for selective capture of diclofenac, *Carbohydrate Polymers*. 2019, *220*, 43-52. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.05.055.

- Ana M. Ares, P. Fernández, M. Regenjo, A.M. Fernández, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, A fast bioanalytical method based on microextraction by packed sorbent and UPLC-MS/MS for determining new psychoactive substances in oral fluid, *Talanta* 2017, *174*, 454-461. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.06.022.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 194 (2021) 113779

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba

An analytical strategy for designer benzodiazepines and Z-hypnotics determination in plasma samples using ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry after microextraction by packed sorbent

A.M. Ares-Fuentes[a], R.A. Lorenzo[a], P. Fernández[b], A.M. Carro[a,*]

[a] Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry and Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain
[b] Institute of Forensic Sciences, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 July 2020
Received in revised form 15 October 2020
Accepted 15 November 2020
Available online 21 November 2020

Keywords:
Designer benzodiazepine
Microextraction by packed sorbent
Plasma
Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry
Z- hypnotic

ABSTRACT

The illicit market for new psychoactive substances (NPS) is continuously growing. Designer benzodiazepines (DBZD) and Z-hypnotics are increasingly being used for self-medication or recreational purposes. The limited regulation and little biological information available about NPS have raised the need for analytical methods capable of extracting and quantifying them in human biological fluids. In this work, a procedure based on microextraction by packed sorbent (MEPS) in combination with ultra-high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) has been developed to determine the designer benzodiazepines (clonazolam, deschloroetizolam, nifoxipam, flubromazolam and meclonazepam), and the Z-hypnotics (zolpidem, zaleplon and zopiclone) in plasma. A $3^3 4^2$//16 asymmetric screening design was used to study extraction variables such as the type and volume of eluent, pH, number of extraction cycles, volume of washing solvent and type of sorbent. The ensuing analytical method was validated in terms of linearity by standard addition calibration curves at eight different analyte concentration levels from 0.5–500 ng mL^{-1}. R^2 values, limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) fell in the ranges 0.9900–0.9988, 0.5–5 ng mL^{-1} and 1–10 ng mL^{-1}. Intra and interday precision expressed as relative standard deviations, were < 10.6 % and process efficiency ranged from 63 to 117 % for the quality control samples. The proposed method detected zolpidem and various other benzodiazepines in plasma samples from overdoses cases.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

According to the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) [1], the use of a subclass of new psychoactive substances (NPS) known as “designer benzodiazepines” (DBZD) has grown steadily in recent years with the advent of open online sales [1–3] (see reference 1 in Supplementary material). EMCDDA currently monitors 28 new BZD, in 2017, close to 3500 seizures of new benzodiazepines were reported to the European Union [1]. More than half a million tablets containing new benzodiazepines (BZD) such as diclazepam, etizolam, flubromazolam, flunitrazolam and fonazepam were seized in 2016 —almost two-thirds the amount reported in 2015 [2]. Also, some DBZD (e.g., clonazolam, meclonazepam, flubromazolam, deschloroetizolam, nifoxipam) have been monitored in the framework of the STRIDA project to obtain information about NPS-related poisoning [4].

Z-drugs (zolpidem, zaleplon and zopiclone) were developed as alternatives to BZD; although they are structurally different, their mechanism of action is similar to that of BZD and involves boosting the action of the neurotransmitter GABA (see reference 2 in Supplementary material). Z-drugs, also known as “Z-hypnotics”, are typically used to treat insomnia with reduced anxiolytic and anticonvulsant effects. Consumption of Z-hypnotics is on the increase worldwide, with zolpidem as the most widely ingested Z-drug in the world. These compounds are found in combination with other types of drugs of abuse or medical drugs in many cases of poisoning [5] (see references 1 and 3 in Supplementary material). Their long-term, recurrent use can lead to physical and psychological dependence.

* Corresponding author at: Dep. Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química. Avda de las Ciencias S/N, Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), 15782 Santiago de Compostela, Spain.
E-mail address: tuchi.carro@usc.es (A.M. Carro).

https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113779
0731-7085/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

The emergence of DBZD on the market, the combined use with synthetic cannabinoids or opioids, and the increasing self-medication with tranquillizers and sedatives, has raised the need for effective methods for their determination and confirmation (see reference 1 in Supplementary material). Due to the lack of knowledge on pharmacokinetics properties, metabolism, and detectability of these NPS, sensitive methods are developed for drug use monitoring, such as liquid chromatography-mass spectrometry. Thus, liquid chromatography–mass spectrometry methods for determining DBZD and related compounds in biological samples [6–15] currently outnumber their gas chromatography–mass spectrometry counterparts [16–18]. Thus, different metabolism studies for the detection of DBZD and characterization and identification metabolites were developed by LC–MS/MS. El Balkhi *et al.* [9] had developed a method to characterize and identify metabolites of eight DBZD by UHPLC-MS/MS. Meyer *et al.* [10] identified the main metabolites of clonazolam, meclonazepam, and nifoxipam in urine samples by nano-LC–MS. LC-HRMS was used to carried out a comprehensive metabolism study for flubromazolam in liver cells and confirmation in human urine samples (see reference 4 in Supplementary material). Some DBZD have been detected in blood and urine using immunochemical screening assays, but these methods need confirmation by chromatographic-mass spectrometry techniques (see reference 5 in Supplementary material). Furthermore, using an appropriate sample preparation technique is essential to efficiently extract the wide range of DBZD that may be encountered in different biological and non-biological matrices. The most commonly used techniques for this purpose are liquid–liquid extraction (LLE) [6–8,19] (see references 6 and 7 in Supplementary material) and solid-phase extraction (SPE) [9,16,20,21] (see reference 8 in Supplementary material). Recently, a new trend has emerged to prepare samples in accordance with the principles of Green Chemistry (see reference 9 in Supplementary material) that has led to the miniaturization and automation of existing extraction procedures [22]. Thus, microextraction by packed sorbent (MEPS), which is the miniaturized version of SPE, was developed by Abdel-Rehim *et al.* in 2004 [22]. This technique follows the same principles as SPE but uses smaller amounts of sample and solvent, thereby resulting in faster, more economical extraction. In addition, the sorbent phase can be reused in successive extractions. The MEPS technique has been used to extract a variety of compounds from various matrices [23,24] including drugs of abuse in plasma [25] and oral fluid [26]; benzodiazepines in alcoholic beverages; antidepressants in plasma and urine; amphetamines in urine, and anti-inflammatory drugs and fluoroquinolones in human plasma and urine (see references 10 to 15 in Supplementary material).

The identification and quantification of DBZD and Z- hypnotics is an important task in the field of clinical and forensic toxicology due to its presence in the recreational drug market. The aim of this work was to develop a fast, sensitive, selective method using MEPS and ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) for the simultaneous determination of five DBZD (clonazolam, deschloroetizolam, nifoxipam, flubromazolam and meclonazepam) and three Z-hypnotics (zolpidem, zaleplon and zopiclone) in plasma samples. These compounds were selected from the numerous NPS to verify the proposed methodology and as to our knowledge, no previous studies have been reported using MEPS to extract DBZD and Z-hypnotics in forensic samples with a polymeric sorbent.

2. Experimental

2.1. Standards and reagents

The DBZD clonazolam, nifoxipam, flubromazolam, deschloroetizolam and meclonazepam were purchased from Chiron AS (Stiklestadveien, Trondheim, Norway), while the Z-hypnotics zolpidem, zopiclone and zaleplon, and the internal standard (IS) zolpidem-d6, were obtained from Cerillant (Round Rock, TX, USA). All were supplied as solutions containing a 1 mg mL^{-1} concentration of the compound concerned (100 μg mL^{-1} for the IS) in methanol (MeOH) or acetonitrile (ACN). The structures and properties of these compounds are shown in Table 1. MeOH, ACN, methylene chloride (DCM), 2-propanol (IPA), formic acid, acetic acid, potassium dihydrogen phosphate and ammonium hydroxide were all purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All solvents were LC–MS grade and ultrapure water was obtained from a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA).

Analytes were extracted by using an eVol® XR digital analytical syringe (100 μL) packed with three different sorbent materials from SGE Analytical Science (SGE Europe, Ltd., Chester, UK), namely: a mix-mode sorbent consisting of 80 % C8 phase and 20 % strong cation exchanger (SCX); C8, octyl-silica and C18, octadecyl-silica; and the polymeric material HyperSep Retain PEP from Thermo Fisher™ Scientific (Waltham, MA, USA). A Minicen centrifuge from Orto Alresa (Ajavir, Madrid, Spain) was also used.

2.2. Stock solution, QC and calibration and samples

Individual standard solutions of the target compounds, except IS, were prepared at a 100 μg mL^{-1} concentration by appropriate dilution of the stock solutions in MeOH. Mixed intermediate solutions containing all compounds at a 10 μg mL^{-1} or 1 μg mL^{-1} concentration, were also prepared and supplied with an IS concentration of 50 ng mL^{-1}. All solutions were stored refrigerated at −20 °C and used to construct calibration curves and validate the method. Quality control (QC) samples of low (10 ng mL^{-1}), medium (100 ng mL^{-1}) or high concentration (250 ng mL^{-1}), and calibration samples (0.5, 1, 10, 25, 50, 100, 250 and 500 ng mL^{-1}), were prepared independently in blank plasma. Spiked plasma samples were prepared from the mixed standard solutions by appropriate dilution to obtain the final concentration required in each case.

2.3. Sample collection

Pooled blank plasma was obtained from the Galician Transfusion Centre (Santiago de Compostela, Spain) and used for validation.

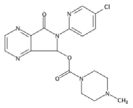
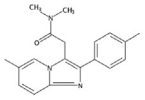
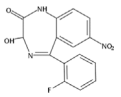
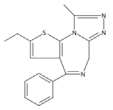
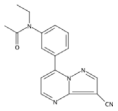
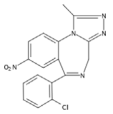
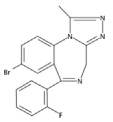
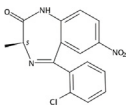
Real samples were obtained from overdose cases involving poisoning with various drugs of abuse and stored at −18 °C. Whole blood samples required centrifugation to isolate the plasma fraction for analysis. All tests were performed in compliance with the principles of the Helsinki Declaration. The plasma samples were collected in agreement with the evaluation criteria and the subsequent authorization established by the Committee on Research Ethics of Galicia (Spain) (see references 16 and 17 in Supplementary material).

2.4. Sample preparation by MEPS

Proteins and other potential interferents were removed by adding 200 μL of MeOH to 300 μL of homogenized plasma, placing the mixture in an Eppendorf® tube (1.5 mL) and vortexing for 20 s. The volume ratio between the sample and MeOH was adopted to complete deproteinization and, at the same time, the volumes were suitable to the miniaturized MEPS technique, helping to prolong the life of the cartridges used. The mixture was centrifuged at 15.596 *g* for 5 min, after which 300 μL of supernatant was collected and diluted with 200 μL of phosphate buffer (50 mM, pH 6). Then, the tubes were vortexed for 20 s and centrifuged at 15.596 *g* for 5 min to prevent occlusion of interferents in the sorbent phase.

An eVol® XR digital analytical syringe (100 μL) equipped with a barrel insert and needle (BIN) was packed with 4 mg of poly-

Table 1
Physical-chemical properties of the target analytes.

Compound	CAS number	Molecular formula	Molecular weight	pK_a(25 °C)*	log K_{ow} (25 °C)*	Chemical structure
Zopiclone	43200–80-2	$C_{17}H_{17}ClN_6O_3$	388.81	6.70 ± 0.10	2.713 ± 0.847	
Zolpidem	82626–48-0	$C_{19}H_{21}N_3O$	307.39	6.77 ± 0.50	3.089 ± 0.594	
Nifoxipam	74723–10-7	$C_{15}H_{10}FN_3O_4$	315.26	10.38 ± 0.70	1.616 ± 0.882	
Deschloroetizolam	40054–73-7	$C_{17}H_{16}N_4S$	308.40	2.45 ± 0.40	2.033 ± 1.420	
Zaleplon	151319–34-5	$C_{17}H_{15}N_5O$	305.33	−1.47 ± 0.50	1.403 ± 0.869	
Clonazolam	33887–02-4	$C_{17}H_{12}ClN_5O_2$	353.76	1.88 ± 0.40	0.927 ± 1.323	
Flubromazolam	612526–40-6	$C_{17}H_{12}BrFN_4$	371.21	2.27 ± 0.40	1.682 ± 1.130	
Meclonazepam	58662–84-3	$C_{16}H_{12}ClN_3O_3$	329.74	11.24 ± 0.70	3.057 ± 0.881	

* Predicted property from SciFinder® database (CAS).

meric sorbent for MEPS. The sorbent was conditioned with 100 μL of MeOH, followed by 100 μL of ultrapure water. Then, an aliquot of 100 μL of sample was loaded by using a solution flow in two directions (upstream to aspirate the sample and downstream to dispense it in the same vial) eight times in order to increase retention of the analytes in the sorbent material. The sorbent was then washed with 150 μL of a mixture of water-MeOH (97.5:2.5, v:v) to remove potential interferents retained in the phase without eluting the analytes. Next, the sorbent phase was dried for 0.5 min by aspirating and dispensing 100 μL of air three times and the analytes were eluted with 100 μL of a (78:20:2, v/v/v) DCM-IPA-NH_4OH mixture twice. Then, the eluate was evaporated under a nitrogen stream at 40 °C and reconstituted with 50 μL of mobile phase, a volume of 5 μL of reconstituted extract being injected into the UHPLC–MS/MS system for analysis.

The sorbent material was washed 3 times with 100 μL of IPA-MeOH (90:10, v:v), another 3 with 100 μL of water-MeOH (95:5, v:v), and another 4 each with 100 μL of ultrapure water, 100 μL of 0.1 % formic acid and 100 μL of MeOH. Washing the sorbent avoided memory effects and facilitated reuse of the extraction cartridge.

2.5. UHPLC–MS/MS determination

Plasma samples were analysed by UHPLC–MS/MS. Chromatographic separation was done in a Waters® UPLC H-Class System equipped with a Quaternary Solvent Manager (QSM) and an ACQUITY UPLC™ BEH Shield RP18 column (2.1 × 100 mm, 1.7 μm particle size). Analyses were performed at 55 °C, using a flow rate of 0.4 mL min^{-1}. The binary mobile phase used consisted of water (A) and ACN (B), both containing 0.1 % formic acid. The gradient elution programme was set as follows: 0–3.5 min, 10–70 %B. The composition of the eluent was returned to the initial conditions, so the overall running time was 5 min. The autosampler compartment temperature was set at 10 °C and the injected volume was 5 μL.

A Xevo TQD mass spectrometer from Waters (Milford, MA, USA) equipped with an electro-spray ionization source (ESI) operating in the positive ion mode was used under the following, optimum conditions: capillary voltage, 0.6 kV; ion source temperature, 120 °C; nebulizer (N_2) flow rate, 50 L h^{-1}; and drying gas (N_2) flow rate and temperature, 1100 L h^{-1} and 500 °C, respectively. All MS/MS parameters were optimized by infusing a 1 μg mL^{-1} concentration of each individual standard in MeOH at a flow rate of 20 μL min^{-1}. The other MS parameters were optimized automatically and are summarized in Table 2. Data were acquired by using the software MassLynx™. The MS detector was operated in the multiple reaction monitoring (MRM) mode for all analytes. The chromatograms for the analytes are shown in Fig. 1. The identification criteria used were the retention times of the compounds and the ratio to the strongest quantifier and second strongest qualifier transition ion (Table 2).

Table 2
UPLC-MS/MS parameters for the analytes studied.

Analyte	Rt (min)	CV (V)	Quantifier transition (*m/z*)	RCE% (V)	Qualifier transitions (*m/z*)	RCE% (V)	Ion ratio
Zopiclone	1.70	18	389.01 > 244.4	14	**389.01 > 111.83**	56	1.2
Zolpidem	2.21	54	308.07 > 235.12	34	**308.07 > 91.99**	52	5.0
Nifoxipam	3.24	34	316.10 > 224.02	28	**316.10 > 213.02**	38	3.0
Deschloroetizolam	3.41	46	309.14 > 255.09	22	**309.14 > 280.16**	22	5.0
Zaleplon	3.45	44	306.03 > 236.00	26	**306.03 > 264.11**	22	5.0
Clonazolam	3.47	50	354.10 > 102.92	46	**354.10 > 280.07**	36	1.7
Flubromazolam	3.66	52	371.05 > 223.02	26	**371.05 > 292.10**	44	1.3
Meclonazepam	4.01	48	330.09 > 214.01	38	**330.09 > 238.27**	40	3.5
Zolpidem-d6	2.21	26	314.18 > 235.19	36	**314.18 > 92.05**	52	5.0

RT: retention time; RCE: relative collision energy; CV: cone voltage.
Ion ratio: quantifier transition / the first qualifier transition (in bold), maximum tolerance: ±.30 %.

2.6. Validation of the proposed method

Validating an analytical method is an important requirement to ensure that it can be used for the reliable determination of the target analytes (see references 18 and 19 in Supplementary material). The proposed, optimized method was validated by following international guidelines [27,28] for linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), recovery, precision and resistance to matrix effects. The linearity of the method was assessed by triplicate analysis of drug-free plasma samples spiked with eight different concentrations from LOQ to 500 ng mL^{-1} of solutions prepared by diluting the mixed solutions. Calibration curves were constructed using the method of standard additions and subjected to linear least-squares regression to calculate the response ratio between the areas for each analyte and IS (50 ng mL^{-1}). LOD and LOQ were taken to be the lowest concentrations resulting in a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively. These parameters were obtained by using fortified drug-free plasma samples containing the analytes at concentrations close to or below the expected values. Precision was assessed using quality control (QC) plasma samples spiked at three different concentration levels (10, 100 and 250 ng mL^{-1}). All QC samples were analysed on the same day (intraday precision) or on different days (interday precision), using 3 and 5 replicates, respectively, per concentration level, as the relative standard deviation (RSD).

Whether analyte ionization is enhanced or suppressed is one of the most complex questions to answer in LC–MS. Analyte recovery is a measure of the extent to which an analyte is extracted from a sample. So-called "process efficiency" (PE) includes the influence of matrix effects and recovery (i.e., potential analyte losses during sample preparation and through ionization suppression or enhancement in the ion source). Matrix effects (ME), extraction efficiency (as relative recovery, RR) and process efficiency (PE) were estimated according to Matuszewski *et al.* and Kruve *et al.* (see references 20 and 21 in Supplementary material). The process involved using peak areas for three different sample sets. Thus, the analyte-to-IS peak area ratio for each compound was calculated by using a set of standard solutions in mobile phase (Set A). Then, the area ratio between each standard and the IS (spiked after extraction of blank plasma) was established by using matrix standards (plasma samples fortified with analytes and internal standards after extraction, Set B). Finally, Set C (plasma samples fortified with standard solutions and IS before extraction) was used to compare the peak areas between each analyte and the IS (spiked before the extraction).

$$ME(\%) = B/A \times 100$$

$$PE(\%) = C/A \times 100$$

$$RR(\%) = C/B \times 100$$

RR, ME and PE were obtained by using two QC plasma samples spiked with the target analytes at 10, and 250 ng mL^{-1} in six replicates per level. Matrix effect (ME) values below 80 % typically indicate suppressed ionization, whereas values above 120 % indicate enhanced ionization.

3. Results and discussion

3.1. MEPS conditions

The main variables influencing the efficiency of the MEPS process are the sorbent type, eluent and its volume, the volume of washing solution, the number of extraction cycles, and the pH of the sample [24] (see references 22 and 23 in Supplementary material). In most of the published methods where MEPS was applied to biological samples of toxicological interest, the most used sorbents were C18 and the mixed-mode C8/SCX phases [29]. Basing in previous MEPS applications, the mixed-mode C8/SCX phase provided the best results for cathinones and other psychoactive substances in oral fluid [26], opiates in blood samples or amphetamines in urine (see references 10 and 14 in Supplementary material). In the present work, mixed-mode C8/SCX and polymeric phase (polystyrene DVB material modified with urea functional groups) were used initially to identify the most suitable eluent as they have a greater probability of success in the extraction of the target compounds. Preliminary tests with various washing solvents were performed for this purpose (results not shown) and water containing a 2.5 % proportion of MeOH was found to be the best choice for avoiding chromatographic interferences. Then, an experimental design based on an efficient multivariate approach for planning experiments was carried out to study the variables that can influence the MEPS, including several sorbents.

3.1.1. Elution solvent

The elution solvent should be able to efficiently elute the analytes retained in the sorbent phase as the sample is passed through the sorbent bed in the loading step. Six solvent mixtures were used to identify the most suitable eluent for polymeric and mix mode C8/SCX sorbent phases. All MEPS tests were conducted in triplicate, using plasma samples spiked with the analytes at a 500 ng mL^{-1} concentration and IS at 100 ng mL^{-1}. As in previous work [26] (see reference 10 in Supplementary material), MeOH, 10 % ammonia + 90 % of ACN/MeOH (1:1, v:v), ACN/NH_4OH (96:4, v:v), the mobile phase under the initial gradient conditions (0.1 % formic acid in water/0.1 % formic acid in ACN, 90:10, v:v) and DCM/IPA/NH_4OH (78:20:2, v:v:v) were evaluated. The results showed the highest extraction efficiency with the three-phase solvent system for both sorbent phases, probably because combining two organic solvents and a small proportion of a basic solution facilitated extraction of the analytes from the sample matrix. The best results achieved with DCM/IPA/NH_4OH (78:20:2, v:v:v) mixture for the polymeric

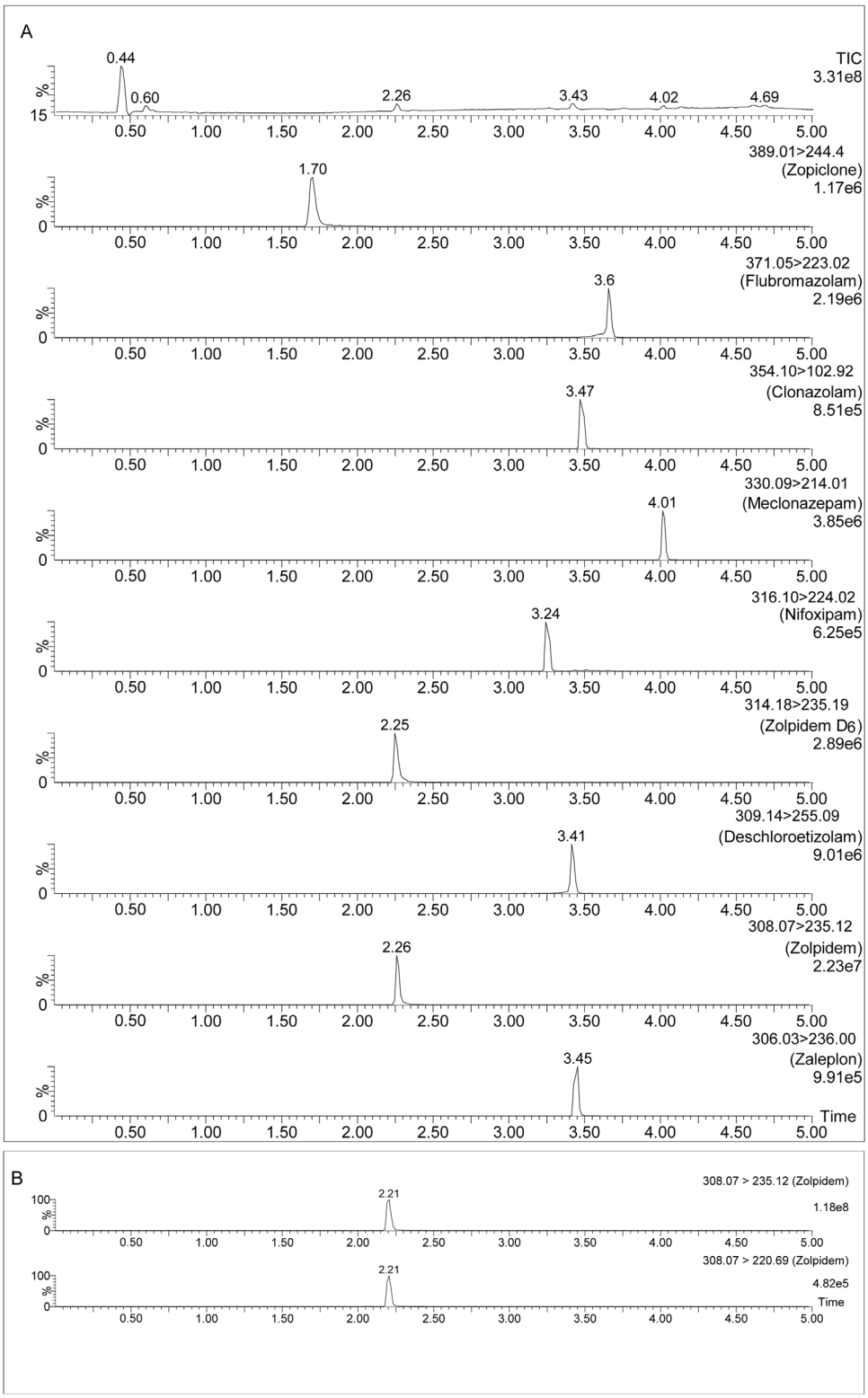


Fig. 1. (A) MRM chromatograms corresponding to plasma sample spiked with analytes studied at 250 ng mL^{-1}. (B) Representative chromatograms obtained through MRM transitions after the proposed method was applied to sample 6 from Table S2 (zolpidem, 2144 ng mL^{-1}).

phase are shown in Fig. 2. MeOH, which proved the second-best eluent, exhibited an extraction efficiency of less than 50 %. Finally, the mobile phase and the solvent containing 2% acetic acid in MeOH were the least efficient eluents. DCM/IPA/NH_4OH (78:20:2, v:v:v) solution was thus adopted as elution solvent for further testing.

3.1.2. Screening design

The influence of experimental variables on the MEPS process was examined by using $3^3 4^2$//16 asymmetric screening design with 3 factors at 3 levels and 2 others at 4 (see reference 24 in Supplementary material). The levels used for each variable are shown in Table S1 of the Supplementary material. The statistical software

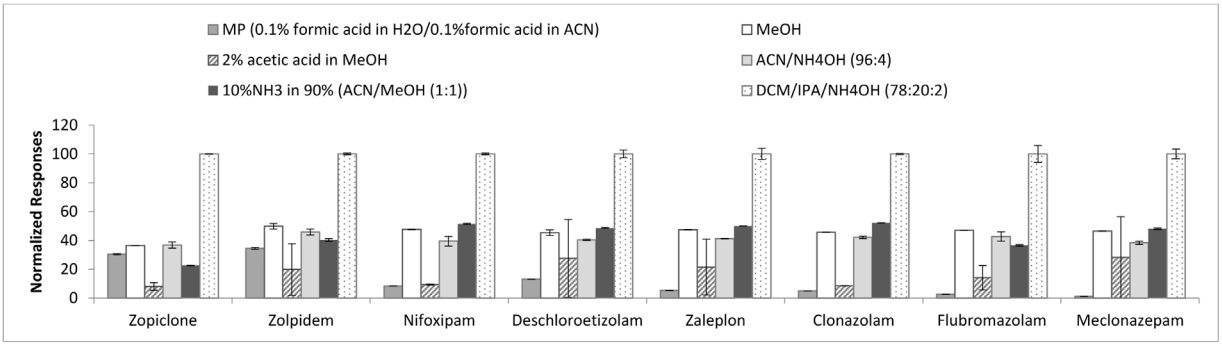


Fig. 2. Effect of different elution solvents on MEPS procedure. Normalized responses expressed as mean ± standard deviation (n = 2).

NemrodW® was used for design and evaluation. A total of 16 experiments were performed with the following factors: b_1, volume of washing solution (H_2O:MeOH, 97.5:2.5 (v:v)) (50, 100 and 150 μL); b_2, volume of eluent (50, 100 and 200 μL); b_3, number of extraction cycles (2, 6 and 8); b_4, sorbent phase (C8, C18, mixed-mode C8/SCX and polymeric); and b_5, sample pH (4, 6, 7 and 9).

An analysis of variance (ANOVA) showed that the results for all analytes except zopiclone and nifoxipam were statistically significant (those for zaleplon, deschloroetizolam, flubromazolam and meclonazepam at $p < 0.05$, and those for zolpidem and clonazolam at $p < 0.01$). All results were analysed graphically by using plots of delta weights (based on Lenth's method) and total effects, two types of bar graphs, the length of each bar being related to the effect of the factor level considered. Fig. 3A and B illustrates the influence of the relative effects of level changes in each factor on the MEPS results for deschloroetizolam. As can be seen, the eluent volume (b_2) had a statistically significant effect on zaleplon, zolpidem and clonazolam. The results suggest that increasing the eluent volume led to more efficient extraction of the other drugs, so a volume of 200 μL was selected as optimal for MEPS. The number of extraction cycles (b_3) had a strong effect on the extraction of all analytes and the greatest number studied (8 aspirate–discard cycles) proved adequate for all. The influence of the sorbent material (b_4) was statistically significant for all analytes except zopiclone. The polymeric phase provided the best results for all compounds. Zopiclone was similarly efficiently extracted with the mixed-mode C8/SCX and polymeric phases. The DBZD and Z-hypnotics studied have low partition coefficients (see Table 1); also, they are hydrophilic and can be present in blood plasma and serum. Because polar/non-polar balanced polymeric sorbents have a binding affinity for slightly polar and non-polar compounds, the polymeric phase was the best sorbent choice for the simultaneous extraction of all target drugs. The sample pH (b_5) had a statistically significant effect on zolpidem (pH 6) and clonazolam (pH 4). The extraction efficiency for the other analytes was similar at either pH. In fact, although not all drugs were in ionic form at pH 6 (see pK_a values in Table 1), using a polymeric sorbent facilitated their extraction. pH 6 was thus taken to be the best choice for all analytes. The effect of the washing solution volume (b_1) was statistically significant only for zolpidem and clonazolam; however, a volume of 150 μL provided the best results for zopiclone and nifoxipam, and similar results to those obtained with the other volumes for deschloroetizolam, flubromazolam and meclonazepam. For this reason, 150 μL was taken to be the most suitable volume.

3.2. Performance of the proposed method

The proposed method was assessed for linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision, accuracy, efficiency and matrix effects under the previously established optimum conditions. Figure S1 shows typical chromatograms for blank plasma and the absence of peaks from endogenous substances that might interfere with the quantification of DBZD and Z-hypnotics. Thus, satisfactory results of the specificity of the method were considered.

Linearity was assessed by constructing calibration curves spanning the concentration range from LOQ to 500 ng mL^{-1} (eight different levels determined in triplicate). Such a range was based on the therapeutic levels, and the toxic and lethal doses, of the Z-hypnotics [30]. The determination coefficients for the regression analyses ranged from 0.9932 to 0.9990 (Table 3). LOD and LOQ spanned the ranges 0.5–5 and 1–10 ng mL^{-1}, respectively (Table 3). These values are lower than those previously reported for Z-hypnotics [8], zopiclone [13,16,17], nifoxipam [12] and deschloroetizolam [12,14,19] but similar to those for zolpidem [6,21], zaleplon [16], deschloroetizolam [7], clonazolam and meclonazepam [12], flubromazolam [12,14,19].

Validation experiment in terms of matrix effect, recovery and process efficiency were performed. Matrix effect (ME) values below 80 % typically indicate suppressed ionization, whereas values above 120 % indicate enhanced ionization. The determination of the analytes was subject to matrix effects at one or more of concentration levels, using post-extraction addition approach. The effects were acceptable for zopiclone and zolpidem, but not for nifoxipam, flubromazolam, meclonazepam and deschloroetizolam, which exhibited suppressed ionization, and zaleplon and clonazolam, which exhibited enhanced ionization. With the polymeric phase, using IS and standard addition calibration, excellent RR and PE results are achieved (Table 4). The accuracy of the proposed method was calculated in terms of recovery and precision, using QC plasma samples spiked with the analytes at three different concentrations (10, 100 and 250 ng mL^{-1}). The precision, expressed as relative standard deviation (RSD), was excellent; thus, within-day precision ranged from 0.1 to 6.5 % and between-day precision from 0.5 to 10.6 % (Table 3). Recovery was assessed as process efficiency (PE) and relative recovery (RR), using six replicates of QC samples containing the analytes at three different concentration levels. As can be seen in Table 4, PE ranged from 63 % to 117 % and RR from 61 % to 123 %. Similar recoveries were published previously for zolpidem [6,8,17], zopiclone [6], zaleplon [8] and DBZD studied [12] and slightly higher to those for deschloroetizolan and flubromazolam [7,19] and zolpidem [21] and zopiclone [16]. Those published methods used LLE or SPE as extraction techniques. Few methods based on microextraction techniques for determination of DBZD were published. De Boeck *et al.* [13] published a method based on dispersive liquid-liquid microextracion (DLLME) using ionic liquid as extractant solvent for the quantification of benzodiazepines and benzodiazepines-like hypnotics in whole blood. Recoveries for zolpidem and zopiclone were slighter lower that obtained in this work. Vårdal *et al.* [14] developed a parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) for the rapid determination of designer benzodiazepines, benzodiazepines, and

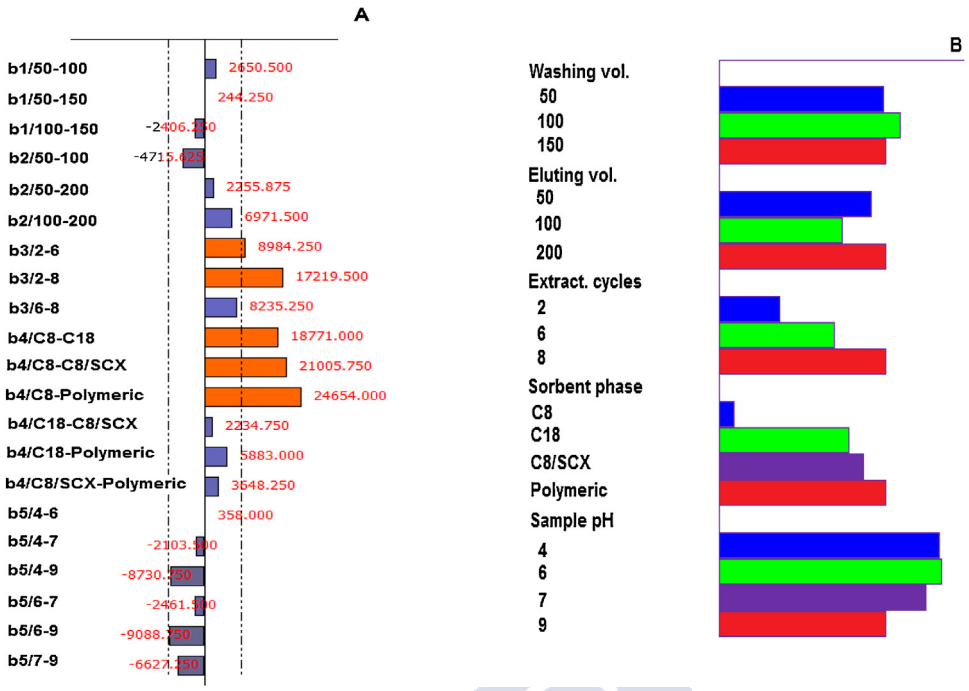


Fig. 3. Delta Weights (A) and Total Effects (B) plots for deschloroetizolam.

Table 3
Validation data: Determination coefficients, LODs, LOQs, intra- and interday precision.

Analyte	Regression model (R^2)	LOD (ng mL^{-1})	LOQ (ng mL^{-1})	Intraday precision (%RSD) (n = 3)			Interday precision (%RSD) (n = 5)		
				Low QC[a]	Medium QC[b]	High QC[c]	Low QC[a]	Medium QC[b]	High QC[c]
Zopiclone	y = 0.0032x - 0.0146 (0.9990)	0.5	1	4.9	2.0	1.6	5.4	2.1	2.8
Zolpidem	y = 0.0401x - 0.1798 (0.9983)	0.5	1	3.1	0.6	2.5	0.8	0.5	1.7
Nifoxipam	y = 0.0401x - 0.1798 (0.9950)	1	2.5	2.3	5.6	3.2	2.4	4.6	5.4
Deschloroetizolam	y = 0.0243x - 0.1439 (0.9964)	0.5	1	2.1	1.2	2.1	4.0	3.6	2.4
Zaleplon	y = 0.0013x + 0.0013 (0.9981)	1	2.5	4.9	2.0	1.6	5.4	2.1	2.8
Clonazolam	y = 0.0008x - 0.0034 (0.9924)	5	10	6.5	0.1	1.9	10.6	3.5	3.7
Flubromazolam	y = 0.0011x - 0.0046 (0.9932)	5	10	1.2	2.8	1.7	7.0	1.0	3.3
Meclonazepam	y = 0.0016x - 0.0108 (0.9949)	5	10	2.3	2.5	2.3	2.2	6.3	2.2

[a] 10 ng mL^{-1}.
[b] 100 ng mL^{-1}.
[c] 250 ng mL^{-1}.

Table 4
Studies of relative recovery (%RR) and process efficiency (%PE) with polymeric sorbent phase.

Analyte	% RR ± SD			%PE ± SD		
	Low QC[a]	Medium QC[b]	High QC[c]	Low QC[a]	Medium QC[b]	High QC[c]
Zopiclone	94 ± 5	65 ± 3	67 ± 1	104 ± 12	100 ± 5	117 ± 3
Zolpidem	109 ± 6	96 ± 1	92 ± 5	109 ± 6	105 ± 1	88 ± 5
Nifoxipam	90 ± 17	109 ± 13	115 ± 6	94 ± 11	100 ± 12	67 ± 6
Deschloroetizolam	107 ± 11	101 ± 4	100 ± 3	92 ± 6	92 ± 4	82 ± 3
Zaleplon	123 ± 12	110 ± 8	100 ± 2	87 ± 10	81 ± 10	89 ± 2
Clonazolam	61 ± 8	79 ± 4	90 ± 5	117 ± 15	72 ± 4	76 ± 5
Flubromazolam	108 ± 14	83 ± 4	85 ± 1	98 ± 9	84 ± 4	113 ± 2
Meclonazepam	84 ± 10	74 ± 17	90 ± 10	86 ± 10	98 ± 15	63 ± 1

Extraction efficiency as relative recovery (%RR), and process efficiency (%PE). SD: Standard deviation.
[a] 10 ng mL^{-1}.
[b] 100 ng mL^{-1}.
[c] 250 ng mL^{-1}.

Z-hypnotics in whole blood. Despite being a green technique, since it only uses about 4 microliters of solvent, the recoveries are much lower than those obtained in this work. Meng *et al.* [18] developed an ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of 4 designer benzodiazepines (phenazepam, diclazepam, flubromazepam and etizolam) in urine samples. Recoveries obtained by these authors ranged between 73.8 and 85.5. This discussion of results shows the scarcity of microextraction techniques for this type of compounds and, furthermore, no study with MEPS has been developed. The values obtained in the present study testify to the good performance of the proposed method when used under its optimum conditions and to the fact that using zolpidem-d6 to offset analytes losses in the extraction process and matrix effects even those cases where an analyte lacked isotopically labelled analogues.

3.3. Analysis of real samples

The applicability of the proposed method was evaluated by applying it to seven plasma samples from overdoses cases. The results are shown in Table S2. The small volume of sample collected and/or received by the laboratory required that analyses be performed in duplicate. None of the samples contained any DBZD, but all contained zolpidem at levels below the LOQ. Also, only sample 6 contained this drug at a concentration above its lethal level in plasma (2 μg mL^{-1}): 2144 ng mL^{-1} [30]. Fig. 1B shows the MRM chromatograms for sample 6. The results testify to the increasing importance of having validated methods for detecting and quantifying DBZD and Z-hypnotics, consumption of which is on a steady increase.

4. Conclusions

An efficient, fast and environmentally friendly MEPS procedure was used in combination with UHPLC–MS/MS for the determination of five DBZD and three Z-hypnotics in human plasma samples. The ensuing method was validated with acceptable results. A polymeric phase was found to be the most suitable for the simultaneous extraction of the target compounds. Although some analytes were subject to considerable matrix effects, using IS enabled their accurate quantification. Applying the proposed method to forensic blood samples revealed the presence of zolpidem and another BZD. Although none of the samples contained any DBZD, the method provides an effective analytical tool for its application in forensic toxicology to identify and confirm the presence of these drugs that may go unnoticed in cannabinoid/opioid detection tests. The proposed methodology is a good option to identify and confirm the presence of these drugs that may go unnoticed in cannabinoid/opioid detection tests.

CRediT authorship contribution statement

A.M. Ares-Fuentes: Investigation, Validation, Formal analysis, Visualization, Writing - original draft. **R.A. Lorenzo:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing, Supervision. **P. Fernández:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing, Supervision. **A.M. Carro:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Data curation, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

All authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was funded by Spain's Home Office (DGT Project SPIP2015-01838) and Ministry of Science, Innovation and Universities (Project RTI2018-096450-B-I00), and also the Galician Regional Government (Xunta de Galicia, ED431C 2017/05) and the European Regional Development Fund (FEDER). The authors are grateful to Professor M.I. Loza (BioFarma Research Group–USC) for access to the analytical instruments used.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113779.

References

[1] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2019), European Drug Report 2019: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg 2019, pag 17, 34-36. http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11364/20191724_TDAT19001ENN_PDF.pdf. (Accessed in June 2020).
[2] K.R. Manchester, E.C. Lomas, L. Waters, F.C. Dempsey, P.D. Maskell, The emergence of new psychoactive substances (NPS) benzodiazepines: a review, Drug Test. Anal. 10 (2018) 37–53, http://dx.doi.org/10.1002/dta.2211.
[3] J.P. Smith, O. Sutcliffe, C. Banks, An overview of recent developments in the analytical detection of new psychoactive substances (NPSs), Analyst 140 (2015) 4932–4948, http://dx.doi.org/10.1039/C5AN00797F.
[4] M. Bäckberg, K.H. Jönsson, O. Beck, A. Helander, Investigation of drug products received for analysis in the Swedish STRIDA project on new psychoactive substances, Drug Test. Anal. 10 (2018) 340–349, http://dx.doi.org/10.1002/dta.2226.
[5] S. Sakshaug, M. Handal, V. Hjellvik, C. Berg, A. Ripel, I. Gustavsen, J. Mørland, S. Skurtveit, Long-term use of Z-hypnotics and co-medication with benzodiazepines and opioids, Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 120 (2017) 292–298, http://dx.doi.org/10.1111/bcpt.12684.
[6] E. Eliassen, L. Kristoffersen, Quantitative determination of zopiclone and zolpidem in whole blood by liquid-liquid extraction and UHPLC-MS/MS, J. Chromatogr. B 971 (2014) 72–80, http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.09.018.
[7] J. Tomková, M. Švidrnoch, V. Maier, P. Ondra, Analysis of selected designer benzodiazepines by ultra high performance liquid chromatography with high-resolution time-of-flight mass spectrometry and the estimation of their partition coefficients by micellar electrokinetic chromatography, J. Sep. Sci. 40 (2017) 2037–2044, http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201700069.
[8] C. Kratzsch, O. Tenberken, F.T. Peters, A.A. Weber, T. Kraeme, H.H. Maurer, Screening, library assisted identification and validated quantification of 23 benzodiazepines, flumazenil, zaleplone, zolpidem and zopiclone in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization, J. Mass Spectrom. 39 (2004) 856–872, http://dx.doi.org/10.1002/jms.599.
[9] S. El Balkhi, M. Chaslot, N. Picard, S. Dulaurent, M. Delage, O. Mathieu, F. Saint-Marcoux, Characterization and identification of eight designer benzodiazepine metabolites by incubation with human liver microsomes and analysis by a triple quadrupole mass spectrometer, Int. J. Legal Med. 131 (2017) 979–988, http://dx.doi.org/10.1007/s00414-017-1541-6.
[10] M.R. Meyer, M.P. Bergstrand, A. Helander, O. Beck, Identification of main human urinary metabolites of the designer nitrobenzodiazepines clonazolam, meclonazepam, and nifoxipam by nano-liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for drug testing purposes, Anal. Bioanal. Chem. 408 (2016) 3571–3591, http://dx.doi.org/10.1007/s00216-016-9439-6.
[11] G. Høiseth, S.S. Tuv, R. Karinen, Blood concentrations of new designer benzodiazepines in forensic cases, Forensic Sci. Int. 268 (2016) 35–38, http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.09.006.
[12] M.P. Bergstrand, A. Helander, O. Beck, Development and application of multi-component LC-MS/MS method for determination of designer benzodiazepines in urine, J. Chromatogr. B 1035 (2016) 104–110, http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.08.047.
[13] M. De Boeck, S. Missotten, W. Dehaen, J. Tytgat, E. Cuypers, Development and validation of a fast ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction procedure combined with LC-MS/MS analysis for the quantification of benzodiazepines and benzodiazepines-like hypnotics in whole blood, Forensic Sci. Int. 274 (2017) 44–54, http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.12.026.
[14] L. Vårdal, G. Wong, Å.M.L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, E.L. Øiestad, Rapid determination of designer benzodiazepines, benzodiazepines, and Z-hypnotics in whole blood using parallel artificial liquid membrane extraction and UHPLC-MS/MS, Anal. Bioanal. Chem. 410 (2018) 4967–4978, http://dx.doi.org/10.1007/s00216-018-1147-y.

[15] L. Ambach, A. Hernández Redondo, S. König, V. Angerer, S. Schürch, W. Weinmann, Detection and quantification of 56 new psychoactive substances in whole blood and urine by LC-MS/MS, Bionalysis 7 (2015) 1119–1136, http://dx.doi.org/10.4155/bio.15.48.
[16] N. Karlonas, A. Ramanavicius, A. Ramanaviviene, Development of an SPE method for the determination of zaleplon and zopiclone in hemolyzed blood using fast GC with negative-ion chemical ionization MS, J. Sep. Sci. 37 (2014) 551–557, http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201300784.
[17] E.A. Krylova, S.S. Kataev, Y.A. Khomov, O.N. Dvorskaya, Validation of a gas chromatography/mass spectrometry method for quantitative determination of zolpidem in whole blood, Pharm. Chem. J. 48 (2015) 564–569, http://dx.doi.org/10.1007/s11094-015-1328-3.
[18] L. Meng, B. Zhu, K. Zheng, S. Fu, Ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of 4 designer benzodiazepines in urine samples by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, J. Chromatogr. B 1053 (2017) 9–15, http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.04.008.
[19] M. Švidrnoch, B. Boráňová, J. Tomkivá, P. Ondra, V. Maier, Simultaneous determination of designer benzodiazepines in human serum using non-aqueous capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry with successive multiple ionic-polymer layer coated capillary, Talanta 176 (2018) 69–76, http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.010.
[20] P. Fernandez, C. Vazquez, R.A. Lorenzo, A.M. Carro, A.M. Bermejo, Development of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of six benzodiazepines in human plasma after solid-phase extraction, Anal. Lett. 43 (2010) 1075–1084, http://dx.doi.org/10.1080/00032710903492490.
[21] P. Piotrowski, S. Bocian, K. Śliwka, B. Buszewski, Simultaneous analysis of zolpidem and its metabolite in whole blood and oral fluid samples by SPE-LC-MS/MS for clinical and forensic purposes, Adv. Med. Sci. 60 (2015) 167–172, http://dx.doi.org/10.1016/j.advms.2015.01.010.
[22] M. Abdel-Rehim, New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications: I. Determination of local anesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. B 801 (2004) 317–321, http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.11.042.
[23] J.A.M. Pereira, J. Gonçalves, P. Porto-Figueira, J.A. Figueira, V. Alves, R. Perestrelo, S. Medina, J.S. Câmara, Current trends on microextraction by packed sorbent – fundamentals, application fields, innovative improvements and future applications, Analyst 144 (2019) 5048–5074, http://dx.doi.org/10.1039/C8AN02464B.
[24] M.M. Moein, A. A.l-Rehim, M. A.-Rehim, Microextraction by Packed Sorbent (MEPS) and Monolithic Packed Pipette Tips for 96-well Plates in Solid-phase Extraction Handbooks in Separation Science, 2020, pp. 473–491, http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816906-3.00017-0.
[25] P. Fernández, M. González, M. Regenjo, A.M. Ares, A.M. Fernández, R.A. Lorenzo, A.M. Carro, Analysis of drugs of abuse in human plasma using microextraction by packed sorbents and ultra-high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. A 1485 (2017) 8–19, http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.021.
[26] A.M. Ares, P. Fernández, M. Regenjo, A.M. Fernández, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, A fast bioanalytical method based on microextraction by packed sorbent and UPLC–MS/MS for determining new psychoactive substances in oral fluid, Talanta 174 (2017) 454–461, http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.022.
[27] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, 2018 (Accessed in June 2020) https://www.fda.gov/media/70858/download.
[28] ICH harmonized tripartite guideline: validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), International Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005) (Accessed in June 2020) https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q2-r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology.
[29] K.F. da Cunha, L.C. Rodrigues, M.A. Huestis, J.L. Costa, Miniaturized extraction method for analysis of synthetic opioids in urine by microextraction with packed sorbent and liquid chromatography—tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1624 (2020) 461241, http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461241.
[30] M.R. Repetto, M. Repetto, Tabla de concentraciones de xenobióticos en fluidos biológicos humanos como referencia para el diagnóstico toxicológico (versión 2015). Ampliación de Toxicología de Postgrado 15, in: M. Repetto (Ed.), CD-ROM. Ilustre Colegio Oficial de Químicos, Depósito Legal, Sevilla, 2015, ISBN: 13: 978-84-695-3142-6., SE-182-07.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

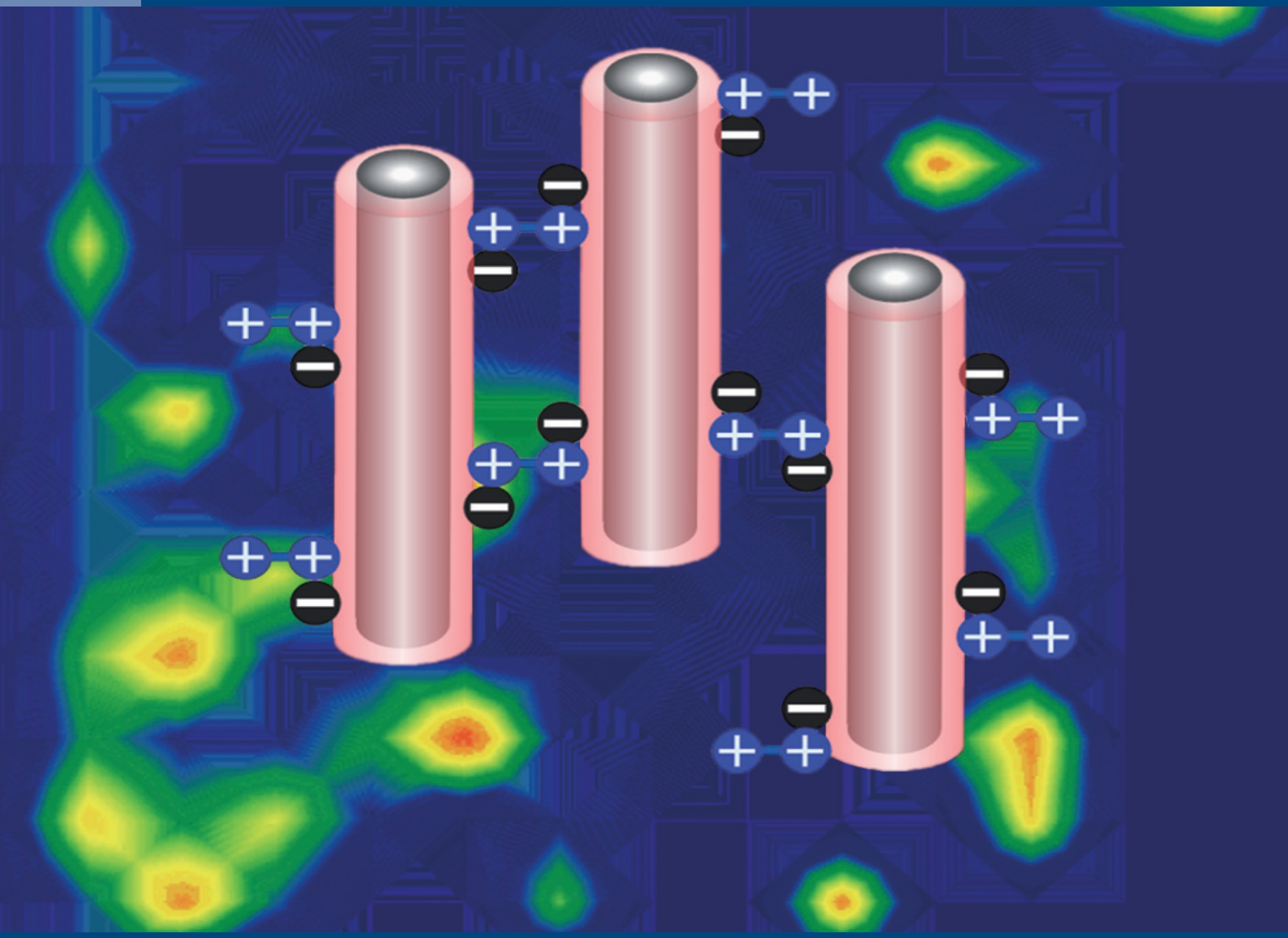
ISSN 1615-9306 · JSSCCJ 42 (11) 1955–2088 (2019) · Vol. 42 · No. 11 · June 2019 · D 10609

JSS

JOURNAL OF

SEPARATION SCIENCE

11|19



Methods
Chromatography · Electroseparation

Applications
Biomedicine · Foods · Environment

www.jss-journal.com

WILEY-VCH

Received: 17 January 2019 | Revised: 1 April 2019 | Accepted: 1 April 2019

DOI: 10.1002/jssc.201900060

JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE

RESEARCH ARTICLE

Microextraction by packed sorbent followed by ultra high performance liquid chromatography for the fast extraction and determination of six antidepressants in urine

Ana María Ares Fuentes[1] | Purificación Fernández[2] | Ana Maria Fernández[3] | Antonia M Carro[1] | Rosa Antonia Lorenzo[1]

[1]Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry and Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, La Coruña, Spain

[2]Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, La Coruña, Spain

[3]Drug Addiction Assistance Unit, Monforte de Lemos, Lugo, Spain

Correspondence
Prof. Antonia M. Carro and Prof. Rosa Antonia Lorenzo, Department of Analytical Chemistry (GI-2113), Faculty of Chemistry and Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), University of Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, La Coruña, Spain.
Email: rosaantonia.lorenzo@usc.es; tuchi.carro@usc.es

The growing use of antidepressants in recent years has led to their increasing presence in forensic analyses. In this work, microextraction by packed sorbent followed by ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detection provided a fast method for determining the antidepressants mirtazapine, venlafaxine, escitalopram, fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline in human urine. The microextraction conditions (viz., type of sorbent, number of draw–eject extraction cycles or strokes, sample volume and pH, and type and volume of washing solution and eluent) were optimized by using an experimental design. The ensuing analytical method was validated in terms of linearity (25–1000 ng/mL urine), limit of detection (lower than 7.1 ng/mL), limit of quantification (25 ng/mL), precision (4.7–15.1% as relative standard deviation), and accuracy (80.4–126.1% as mean recovery for four replicate determinations). The proposed method allowed the six target antidepressants to be determined at concentrations from therapeutic to toxic levels. The application to small volumes (300 µL) of urine afforded fast extraction of the analytes and provided results on a par with those of existing clinical and forensic alternatives.

KEYWORDS
antidepressants, experimental design, microextraction, packed sorbents, urine

1 | INTRODUCTION

Depression is one of the most widespread psychiatric disorders that results from a complex interaction of social, psychological, and biological factors, and affects more than 350 million people of all ages in the world. Depression often presents itself with a loss of interest, decreased energy, feeling of guilt, disturbed sleep or appetite, and poor concentration, and can even lead to suicide. This disease is spreading so rapidly that it is expected to become the second leading cause of disability for all ages and both genders by 2020 [1,2].

Depression is usually treated with antidepressants, which are currently the most common sources of drug poisoning after benzodiazepines. Usually, poisoning with antidepressants results from voluntary intake or suicide attempts by depressive patients. In recent decades, the use of mood-modifying drugs has increased by effect of some antidepressants such as selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and serotonin-noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs) gradually displacing traditional tricyclic antidepressants [2,3].

Article Related Abbreviations: MeOH, methanol; MEPS, microextraction by packed sorbent; SNRI, serotonin-noradrenaline reuptake inhibitor; SSRI, selective serotonin reuptake inhibitor; PDA, photodiode array detector.

 © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

The antidepressants studied in this work act through different mechanisms. Thus, venlafaxine is a SNRI, whereas escitalopram, fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline are selective SSRIs, and mirtazapine is a noradrenergic and specific serotonergic antagonist. These drugs are used in a variety of combinations to treat depression, anxiety, panic, phobias, and obsessive compulsive, post-traumatic, pre-menstrual, and dysphoric disorders, hence the risk of mutual interactions. Also, antidepressants are frequently encountered in emergency toxicology screening and drug-abuse testing, as well as in cases of drug-facilitated sexual assault or death. The growing use of these antidepressants in Spain can be ascribed to an increasing incidence of mood disorders, their diagnostic detection by primary care physicians, and the extension of authorized therapeutic indications for these drugs [4].

Antidepressants in biological samples have so far been determined by using various techniques including HPLC [5–8], UHPLC [8–11], and GC in combination with different types of detectors [12–15]. For many years, LLE [6,16] and SPE [7,17,18] were the most widely used techniques for extracting and preconcentrating antidepressants from biological samples. In recent years, however, miniaturized versions including dispersive liquid–liquid microextraction [14,15,19,20] and microextraction by packed sorbent (MEPS) [9,21–25] have emerged as straightforward, expeditious alternatives substantially reducing solvent and sample volumes, and extraction times. MEPS allows sample processing, extraction and injection to be performed at once in a fully automated manner with no loss of efficiency or sensitivity relative to SPE by connecting an on-line/at line sampling/injecting device to a gas or liquid chromatograph [26].

The widespread use of antidepressants has led to the SSRI, SNRI, and noradrenergic and specific serotonergic antagonist classes rapidly gaining significance in the clinical and forensic fields. The concentrations of these therapeutic antidepressants in human fluids are usually very low, which complicates their detection. A need thus exists for simple, accurate, fast, sensitive analytical methods based on miniaturized techniques for more rigorous control of these drugs in biological matrices such as urine.

In this work, a new, fast, sensitive, inexpensive method for the identification and determination of six antidepressants (namely, escitalopram, fluoxetine, fluvoxamine, mirtazapine, sertraline, and venlafaxine) in human urine was developed by using microextraction by packed sorbent (MEPS) followed by ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detection (MEPS-UPLC-PDA). The proposed method was used for quantitative analyses of urine samples from volunteers.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Drugs and reagents

Standards of venlafaxine, fluoxetine, and fluvoxamine were obtained from Normon® (Madrid, Spain), while escitalopram was supplied by Lundbeck® (Valby, Denmark), sertraline by Pfizer® (Madrid, Spain) and mirtazapine by Merck Sharp Dome® (NY, USA). Gradient-grade acetonitrile, chloroform, methanol, phosphoric acid and potassium dihydrogen phosphate were purchased from Merck® (Darmstadt, Germany). Surine^{TM} was supplied by Cerilliant (Sigma–Aldrich, Madrid Spain). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q system from Millipore (Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland).

Individual stock solutions containing a 1 mg/mL concentration of each drug were prepared in methanol. Urine samples were spiked with standards containing concentrations from 10 to 1000 ng/mL of each analyte that were prepared by successive dilution of the stock solutions. All solutions were stored frozen at –20°C until use.

The MEPS system consisted of an eVol® XR digital analytical syringe (100 µL) equipped with a barrel and insert needle (BIN), and was obtained from SGE (Melbourne, Australia). The BIN was packed with 4 mg of each sorbent tested, namely: a strong cation exchanger (C8 + SCX), octadecyl-silica (C18), and octyl-silica (C8). Each sorbent was conditioned by passing 100 µL of methanol four times and 100 µL of water another four times before first use.

2.2 | Urine samples

Calibration standards were prepared by using drug-free urine from healthy adults. A synthetic negative urine control (Surine^{TM}) was also used to prepare standards for constructing calibration curves to validate the proposed method. Real urine samples were obtained from volunteers treated with antidepressants and stored refrigerated at 4°C or frozen at –20°C if analyses were delayed. Before use, the frozen samples were thawed to room temperature and centrifuged at 3500 rpm for 10 min. All tests were performed in accordance with the World Medical Association's "Ethical principles for medical research involving human subjects" [27].

2.3 | Microextraction by packed sorbent

A volume of 300 µL of urine was mixed with 200 µL of phosphate buffer (0.05 M, pH 7) to improve recovery [28]. The analytes were concentrated by passing ten aliquots of 100 µL through the MEPS sorbent in drawing–eject extraction cycles

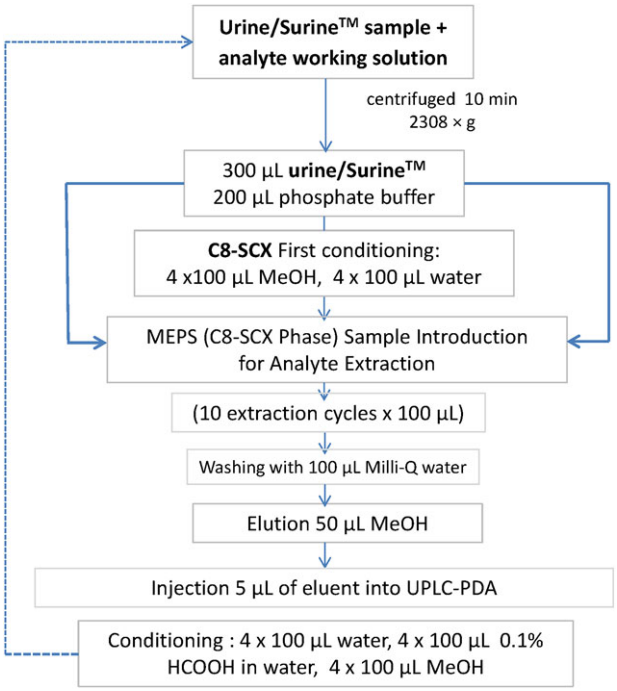


FIGURE 1 Schematic representation of steps involved in MEPS procedure

or strokes in the same vial (total sampling volume 1000 µL). The solid phase was then washed with 100 µL of water and dried for 30 s by blowing 100 µL of air three times through the MEPS system. Finally, the antidepressants were eluted directly into the vial with 50 µL of methanol (MeOH) and a 5 µL aliquot was injected into the UPLC-PDA system.

The lifetime of the MEPS sorbents was extended by sequentially washing four times each with 100 µL of 0.1% formic acid and 100 µL of methanol. This sorbent washing step also served as a conditioning step for the next extraction cycle and to avoid carryover. Each sorbent could thus be used in more than 70 extractions. The MEPS analytical procedure is depicted in Figure 1.

2.4 | Chromatographic analyses

Chromatographic analyses were done on an ACQUITY-UPLC H-Class System from Waters® (Milford, MA, USA) equipped with an ACQUITY-UPLC-PDA detector and an ACQUITY BEH Shield RP18 column (2.1 × 100 mm, 1.7 µm film thickness). The flow rate through the column was 0.43 mL/min and its temperature was kept at 30°C. For chromatographic separation, a mobile phase consisting of acetonitrile (A) and 1 mM phosphate buffer at pH 3 (B) was used in the gradient mode in the following sequence: 0 min 20% A, 0.60 min 50% A, 0.68 min 50% A, 0.82 min 45% A, 0.95 min 20% A, and 2.00 min 20% A. The mobile phase was passed through a filter of 0.22 µm size before use. The PDA allowed the wavelength range from 200 to 400 nm to be scanned to obtain three-dimensional (wavelength × absorbance × time) chromatograms. In this work, detection was performed at 230 nm for improved sensitivity. The chromatographic separation of the six antidepressants took 1.7 min and the total running time was only 2 min. Chromatographic signals were identified from the retention times and UV absorbance spectra of the analytes.

2.5 | Method validation and statistical analyses

As per international guidelines [29,30], the proposed method was validated in terms of linearity, LOD and LOQ, selectivity, precision and accuracy (recovery), using the certified reference material Surine™. This certified reference material is a negative urine control used in LC, clinical chemistry, urine drug testing, and forensic analyses.

Linearity was assessed by constructing a calibration curve for each analyte, using Surine™ or an analyte-free urine blank spiked with each compound at a concentration in the range of 25–1000 ng/mL. Three replicates per concentration level were analyzed and the resulting peak areas were used to quantify the analytes.

The LOD and LOQ of each antidepressant were taken to be of the lowest concentrations with S/N 3.3 and 10, respectively.

Precision, as %RSD, was assessed by using Surine™ QC samples at three concentration levels (50, 250, and 500 ng/mL). Within-day precision was determined by using five replicates per concentration level on the same day, and between-day precision by analyzing QC samples at the previous three concentration levels in duplicate daily over three consecutive days. Accuracy, in terms of percent recovery, was assessed by using four replicates of Surine™ QC samples per concentration level.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Optimization of the microextraction by packed sorbent conditions

Blockage of the MEPS cartridge was avoided by removing unwanted macroparticles from the samples [9]. Fresh human urine samples from healthy volunteers were collected, centrifuged at 2308 × g for 10 min and stored at 4°C until analysis. No additional sample pretreatment was required, which is an advantage of the proposed method.

3.1.1 | Optimum eluent and washing solvent

The MEPS procedure was optimized for extraction efficiency according to reported recommendations [9,31,32] and previous experience of our group [27]. The most suitable elution and washing solvent were identified by using urine samples spiked with a standard containing a mixture of the

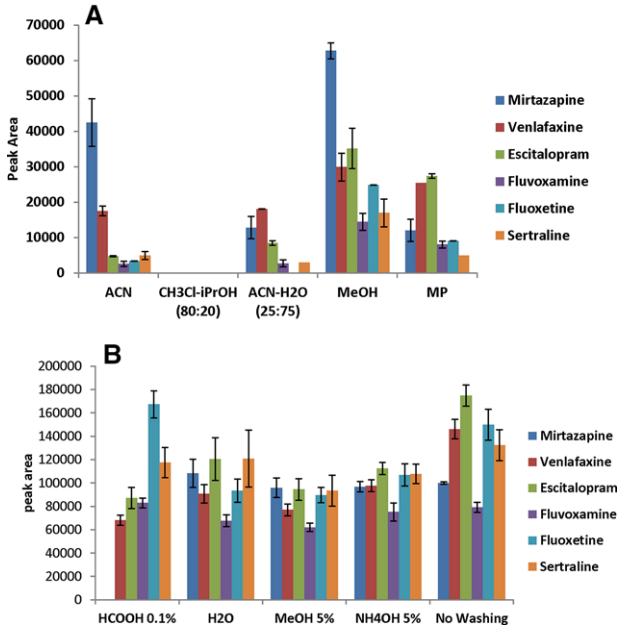


FIGURE 2 (A) Different elution solvents in antidepressants extraction from urine samples. MP: Mobile phase. (B) Different washing solvents in antidepressants extraction from urine samples. ($n = 3$)

antidepressants at 0.5 and 2 µg/mL concentration, respectively. The elution solvent should be an organic solvent or a mixture capable of efficiently removing the analytes from the sorbent after each sample was loaded [32]. A volume of 100 µL of acetonitrile, methanol, and binary mixtures including (80:20, v/v) chloroform/isopropanol, (75:25, v/v) Milli-Q water/acetonitrile, and (20:80, v/v) ACN/phosphate buffer (the mobile phase) was used in triplicate in combination with an MEPS syringe packed with C8 + SCX sorbent inside the barrel-in-needle for this purpose. Methanol ensured thorough elution, whereas the chloroform/isopropanol mixture eluted no analyte (Figure 2A).

The effect of including an additional washing step after sample loading but before drying was investigated by using a 100 µL volume of various washing solvents including 0.1% formic acid, Milli-Q water, 5% MeOH, and 5% NH_4OH, or no solvent (i.e., no washing). As can be seen from Figure 2B, Milli-Q water provided the best results as it removed all potentially interfering species.

Once the most suitable eluent and washing solvent were chosen, the MEPS procedure was further optimized by using an experimental design.

3.1.2 | Experimental design

An asymmetric $2^2 3^3 4^1$ // 16 screening design was initially used to examine the influence of additional factors on the MEPS procedure. The primary goal was to identify the factors actually influencing MEPs performance with as small as possible a number of experiments [33,34]. The initial design allowed the influence of six variables to be examined in only 16 experiments (viz., two factors at two levels each, three factors at three levels each, and one factor at four levels). The variables considered were sample volume (100 or 300 µL), drying time (0.5 or 3 min), eluent volume (50, 100, or 500 µL), number of drawing–ejecting extraction cycles (two, four or eight), type of sorbent (C8, C18, or C8 + SCX), and pH (two, four, seven, or nine) (see Supporting Information Table S1).

Results were generated and evaluated by using the statistical software NemrodW® [35]. Delta weights and total effects graphs provide meaningful information with a view to interpreting results. In fact, delta weight graphs expose the relative effects of each analyte on the response upon a change in a variable. The length of the bars is proportional to the significance of the effect. If the effect is positive, the bar falls on the right; if it is negative, the bar falls on the left. Dashed vertical lines represent limits of statistical significance. If the bars exceed these limits, the effect of a level for a variable is assumed to be statistically significant on the response concerned. Although none of the effects were statistically significant, their trends were. Total effects graphs are also bar graphs in which the length of each bar is proportional to the effect of each factor level on the response. For example, Supporting Information Figure S1 shows the results for fluvoxamine.

The screening design allowed certain conditions leading to optimal simultaneous extraction of the antidepressants to be established, namely: 300 µL of sample, 50 µL of eluent, a mixed sorbent (20% SCX–80% C8), and drying for 0.5 min. For practical reasons, we used the lowest level of the last factor (0.5 min) because a longer drying time (up to 3 min) had a similar impact on extraction efficiency. However, the results in regards the optimum number of extraction cycles and the pH were ambiguous. Except for mirtazapine and fluoxetine, which were more efficiently extracted with a neutral-to-alkaline and acid medium, respectively, all antidepressants were extracted with a similar efficiency at any pH. The best number of extraction cycles or strokes was four for mirtazapine, venlafaxine, and escitalopram, and eight for fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline being similarly efficiently extracted with four or eight strokes. Based on these results, the optimum pH and number of extraction cycles were established from a response surface design (central composite design) [33,34]. The central composite design used was a full factorial design involving 2^2 plus four experiments in axial position at a distance $\alpha = 1.414$ from the center of the domain and three central points to estimate experimental error and evaluate precision (see Supporting Information Table S2). The software NemrodW® was used to optimize these two factors at five different levels each (two, three, six, nine, and ten for pH, and two, three, six, nine, and ten for number of strokes) in 11 experiments that were conducted in a random sequence to avoid the potential effects of other variables not included in the design [35].

TABLE 1 Analytical performance of the MEPS-UPLC-PDA method in urine samples

Compound	pK_a	t_R (min)	λ_{max} (nm)	Linear regression (25–1000 ng/mL)			LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Intraday precision RSD (%) (n = 5)			Interday precision RSD (%) (n = 6)		
				Intercept	Slope	R^2			A	B	C	A	B	C
Mirtazapine	6.67	0.89	291.4	295	19062	0.993	0.7	2.1	5.2	5.5	4.7	9.5	15.1	8.8
Venlafaxine	8.91	1.23	224.0	1463	32856	0.993	4.6	13.8	8.4	7.5	8.7	8.7	8.4	7.3
Escitalopram	9.78	1.49	238.1	1670	49908	0.997	1.8	5.4	7.6	5.2	10.5	8.6	11.7	9.7
Fluvoxamine	8.86	1.58	251.1	86	19913	0.996	3.8	11.4	11.4	9.8	11.5	13.2	10.8	8.3
Fluoxetine	9.80	1.64	226.4	623	33757	0.997	0.5	1.5	9.8	14.1	12.8	9.8	9.4	9.4
Sertraline	9.85	1.67	365.1	1200	29688	0.996	7.0	21.0	6.8	9.4	10.7	6.4	7.8	10.2

A: QC Low (50 ng/mL); B: QC Intermedium (250 ng/mL); C: QC High (500 ng/mL), t_R: Retention Time; R^2: Coefficient of determination.

The results of the analysis were evaluated by using the following second-order polynomial model in NemrodW®:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{11} X_{11} + b_{22} X_{22} + b_{12} X_1 X_2 \quad (1)$$

where Y is the calculated response function (viz., the peak area obtained by UPLC-PDA analysis of each antidepressant), and X_1 and X_2 represent the two factors. The constant term b_0 is the mean response for all the experimental runs; b_1, b_2, and b_{12} are the estimated coefficients for the effects of the individual factors and their interaction; and b_{11} and b_{22} are the coefficients for the quadratic terms.

The previous coefficients were calculated by linear regression and validated by analysis of variance (see Supporting Information Table S3). The number of extraction cycles (b_1) was statistically significant at the 95% confidence level for fluvoxamine and fluoxetine, and so was pH (b_2) at the 99% confidence level for mirtazapine, venlafaxine, and escitalopram. The MEPS efficiency increased with increasing number of extraction cycles and decreasing pH for fluvoxamine and fluoxetine; however, the extraction of mirtazapine and escitalopram was more favourable with a small number of strokes and a high pH. Sertraline exhibited a dual dependence; thus, it was efficiently extracted with a low pH and a large number of extraction cycles, but also with a high pH and a small number of strokes. For this reason, an algorithm based on desirability functions was used to identify an acceptable tradeoff without additional experimentation. The global desirability response surface in Supporting Information Figure S2 contains two zones of acceptable conditions corresponding to the numerical optimization, namely: two extraction cycles at pH 10 or ten cycles at any pH. The neutral pH of the sample was adopted, however. Three experiments were then done in the two optimal zones; based on the results, pH 7 and 10 extraction cycles provided the best extraction results (see Supporting Information Figure S3). The antidepressants, which had $pK_a > 9$, were in ionic form at the pH of the urine samples and thus retained by the mixed sorbent (20% SCX–80% C8) through ionic interactions; by exception, mirtazapine, with $pK_a = 6.67$, was only partially ionized and retained through reversed phase interactions [36]. The final optimum conditions were as follows: 300 µL of sample, ten extraction cycles × 100 µL, pH 7, a mixed sorbent (20% SCX–80% C8), 0.5 min of drying and 50 µL of MeOH as eluent.

3.2 | Validation of the proposed method

The antidepressants were identified from their retention times and UV spectral data (Table 1). The chromatographic technique (UPLC-PDA) proved satisfactory specific for the analytes, which were efficiently isolated from urine components. An analyte-free urine blank was extracted and analyzed for endogenous compounds in parallel, and the resulting

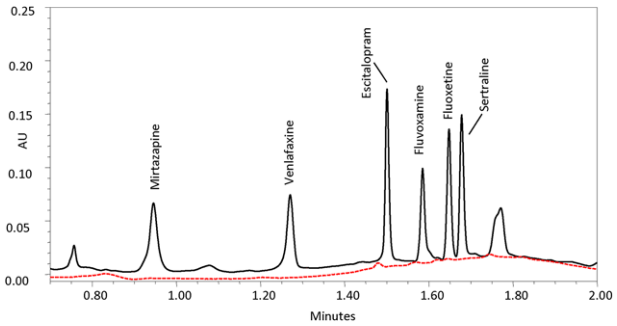


FIGURE 3 MEPS-UPLC-PDA chromatograms obtained from a blank urine (dotted line) and spiked urine with the antidepressants at concentration level of 2 μg/mL

chromatogram was compared with those for urine samples spiked with the antidepressants. As can be seen from Figure 3, no interference or carryover was observed at any retention time. Therefore, the proposed method was effective for the intended purpose (viz., selectively extracting and determining the analytes). Also, the analysis time was <1.8 min.

Linearity was assessed from calibration curves for Surine™ or analyte-free blank urine samples spiked with the analytes at concentrations over the range 25–1000 ng/mL. As can be seen from Table 1, linearity was quite good, and coefficients of determination ranged from 0.993 to 0.997. The slope of a calibration curve is a measure of sensitivity of an analytical method. On these grounds, the lowest sensitivity was that for escitalopram and the highest that for mirtazapine. LODs ranged from 0.5 ng/mL for fluoxetine to 7 ng/mL for sertraline, and LOQs from 1.5 ng/mL for fluoxetine, to 21 ng/mL for sertraline. However, calibration curves were all constructed over the concentration range 25–1000 ng/mL, which is acceptable for a biological matrix such as urine. The analytes had previously been rarely determined in urine. For example, fluoxetine was determined by MEPS-LC-UV with an LOD of 80 ng/mL, which exceeds that obtained here [37]. By contrast, our LOD for mirtazapine (0.7 ng/mL) is similar to that reported by Rani et al. [38].

Precision was assessed in Surine™ QC samples spiked with the analytes at three different concentration levels (50, 250, and 500 ng/mL) and analyzing five replicates, one on the same day for intraday precision and six on three consecutive days for interday precision. As can be seen in Table 1, RSDs never exceeded 15.1%, which is quite an acceptable value and similar to those for microextraction in combination with UV [20,37,39] or MS detection [40].

As can be seen from Table 2, the accuracy of the proposed method was also acceptable. Thus, analyte recoveries ranged from 80 to 126% and were similar to or better than others reported elsewhere [25,37,38,41,42]. For example, our recoveries are consistent with those obtained by Rosado et al. [43] using GC–MS after SPE with a Strata™ X cartridge, but better than those of an existing method using magnetic hybrid nanoparticles for SPE and CE [44].

The presence of matrix effects was checked by using the following equation [45]:

$$\text{Matrix Effect} = \left(\frac{\text{Slope}_{\text{MP}} - \text{Slope}_{\text{urine}}}{\text{Slope}_{\text{MP}}}\right) \times 100 \qquad (2)$$

where Slope_{MP} is the slope of the calibration curve for the mobile phase and $\text{Slope}_{\text{urine}}$ that for each antidepressant in urine. A matrix effect greater than 20% is considered to be substantial. Ours ranged from 29% for mirtazapine to 77% for sertraline and thus required correction by using the standard addition method for calibration.

3.3 | Application to real samples

The proposed MEPS-UHPLC-PDA method was validated for forensic toxicological analyses by applying it to six urine samples from volunteers on antidepressants that were prepared as described in Section 2.3. Based on the results, two samples were negative for all six antidepressants and four were positive for one or more. Two of the positive samples contained venlafaxine at 0.405 ± 0.06 and 0.515 ± 0.05 μg/mL. The proposed method allows this antidepressant to be quantified at concentrations below its toxic (20 μg/mL) and lethal level (50–125 μg/mL) in urine [46]. Supporting Information Figure S4 shows the chromatogram for positive sample 1. Escitalopram was present at concentrations from 0.108 to 0.623 ± 0.06 μg/mL in two other samples. The samples were analyzed in duplicate, due to the limited amount of sample available, except one of them. The proposed method thus allowed the target analytes to be determined in real samples, which testifies to its usefulness for routine forensic toxicological analyses and antidepressant dose monitoring.

4 | CONCLUDING REMARKS

In this work, a selective MEPS procedure was used in combination with UHPLC-PDA to develop an effective method for the extraction and determination of the antidepressants mirtazapine, venlafaxine, escitalopram, fluvoxamine, fluoxetine, and sertraline in human urine samples. Using a C8–SCX mixed sorbent allowed low concentrations of the antidepressants in such a complex biological matrix as urine to be determined. The proposed method uses a low volume of sample (300 μL urine) and elution solvent (50 μL methanol); also, extraction takes less than 15 min and chromatographic analysis only 1.8 min. Unlike conventional SPE cartridges, which have to be discarded after a single use, the MEPS phase can be cleaned up and conditioned for reuse up to 70 times. The MEPS procedure was optimized with two experimental designs,

TABLE 2 Mean recoveries obtained for the six antidepressants by MEPS-UPLC-PDA

Compound	Mean Recovery (% ± SD) (n = 4)		
	QC Low 50 ng/mL	QC Intermedium 250 ng/mL	QC High 500 ng/mL
Mirtazapine	92 ± 4	107 ± 5	98 ± 3
Venlafaxine	80 ± 5	102 ± 5	98 ± 9
Escitalopram	92 ± 8	112 ± 6	102 ± 11
Fluvoxamine	115 ± 2	95 ± 7	102 ± 11
Fluoxetine	126 ± 0	98 ± 13	104 ± 10
Sertraline	122 ± 6	93 ± 5	98 ± 15

and the proposed method validated in accordance with international guidelines. Precision was good, and recovery and other quality-related parameters were quite acceptable. The proposed method was successfully used to quantify the target analytes in urine samples from six patients on antidepressants. Based on the results, the method can be used for the routine determination of these drugs at therapeutic concentrations in urine. Also, it could be adapted for analysis of other biological matrices such as plasma or blood.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Dirección General de Tráfico (Spanish Ministry of Interior), Project SPIP2015-01838, and the Spanish Ministry of Science and Innovation (Project AGL-2014-53647-R) and FEDER for their financial support. The authors would like to thank to MSD (Merck, Sharp & Dohme, Madrid, Spain) who provided mirtazapine standard.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

ORCID

Antonia M Carro https://orcid.org/0000-0002-5609-9690

REFERENCES

1. World Health Organization. Mental Health Atlas 2014. WHO Library. 2015.
2. Hammen, C., Risk factors for depression: an autobiographical review. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 2018, *14*, 1–28.
3. Cohen, Z. D., DeRubeis, R. J., Treatment selection in depression. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 2018, *14*, 209–236.
4. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Utilización de medicamentos antidepresivos en España durante el periodo 2000–2013. https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/informes.htm. Publication 14/01/2015 (last time accessed: February 20, 2018).
5. Roemmelt, A. T., Steuer, A. E., Kraemer, T., Liquid chromatography, in combination with a quadrupole time-of- flight instrument, with sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra acquisition: validated quantification of 39 antidepressants in whole blood as part of a simultaneous screening and quantification procedure. *Anal. Chem.* 2015, *87*, 9294–9301.
6. Park, S., Park, C.-S., Lee, S. J., Cha, B., Cho, Y. A., Song, Y., Yu, E -A., Kim, G -S., Jin, J. S., Abd El-Aty, A. M., El-Banna, H. A., Hacımüftüoğlu, A., Shim, J.-H., Shin, S. C., Development and validation of a high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for simultaneous determination of bupropion, quetiapine and escitalopram in human plasma. *Biomed. Chromatogr.* 2015, *29*, 612–618.
7. Petrides, A. K., Moskowitz, J., Johnson-Davis, K. L., Jannetto, P., Langman, L., Clarke, W., Marzinke, M., The development and validation of a turbulent flow-liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the simultaneous quantification of citalopram, sertraline, bupropion and hydroxybupropion in serum. *Clin. Biochem.* 2014, *47*, 73–79.
8. Zare, F., Ghaedi, M., Daneshfar, A., Ionic-liquid-based surfactant-emulsified microextraction procedure accelerated by ultrasound radiation followed by high-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of antidepressant and antipsychotic drugs, *J. Sep. Sci.* 2015, *38*, 844–851.
9. Alves, G., Rodrigues, M., Fortuna, A., Falcão, A., Queiroz, J., A critical review of microextraction by packed sorbent as a sample preparation approach in drug bioanalysis. *Bioanalysis* 2013, *5*, 1409–1442.
10. Chambers, E. E., Woodcock, M. J., Wheaton, J. W., Pekol, T. M., Diehl, D. M., Systematic development of an UPLC–MS/MS method for the determination of tricyclic antidepressants in human urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014, *88*, 660–665.
11. Zhang, L. Q., Wu, P. G., Jin, Q., Hu, Z. Y., Wang, J. L., Multi-residue analysis of sedative drugs in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2018, *1072*, 305–314.
12. Pietracci, E., Bermejo, A. M., Álvarez, I., Cabarcos, P., Balduini, W., Tabernero, M. J., Simultaneous determination of new-generation antidepressants in plasma by gas chromatography–mass spectrometry. *Forensic. Toxicol.* 2013, *31*, 124–132.
13. Papoutsis, I., Khraiwesh, A., Nikolaou, P., Pistos, C., Spiliopoulou, C., A fully validated method for the simultaneous determination of 11 antidepressants drugs in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012, *70*, 557–562.
14. Nabil, A. A. A., Nouri, N., Farajzadeh, M. A., Determination of three antidepressants in urine using simultaneous derivatization

and temperature-assisted dispersive liquid liquid microextraction followed by gas chromatography–flame ionization detection. *Biomed. Chromatogr.* 2015, *29*, 1094–1102.

15. Seidi, S., Yamini, Y., Rezazadeh, M., Combination of electromembrane extraction with dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatographic analysis as a fast and sensitive technique for determination of tricyclic antidepressants. *J. Chromatogr. B* 2013, *913*, 138–146.
16. Vlase, L., Imre, S., Leucuta, S., Determination of fluoxetine and its N-desmethyl metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Talanta* 2005, *66*, 659–663.
17. Saracino, M. A., Mercolini, L., Flotta, G., Albers, L. J., Merli, R., Raggi, M. A., Simultaneous determination of fluvoxamine isomers and quetiapine in human plasma by means of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 2006, *843*, 227–233.
18. Saber, A. L., On-line solid phase extraction coupled to capillary LC-ESI-MS for determination of fluoxetine in human blood plasma. *Talanta* 2009, *78*, 295–299.
19. Ito, R., Ushiro, M., Takahashi, Y., Saito, K., Ookubo, T., Iwasaki, Y., Nakazama, H., Improvement and validation the method using dispersive liquid–liquid microextraction with in situ derivatization followed by gas chromatography–mass spectrometry for determination of tricyclic antidepressants in human urine samples. *J. Chromatogr. B* 2011, *879*, 3714–3720.
20. Fernández, P., Taboada, V., Regenjo, M, Morales, L., Alvarez, I., Carro, A. M., Lorenzo, R. A., Optimization of ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction of six antidepressants in human plasma using experimental design. *J. Pharm. Biomed. Anal.*2016, *124*, 189–197.
21. Wózniakiewicz, M., Wietecha-Posłuszny, R., Moos, A., Wieczorek, M., Knihnicki, P., Kóscielniak, P., Development of microextraction by packed sorbent for toxicological analysis of tricyclic antidepressant drugs in human oral fluid. *J. Chromatogr. A* 2014, *1337*, 9–16.
22. Wietecha-Posluzny, R., Garbacik, A., Wozniakiewicz, M., Moos, A., Wieczorek, M., Koscielniak, P., Application of microextraction by packed sorbent to isolation of psychotropic drugs from human serum. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, *402*, 2249–2257.
23. De Souza, I. D., Domingues, D. S., Queiroz, M. E. C., Hybrid silica monolithic for microextraction by packed sorbent to determine drugs from plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 2015, *140*, 166–175.
24. Chaves, A. R., Leandro, F. Z., Carris, J. A., Queiroz, M. E. C., Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection. *J. Chromatogr. B* 2010, *878*, 2123–2129.
25. Magalhães, P., Alves, G., Llerena, A., Falcão, A., Therapeutic drug monitoring of fluoxetine, norfluoxetine and paroxetine: a new tool based on microextraction by packed sorbent coupled to liquid chromatography. *J. Anal. Toxicol.* 2017, *41*, 631–638.
26. Abdel-Rehim, M., Microextraction by packed sorbent (MEPS): a tutorial. *Anal. Chim. Acta* 2011, *701*, 119–128.
27. Fernández, P., González, M., Regenjo, M., Ares, A. M., Fernández, A. M., Lorenzo, R. A., Carro, A. M., Analysis of drugs of abuse in human plasma using microextraction by packed sorbents and ultra-high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2017, *1485*, 8–19.
28. Williams, J. R., The declaration of Helsinki and public health. *Bull, World Health Organ.* 2008, *86*, 650–651.
29. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2018 Silver Spring, Maryland. USA. http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm (last time accessed: January 20, 2018).
30. ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva. Switzerland. 2005. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf (last time accessed: January 20, 2018).
31. Yang, L., Said, R., Abdel-Rehim, M., Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): a review. *J. Chromatogr. B* 2017, *1043*, 33–43.
32. Moein, M. M., Abdel-Rehim, A., Abdel-Rehim, M., Microextraction by packed sorbent (MEPS). *Trac.-Trends Anal. Chem.* 2015, *67*, 34–44.
33. Lewis, G. A., Mathieu, D., Phan-Tan-Luu, R., Pharmaceutical Experimental Design. Marcel Dekker, New York. 1999.
34. Ryan, T. P., Modern experimental design. 1st ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 2007.
35. Mathieu, D., Noni, J., Phan-Tan-Luu, R. (2011). NemrodW®. Version 2011, LPRAI, Marseille. France.
36. Simpson, N. J. K., Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications. 1st ed. CRC Press. New York. 2000.
37. Alves, V., Gonçalves, J., Conceiçao, C., Teixeiram H. M., An improved analytical strategy combining microextraction by packed sorbent combined with ultra-high pressure liquid chromatography for the determination of fluoxetine, clomipramine and their active metabolites in human urine. *J. Chromatogr. A* 2015, *1408*, 30–40.
38. Rani, S., Kumar, A., Malik, A. K., Singh, B., Quantification of tricyclic and nontricyclic antidepressants in spiked plasma and urine samples using microextraction in packed syringe and analysis by LC and GC-MS. *Chromatographia* 2011, *74*, 235–242.
39. Asgharinezhad, A. A., Karami, S., Ebrahimzadeh, H., Shekari, N., Jalilian, N., Polypyrrole/magnetic nanoparticles composite as an efficient sorbent for dispersive micro-solid-phase extraction of antidepressant drugs from biological fluids. *Int. J. Pharm.* 2015, *494*, 102–112.
40. Zheng, M. M., Wang, S. T., Hu, W. K., Feng, Y. Q., In-tube solid-phase microextraction based on hybrid silica monolith coupled to liquid chromatography–mass spectrometry for automated analysis of ten antidepressants in human urine and plasma. *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 7493–7501.
41. Porto, C. E. D., Maia, P. P., de Freitas, D. F., Araujo, R. C. C., de Siqueira, M. E. P. B., Martins, I., dos Santos-Neto, A.J., Liquid-phase microextraction for simultaneous chromatographic analysis of three antidepressant drugs in plasma. *Quim. Nova* 2012, *35*, 72–76.

42. Bagheri, H., Banihashemi, S., Zandian, F. K., Microextraction of antidepressant drugs into syringes packed with a nanocomposite consisting of polydopamine, silver nanoparticles and polypyrrole. *Microchim. Acta* 2016, *183*,195–202.
43. Rosado, T., Gonçalves, A., Martinho, A., Alves, G., Duarte, A. P., Domingues, F., Silvestre, S., Granadeiro, L. B., Oliveira, V., Leitao, C., Gallardo, E., Simultaneous quantification of antidepressants and metabolites in urine and plasma samples by GC–MS for therapeutic drug monitoring. *Chromatographia* 2017, *80*, 301–328.
44. Murtada, K., de Andrés, F., Ríos, A., Zougagh, M., Determination of antidepressants in human urine extracted by magnetic multiwalled carbon nanotube poly (styrene-co-divinylbenzene) composites and separation by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2018, *39*, 1808–1815.
45. Peters, F. T., Remane, D., Aspects of matrix effects in applications of liquid chromatography–mass spectrometry to forensic and clinical toxicology—a review. *Anal. Bioanal. Chem.*2012, *403*, 2155–2172.
46. Repetto, M.-R., Repetto, M., Tabla de concentraciones de xenobióticos en fluidos biológicos humanos como referencia para el diagnóstico toxicológico (versión 2015). In: Repetto, M., editor. Ampliación de Toxicología de Postgrado 15, CD-ROM. Ilustre Colegio Oficial de Químicos. Sevilla, 2015.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Fuentes AMA, Fernández P, Fernández AM, Carro AM, Lorenzo RA. Microextraction by packed sorbent followed by ultra high performance liquid chromatography for the fast extraction and determination of six antidepressants in urine. *J Sep Sci* 2019;42:2053–2061. https://doi.org/10.1002/jssc.201900060

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Carbohydrate Polymers 220 (2019) 43–52

Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol

Cyclodextrin-functionalized cellulose filter paper for selective capture of diclofenac

Ana M. Ares[a], Raquel Muiño[a], Alejandro Costoya[b], Rosa A. Lorenzo[a], Angel Concheiro[b], Antonia M. Carro[a,*], Carmen Alvarez-Lorenzo[b,*]

[a] Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, and Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain
[b] Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, and Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
β-Cyclodextrin
Drug removal
Functionalized cellulose
Bioremediation
Sorptive extraction

ABSTRACT

An environmentally friendly and low-cost material based on cellulose filter paper modified with β-cyclodextrin (β-CD) was designed to uptake and elute drugs for water purification. To carry out the work, a β-CD derivative was first obtained through reaction of β-CD with *N*-(hydroxymethyl) acrylamide (NMA), and then β-CD-NMA was grafted on cellulose by means of the Fenton's reaction. The CD-grafted cellulose paper was characterized by ATR-FTIR analysis, SEM images, and mechanical properties. CD-functionalized (F1) and non-functionalized (NF) papers were tested in aqueous media containing an antibiotic (ciprofloxacin) or a non-steroidal anti-inflammatory drug (diclofenac) covering a wide range of salinity levels. Ciprofloxacin was similarly adsorbed by both papers through ionic interactions, while diclofenac was selectively and remarkably captured by the CD-functionalized filter (up to 25 mg g^{-1} from saline medium under biorelevant conditions; ca. 60 mg g^{-1} Langmuir isotherm model). Effects of diclofenac concentration, volume of medium, and incubation time on the amount adsorbed were investigated in detail. Elution tests involved the combination of several organic solvents and alkaline solutions and revealed that acetonitrile:NaOH 10 mM aq. solution (50:50, v/v) allows for an effective recovery of the previously trapped diclofenac. Application of ultrasounds shortened the process to 10 min. Reusability of F1 papers was also evaluated. Overall, the CD-grafted cellulose paper appears as a suitable material for bioremediation and analytical purposes.

1. Introduction

Nature conservation has a direct impact on our quality of life, wellbeing and health. In this regard, the spread use of human and veterinary medicines is becoming a relevant threat. Drugs can easily enter into the aquatic environment as micropollutants that may cause harmful effects on human health and aquatic organisms (Barbosa, Moreira, Ribeiro, Pereira, & Silva, 2016; Khan & Nicell, 2015; Verlicchi, Al Aukidy, & Zambello, 2012). After administering a medicine to humans or livestock, the drugs and their metabolites may be excreted via urine and feces and discharged into surface water through aquaculture or farm activities or into wastewater through home/hospital effluents (Azanu, Styrishave, Darko, Weisser, & Abaidoo, 2018; Johnson, Keller, Dumont, & Sumpter, 2015; Mirzaei et al., 2018; Rivera-Jaimes et al., 2018; Sticchi, Alberti, Artioli, Assensi, & Baldelli, 2018). Even using wastewater treatment plants (WWTP), drugs and metabolites may contaminate surface water, groundwater and even drinking water. Antibiotics and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are two widely prescribed groups of pharmaceuticals and, thus, common contaminants (Johnson et al., 2015; Pan & Chu, 2018; Rivera-Jaimes et al., 2018). Indeed, the Global Water Research Coalition considers both groups of substances as priority targets for occurrence studies (GWRC, 2008). Ciprofloxacin is a fluoroquinolone antimicrobial agent extensively used in both humans and livestock (Johnson et al., 2015; Mondal, Saha, & Sinha, 2018; Perini, Tonetti, Vidal, Montagner, & Nogueira, 2018). Diclofenac is a NSAID that reduces pain and fever, and its consumption has increased along with other NSAIDs (Moore & Derry, 2013). The list of substances for monitoring in the European Union according to Commission Implementing Decision (EU) 2018/840 (2018)Commission Implementing Decision (EU, 2018Commission Implementing Decision (EU) 2018/840 (2018) evidences the concerns on the presence of both ciprofloxacin and diclofenac in aquatic

* Corresponding authors.
E-mail addresses: tuchi.carro@usc.es (A.M. Carro), carmen.alvarez.lorenzo@usc.es (C. Alvarez-Lorenzo).

https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.055
Received 25 February 2019; Received in revised form 29 April 2019; Accepted 18 May 2019
Available online 20 May 2019
0144-8617/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

environment.

Removal of pharmaceutical compounds from aquatic environments is a challenge due to their characteristics of biotransformation and accumulation (Khan & Nicell, 2015; Perini et al., 2018). A variety of methods are being applied to remove micropollutants from wastewater such as biological degradation, chemical oxidation and physical removal processes in WWTP (Ahmed et al., 2017; Ganiyu, van Hullebusch, Cretin, Esposito, & Oturan, 2015). Nevertheless, current methods do not allow the complete removal of pharmaceutical compounds from wastewater (Barbosa et al., 2016; Verlicchi et al., 2012). Several alternative approaches are being tested for this purpose, such as sorption process (Gil, Santamaría, & Korili, 2018; Lucas, Castellet-Rovira, Villagrasa, Badia-Fabregat, & Barceló, 2018; Styszko et al., 2018), fabric phase sorptive extraction (FPSE) with sol-gel ion exchange coating (Kazantzi & Anthemidis, 2017; Samanidou & Kabir, 2015), active carbon (Mansour, Al-Hindi, Yahfoufi, Ayoub, & Ahmad, 2018), or magnetic nanoparticles (Hassani et al., 2018).

Cellulose, a homopolysaccharide of (β1→4) linked β-D-glucopyranose units, is one of the most abundant biopolymers available for the preparation of functional materials (Heinze & Liebert, 2001). It is a non-toxic, biodegradable, renewable and inexpensive material that offers outstanding performances for a large number of applications. Cellulose paper barely adsorbs contaminants by itself. However, chemically modified cellulose paper may enable the extraction of different compounds from aqueous media. Common filter paper has been used as support for the graft polymerization of monomers suitable for the uptake of codeine from urine samples (Hashemian, Khayamian, & Saraji, 2015) or nitrophenols from oil samples (Ye, Wu, & Wang, 2016). Interactions of the drug with the support usually rely on ionic interactions with the grafted polymer, although aptamer-like recognition has been reported (Carrasquilla, Little, Li, & Brennan, 2015; Chitpong & Husson, 2017; Hashemian et al., 2015). Both ionic and aptamer-like interactions are quite strong in the absence of salts, but become weak as the ionic strength of the medium increases (Kabir, Mesa, Jurmain, & Furton, 2017). This drawback could be solved using β-cyclodextrin (β-CD), a cyclic oligosaccharide of 7 D-glucopyranose units, as functional trapping agent. The peculiar structure of β-CD with a hydrophilic external surface and a hydrophobic central cavity allows the formation of inclusion complexes with a variety of molecules, including relatively hydrophobic pharmaceuticals (Celebioglu, Yildiz, & Uyar, 2017; Huang, Tang, Peng, Lai, & Zeng, 2017; Jansook, Ogawa, & Loftsson, 2018; Pose-Vilarnovo, Rodriguez-Tenreiro, dos Santos, Vazquez-Doval, & Concheiro, 2004). The inclusion complex formation is driven by an affinity constant that depends on a multi-mechanism of interactions (with participation of hydrophobic and hydrogen bonding), which can be tuned through the relative concentration of each component and the polarity of the external medium, among several other variables. Thus, in water complex formation occurs quite rapidly but it can be reversed by decreasing the polarity of the medium, as previously observed for hydrogels and electrospun mats (Alvarez-Lorenzo, García-González, & Concheiro, 2017; Jansook et al., 2018). Due to their versatility and unique properties, CDs have been investigated as components of polymer networks and metal particles composites for separations (Celebioglu et al., 2017; Huang et al., 2017; Sikder et al., 2019; Xiao, Weibel, Dudal, Corvini, & Shahgaldian, 2015; Zhang, Liu, Shi, Sun, & Niu, 2017). Grafting of CDs onto cellulose papers is receiving increasing interest since the paper is more flexible than other 2D substrates and can be handled more easily than nano and microstructures, while still offers a large binding surface. Indeed, the use of cellulose paper as support of metallic nanostructures bearing CD moieties has been explored as sensor of illegal substances (Wu et al., 2018).

The aim of this work was to design a cellulosic filter paper functionalized with β-CD for the removal, and subsequent analysis, of common pharmaceuticals from water and saline media. This work relies on the hypothesis of that functionalization of cellulose filter paper with β-CDs may transform the filter into an efficient trap for the removal of drugs that form inclusion complexes with the β-CD units, and since the drug/β-CD interactions do not rely on ionic interactions but on hydrophobic ones, the capture of the drug in saline medium should be as efficient at least as in non-saline medium. This cellulose paper-β-CD phase may represent a selective green approach to efficiently isolate pharmaceuticals from contaminated waters, which can be subsequently recovered from the paper for analysis while the paper could be reused for another water cleaning cycle. To the best of our knowledge, this is the first time that a CD-immobilized cellulose paper is reported for the selective extraction of diclofenac from aqueous medium. To carry out the work, first a derivative of β-CD was prepared (Siemoneit, Schmitt, Alvarez-Lorenzo, Luzardo, & Otero-Espinar, 2006) and then the grafting onto cellulose filter paper through the Fenton method (Vismara, Melone, Gastaldi, Cosentino, & Torri, 2009) was optimized (Fig. S1 in Supporting information). This method is simpler and involves fewer steps than those previously reported for the grafting of CDs to cellulose materials using click chemistry (Sun, Xiao, Qian, & An, 2019) or applying other pre-treatments of the cellulose under harsh conditions (Grgac & Malinar, 2018). Once the CD-functionalized filter was prepared, the effect of several variables (time, drug concentration, ionic strength, elution solvent,…) on diclofenac adsorption and desorption yields was tested. Selectivity was investigated using ciprofloxacin, which may also form inclusion complexes with β-CD with similar affinity constant ($278\ M^{-1}$ for ciprofloxacin (Jianbin, Liang, Hao, & Dongpin, 2002) vs. $100–400\ M^{-1}$ for diclofenac (Dargó, Boros, Péter, Malanga, & Sohajda, 2018)). Structural differences between both drugs are summarized in Table S1. Relevantly, the zwitterion character of ciprofloxacin has been previously exploited to design sorbent materials that combined both CDs and anionic moieties for efficient antimicrobial drug uptake (Blanco-Fernandez, Lopez-Viota, Concheiro, & Alvarez-Lorenzo, 2011; Dong et al., 2014). Differently, in the present study our purpose is to design a neutral sorptive material that avoids non-specific ionic binding, but efficiently uptake drugs forming inclusion complexes.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Cellulose filter (100% cellulose, coffee filter paper; grammage 50 g/m^2) was from Silvex (Portugal). β-CD was supplied by Roquette® (France). *N*-(hydroxymethyl) acrylamide (NMA), 37% hydrochloric acid (HCl), $FeSO_4{\cdot}7H_2O$, and ethanol were purchased from Merck® (Darmstadt, Germany). Acetonitrile and 2-propanol were obtained from Panreac Quimica (Barcelona, Spain). Acetone was from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA). Sodium chloride was obtained from Scharlau Cienytech (Barcelona, Spain). 30% H_2O_2 was supplied from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Sodium hydroxide was from VWR® International Eurolab (Barcelona, Spain). Diclofenac sodium was obtained from Guinama (Valencia, Spain). Ciprofloxacin hydrochloride monohydrate was purchased from Fagron® (Barcelona, Spain). Ultrapure water (Milli-Q apparatus from Millipore, Bedford, MA, USA) was used.

2.2. Synthesis of acrylamidomethyl-β-cyclodextrin (β-CD-NMA)

The CD derivative was prepared as previously reported (Siemoneit et al., 2006) with minor changes. Briefly, β-CD (14.98 g) and NMA (12.37 mL) were added to 50 mL of 1% HCl solution in an one-neck round bottom flask (250 mL), with a thermostatic bath and magnetic stirrer and heated at 80 °C for 30 min. Then, 300 mL of acetone was added to stop the reaction, forming a precipitate, and the system was kept at 4 °C for 24 h. The precipitate formed was filtered under vacuum, washed with 200 mL of acetone four times, and placed in a vacuum desiccator at room temperature for 24 h. Finally, β-CD-NMA was stored at 4 °C. The formation of β-CD-NMA was confirmed from elemental analysis (Fisons EA 1108, Italy) and ATR-FTIR spectrophotometry

(400–4000 cm^{-1}, Varian 670IR, USA).

2.3. Preparation of functionalized cellulose papers

The functionalization of cellulose paper with β-CD-NMA was performed following the Fenton´s procedure, adapting a previous method (Vismara et al., 2009). Cellulose filter paper was cut into square fragments (2 × 2 cm). Pieces of paper were transferred to an one-neck round bottom flask (500 mL) containing 150 mL of ultrapure water and kept for 10 min at 55 °C. Then 4 mL of 0.05 M $FeSO_4{\cdot}7H_2O$ (catalysts) and 25 mL of 30% H_2O_2 were added. The reaction was carried out at 55 °C for 25 min. Then 15 mL of β-CD-NMA aq. solution (0.125 M) was added, maintaining the temperature at 55 °C. After 15 min, the CD-functionalized (F1) paper pieces were removed from the flask with help of tweezers, washed twice with acetone (200 mL) and dried in an oven at 80 °C for 20 min. Finally, they were kept at 50 °C for 24 h.

As an alternative, papers were functionalized following a similar protocol but when the papers were transferred to water, all other reagents were immediately added and the temperature was set at 50 °C. These functionalized papers were designed as F2.

Grafting of cyclodextrin on the cellulose paper was confirmed by ATR-FTIR analysis (400–4000 cm^{-1}, Varian 670IR, USA). Scanning electron microscopy (SEM) images of pristine and functionalized papers were recorded in a FESEM Ultra Plus (Zeiss, Germany) at 3 kV after sputter coating with iridium.

2.4. Adsorption experiments

Dried functionalized F1 and F2 papers and non-functionalized (NF) control paper were evaluated for ciprofloxacin and diclofenac sorption from three aqueous media: ultra-pure water, 0.9% NaCl solution (simulating the ionic strength of biological fluids) and 3.5% NaCl solution (mimicking the salt concentration of seawater). Sorption experiments were carried out placing one previously weighed paper piece (2 × 2 cm) in each 20-mL glass vial containing 10 mL of aqueous ciprofloxacin hydrochloride solution (20 μg mL^{-1}) or diclofenac sodium solution (40 μg mL^{-1}). The pH of all solutions was recorded (Crison GLP22, Spain). The vials were placed in a VWR® Minishaker (Barcelona, Spain) with oscillatory movement (200 osc/min) at room temperature and kept for different periods of time (ranging from 1 to 5 days). The concentration of the remnant drug in the medium was determined from the absorbance of aliquots taken at different time intervals. The absorbance was immediately recorded in an UV–vis spectrophotometer (HP Agilent, Germany) at 276 nm, and the aliquots immediately returned to the corresponding vials. All experiments were conducted in 3–6 replicates. After loading, the papers were dried under a stream of nitrogen and individually stored in 5-mL Eppendorf® tubes until the desorption assay.

Diclofenac adsorption isotherms were obtained from sorption measurements recorded after immersion of F1 paper pieces (1 × 1 cm) in 10 mL of diclofenac sodium solutions of drug concentrations ranging from 6 to 100 μg mL^{-1} in 0.9% NaCl medium, following the protocol described above. The loading solutions were tested directly and also after pH adjustment to 10 by addition of NaOH. Langmuir and Freundlich isotherm models were fitted to the data, as reported before for other CD-grafted materials (Okoli, Adewuyi, Zhang, Diagboya, & Guo, 2014; Wang, Cui et al., 2019; Wang, Guo, An, Xiao, & Zhai, 2019), using the following equations.

Langmuir isotherm model:

$$A = S{\cdot}K{\cdot}C_{eq}/(1 + K{\cdot}C_{eq})$$

which was linearized as:

$$\frac{C_{eq}}{A} = \frac{1}{S{\cdot}K} + \left(\frac{1}{S}\right)C_{eq}$$

In these equations, A (mmol/g) represents the amount of diclofenac loaded per gram of paper piece, C_{eq} (mM) is the concentration at equilibrium, S is the number of adsorbing sites or the amount of diclofenac necessary to saturate the adsorbing sites, and K is the affinity of one adsorption site by a diclofenac molecule. From the intercept at zero C_{eq}, the overall affinity, SK, can be estimated.

Freundlich isotherm model:

$$A = K_F{\cdot}C_{eq}^{1/n}$$

which was linearized as:

$$Log\ A = Log\ K_F + \left(\frac{1}{n}\right)Log\ C_{eq}$$

In the Freundlich model, A (mmol/g) and C_{eq} have the same meaning as for Langmuir model, and K_F and n are empirical constants that indicate the Freundlich constant and the heterogeneity factor, respectively.

2.5. Desorption experiments

Diclofenac-loaded F1 and NF papers were placed in 20-mL glass vials with 5 mL of eluting solvents: purified H_2O, NaCl 0.9% aq. solution, HCl 10 mM aq. solution (pH 2), ethanol, ethanol:NaOH 10 mM aq. solution (50:50, v/v; pH 10), acetonitrile:NaOH 10 mM aq. solution (50:50, v/v; pH 10), 2-propanol, or 2-propanol:NaOH 10 mM aq. solution (50:50, v/v, pH 10). The pH of all solutions was recorded (Crison GLP22, Spain). All vials were shaken using a VWR® Minishaker (200 osc/min) for 24 h at room temperature. At certain time points, the elution medium was taken for absorbance measurement and replaced with the same volume of fresh solution. All experiments were performed for 3–6 replicates.

Alternatively, sonication was applied during the elution step using a Branson® Ultrasonic Bath (Düsseldorf, Germany). Diclofenac-loaded NF and F1 papers (after adsorption in drug solution in water) were placed into 20-mL glass vials with 5 mL of 2-propanol:NaOH 10 mM aq. solution (50:50, v/v) as desorption solvent. Vials were then placed in the ultrasound bath. After 0.1, 2, 5, 10 and 15 min sonication, the amount of diclofenac desorbed was determined recording the absorbance at 276 nm. All experiments were performed for 3–6 replicates.

2.6. Readsorption assay

Diclofenac-loaded F1 papers (in 10 mL of 40 μg mL^{-1} diclofenac in 3.5% NaCl aq. medium) were eluted in 5 mL of 2-propanol under shaking (200 osc/min) at room temperature. The absorbance was recorded at various time points. Then, the papers were transferred to vials containing water (5 mL, one day) and ethanol (5 mL, one day), dried at 40 °C (1.5 h) and stored. Afterwards, papers were transferred again to the adsorption solution (10 mL of 40 μg mL^{-1} diclofenac in 3.5% NaCl aq.) for reloading at room temperature and under shaking (200 osc/min) during 24 h, monitoring the absorbance in that time interval. The experiments were performed in triplicate.

2.7. Mechanical tests

Tear tests were carried out using a TA·XTPlus Stable Micro Systems Texture Analyser (UK). In each test, a piece of paper (2 × 2 cm) was placed between two clamps: one attached to the platform and the other connected to the moving arm of the device. The two clamps were set 8 mm apart. The piece of paper was pulled until breaking by using a load cell of 30 kg at a constant rate of elongation (1 mm s^{-1}). The maximum breaking force (N) was recorded and then transformed in tensile strength index dividing by the product of the paper width and its grammage. The experiments were carried out with NF and F1 papers as prepared (dried) and after diclofenac adsorption experiments in water and eluted in ethanol:NaOH 10 mM aq. solution (50:50, v/v) or acetonitrile:NaOH 10 mM aq. solution(50:50, v/v) and then air dried.

3. Results and discussion

3.1. Preparation and characterization of β-CD-modified cellulose paper

The effective grafting of β-CD to the cellulose paper required the previous synthesis of a β-CD derivative (see Scheme in Fig. S1). The formation of β-CD-NMA was confirmed by elemental analysis through the presence of N (0.41%), which is in good agreement with the substitution of only one hydroxyl group in each of the seven rings of the β-CD (considering that the MW of β-CD and β-CD-NMA are 1135.00 and 1940.91 g mol^{-1}, respectively; theoretical content in N 0.50%). Also, compared to pristine β-CD, the FTIR spectrum of β-CD-NMA showed three additional bands: two bands at 1709 and 1662 cm^{-1} due to the stretching of the amide I C═O and the amide II N−H, respectively, and a minor band at 1547 cm^{-1} corresponding to the stretching of C═C vinyl group (Fig. S2).

The reaction of β-CD-NMA with the cellulose paper pieces was confirmed by FTIR. Two slightly different functionalization protocols were followed varying the time of hydration of the papers. In the first reaction (F1), the material was hydrated for 10 min at 55 °C. In the second reaction (F2), there was no hydration time and the temperature was 50 °C. FTIR spectra of CD-modified papers showed an additional band at 1735 cm^{-1} due to the amide group of the grafted β-CD-NMA (Fig. 1). No differences were observed between F1 and F2. However, more reproducible results in the subsequent tests were observed for F1, and thus F2 was discarded.

Interestingly the appearance of F1 papers was similar to that of the control, non-functionalized paper. SEM pictures recorded at 1000× magnification did not show noticeable changes in the paper fibers after CD treatment (Fig. 2). However, a more detailed study at 50,000× and 100,000× revealed that F1 fibers had numerous globule-like nanostructures adhered on their surface. The diameter of these nanostructures ranged between 60 and 120 nm. It should be noted that the outer diameter of β-CD is about 1.54 nm and thus these nanostructures may correspond to aggregates of β-CD due to some chain growth during the grafting. β-CD-NMA has reactive functional groups (double bonds) that may facilitate the growth of poly-β-CD chains during the free radical grafting onto cellulose. This phenomenon is common to other monomers, and an increase in surface heterogeneity has been also reported after the grafting of glycidyl methacrylate onto cellulose filter paper (Tyagi, Tomar, & Singh, 2009).

3.2. Ciprofloxacin sorption/desorption tests

β-CD-functionalized papers were first tested regarding ciprofloxacin loading. As other fluoroquinolone drugs, ciprofloxacin is a zwitterionic molecule (Hernández-Borrel & Montero, 1997). At acidic pH, the amino and the carboxylic acid groups of the drug are protonated and the molecule exhibits an overall positive charge, while at pH > 8 the negatively charged carboxylic acid groups predominate. It should be noted that, at the concentration tested, the presence of ciprofloxacin did not modify the initial pH values of the aqueous medium and all samples had pH values in the 5.5–6.0 range. Both non-functionalized (NF) and functionalized (F1) paper pieces exposed to ciprofloxacin solutions (20 μg mL^{-1}) were able to uptake the drug in similar amounts, approx. 2.8 mg g^{-1} (Fig. 3). The amounts trapped by the papers were 35–40% of the total amount of ciprofloxacin initially in the medium. Thus, no relevant differences were observed between the functionalized and the control papers. Interestingly, these sorption values were similar to those previously reported for other cellulose materials (softwood fibers) soaked in ciprofloxacin concentrated solutions (2 mg mL^{-1}) (Dong et al., 2014). Also relevantly, pH 6.0 has been identified as the pH of maximum ciprofloxacin adsorption onto montmorillonite through electrostatic interactions (Roca Jalil, Baschini, & Sapag, 2015). At this pH, both positively charged and zwitterion molecules coexist at equal molar ratio. Further increase in pH up to 7.5 leads to zwitterion molecules solely and the solubility of ciprofloxacin becomes minimum, ca. 70 μg mL^{-1} (Olivera et al., 2011). Thus, the concentration of ciprofloxacin that we tested was above that found in conventional wastewater (in the μg L^{-1} range) but below the solubility coefficient to prevent drug precipitation during the tests.

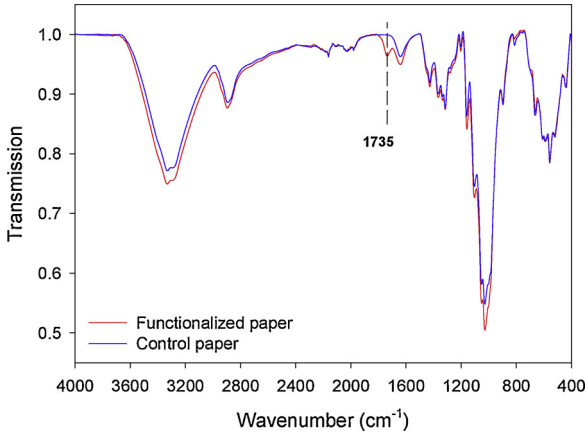


Fig. 1. FTIR spectra of non-functionalized (NF) control paper (blue line) and CD-functionalized paper (red line) showing an additional peak at 1735 cm^{-1}. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

The grafting of β-CD-NMA did not improve the adsorption probably because the already outstanding retention showed by the pristine cellulose paper. Some acid groups of cellulose filter paper may become partially ionized in the aqueous medium (Stana-Kleinschek, Ribitsch, Kreze, & Fras, 2002) being quite prone to interact with the positively charged ciprofloxacin hydrochloride molecules. It should be noted that bleaching and papermaking (applied to produce filter paper) generate anionic groups, mainly carboxyl and sulfonic acid groups, on the cellulose structure, which are permanently ionized in a wide pH values range (Fardim, Moreno, & Holmbom, 2005). This ionic interaction hypothesis was confirmed when the adsorption experiments were carried out in NaCl 0.9% medium (Fig. S3). The sorption capability decreased dramatically, compared to that previously recorded in purified water medium, due to the screening of the ionic interactions caused by the salt. Interactions with anionic groups also explain the increase in ciprofloxacin uptake previously reported for polymers combining CDs and carboxylic acid moieties (Blanco-Fernandez et al., 2011; Dong et al., 2014). Therefore, cellulose filter paper functionalized with β-CD does not seem to be a suitable material for selective removal of this drug, because ionic interactions surpass the binding through inclusion complexes.

Ciprofloxacin recovery from papers loaded by soaking in aqueous medium (Fig. 3 data) was investigated in ultrapure water, ethanol and HCl 10 mM solution (Fig. S4 in Supporting Information file). The results showed that nearly 100% of the amount of ciprofloxacin adsorbed by the CD-functionalized papers was eluted using HCl 10 mM solution, while NF control paper eluted 80% drug (Fig. S4 in Supporting information file). In the acidified medium, the ionic interactions with the cellulose become attenuated and the zwitteronic behavior of ciprofloxacin enhances the drug solubility, facilitating the transfer to the external aqueous environment.

3.3. Diclofenac sorption

Diclofenac sorption by F1 and NF papers was also investigated in aqueous media of different saline concentration along the time and using different volume medium and drug concentrations. All loading solutions had pH values in the 5.5–6.0 range. Then, suitable conditions for diclofenac recovery from the papers were identified by recording the effects of different experimental parameters on the extraction yield.

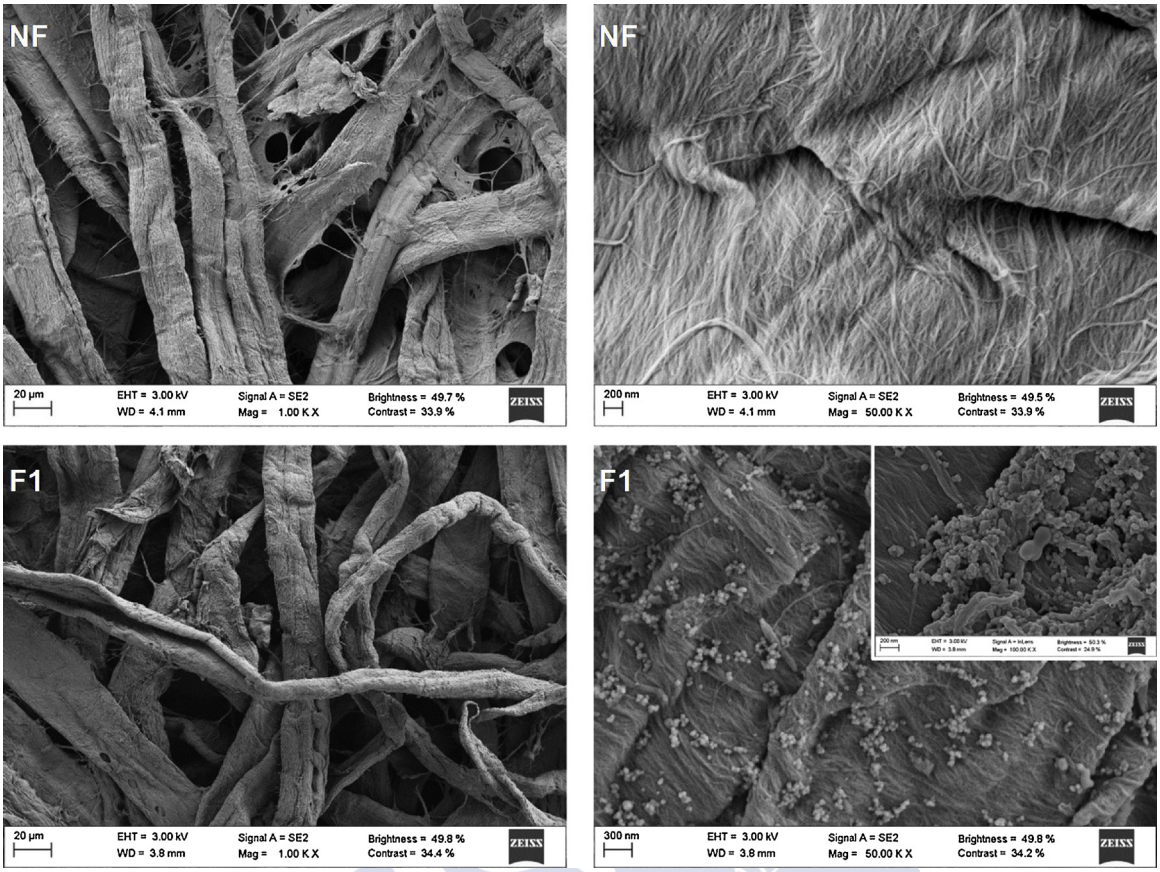


Fig. 2. SEM images of the structure of non-functionalized control paper (NF; first row) and CD-functionalized paper (F1; second row) recorded at 1000× (scale bar 20 µm) and 50,000× (scale bar 200 nm up, 300 nm down). The insert in F1 image was recorded at 100,000× (scale bar 200 nm).

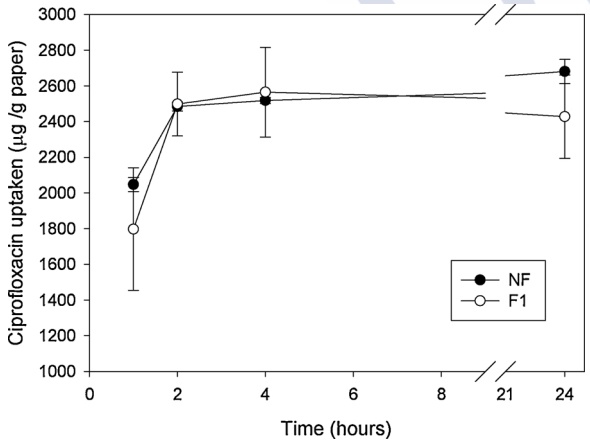


Fig. 3. Uptake of ciprofloxacin by non-functionalized (NF) control paper and CD-functionalized paper (F1) from a solution in water (20 µg mL^{-1}).

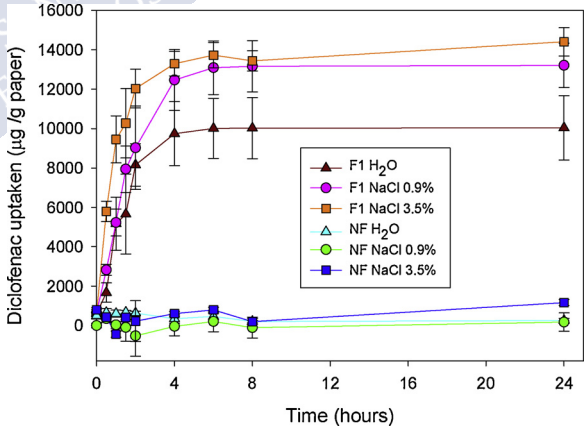


Fig. 4. Uptake of diclofenac by non-functionalized (NF) control paper and CD-functionalized paper (F1) from diclofenac solutions (40 µg mL^{-1}) prepared in water, NaCl 0.9% and NaCl 3.5%.

3.3.1. Ionic strength

First tests carried out in water (40 µg drug per mL) revealed that F1 was able to adsorb remarkably larger amounts of diclofenac (approx. 64% of total drug in the medium) than the NF paper which only captured a 1% of diclofenac from the medium (Fig. 4). This finding pointed out that this anionic drug (pKa = 4.15) has no affinity for cellulose itself (binding below 0.2 mg g^{-1}), probably because the ionic repulsions overcome potential hydrophobic interactions. At pH 5.5–6.0 diclofenac molecules are almost fully ionized and the solubility is two orders of magnitude larger than the intrinsic solubility recorded at pH 4 (approx. 32 µg mL^{-1}) (Pobudkowska & Domańska, 2014). Thus, in all loading tests diclofenac concentration was well below the solubility coefficient and no precipitation was observed. Moreover, further increase in pH would only cause minor increase in the ionized fraction. It should be noted that diclofenac is more lipophilic (Log $K_{o/w}$ = 1.90) (Scheytt, Mersmann, Lindstädt, & Heberer, 2005) than ciprofloxacin (Log $K_{o/w}$ = 0.28). Differently, the grafting of β-CD endowed the cellulose paper with remarkably high affinity for diclofenac (ca. 10 mg g^{-1}) which clearly surpassed that of ciprofloxacin. The aromatic rings of diclofenac can readily form inclusion complexes with the cyclodextrins, as previously reported (Sahra, Dinar, Seridi, & Kadri, 2015) and such high affinity is transferred to the cellulose support confirming that the grafted β-CDs are immobilized in a conformation that allows for a free

access of the drug to the cyclodextrin cavities.

In NaCl 0.9% medium, NF control paper did not absorb quantifiable amounts of diclofenac, while F1 paper increased even more the sorption capability trapping ˜75% of drug initially present in the medium. Likely, the ions caused a salting out effect that favored the drug-β-CD inclusion complex formation. Diclofenac adsorption from a more saline medium (NaCl 3.5%) mimicking seawater was also tested (Fig. 4). The results showed even enhanced drug capture by F1 paper (88%) while sorption by NF control paper was minor (7%). Therefore, an increase in ionic strength produced a positive effect on the capability of the functionalized papers to remove diclofenac from water. Overall, the grafting of β-CD was revealed to be a very effective tool for removing diclofenac from aqueous environments.

3.3.2. Adsorption time and adsorption medium volume

The evolution of the diclofenac sorption in the three aqueous media was monitored for 24 h for paper pieces immersed in 10 mL diclofenac (40 μg mL^{-1}) solutions (Fig. 4). The uptake of diclofenac occurred at an almost constant rate for the first 4 h and then minor increments were recorded for the next 24 h. Therefore, 4 h may be adequate for a remediation protocol. The papers containing diclofenac were dried under nitrogen stream and stored until desorption assay.

Subsequent diclofenac uptake experiments were carried out in water, maintaining the same mass of analyte (400 μg) but varying the volume of the medium and thus the drug concentration (Fig. S5 in Supporting information file); namely the paper pieces were exposed to the following environments: 10 μg mL^{-1} in a volume of 40 mL, 20 μg mL^{-1} in a volume of 20 mL, and 40 μg mL^{-1} in a volume of 10 mL. No significant differences were recorded after 4 h immersion.

Next experiment consisted in keeping constant diclofenac concentration (40 μg mL^{-1}) but varying the volume; 10, 20, 40 and 80 mL (Fig. 5). Immersion in the largest volumes (40–80 mL) allowed the functionalized papers to achieve the highest uptake, trapping 24–25 mg drug per gram of F1 paper. No further increase was observed when the volume raised from 40 mL to 80 mL, which suggest that the uptake equilibrium was reached under those conditions. In terms of uptake percentage, the removal efficiency was higher when a volume of 10 mL was used (62.4% removed from 10 mL compared to 29% removed from 40 mL, both at 4 h). Thus, F1 papers exposed to 10 mL of diclofenac solution (40 μg mL^{-1}) were chosen to elucidate the feasibility of quantitatively desorption of the drug and reuse of the paper.

3.3.3. Adsorption isotherms

Diclofenac adsorption isotherms were recorded to gain further insight into the affinity and saturation values of F1 papers (Fig. 6). The experiments were carried out in 0.9% NaCl medium, since this medium

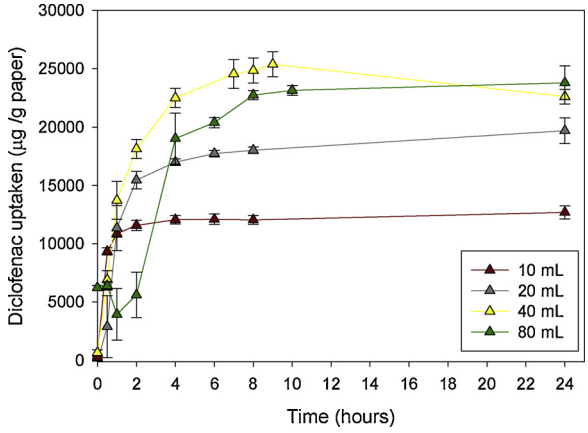


Fig. 5. Uptake of diclofenac by CD-functionalized paper (F1) from diclofenac solutions (40 μg mL^{-1}) prepared in water. The volume of the soaking medium is indicated in the legend.

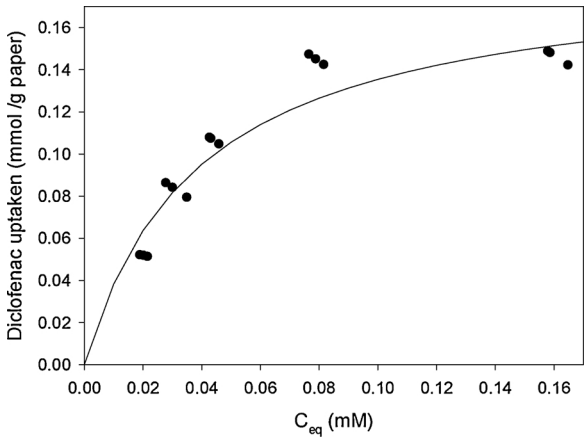


Fig. 6. Adsorption isotherm of diclofenac onto F1 paper (data points) and the fitting of the Langmuir model (line). The medium was 0.9% NaCl aqueous solutions at 20 °C.

facilitates the drug-F1 interactions (as shown in Fig. 4) and mimics better than water the ionic strength of aquatic environments and physiological fluids. Te effect of pH was evaluated by recording the amounts sorbed from the medium without pH adjustment (5.5–6.0) and from medium that was previously adjusted to pH 10. In this later medium, the amount sorbed was negligible. We observed that the F1 papers became inactivated after exposition to pH 10 medium (adjusted adding NaOH) for 24 h, since further washing with water and resorption tests in 0.9% NaCl medium revealed no uptake of diclofenac. This finding is in good agreement with the rupture of the amide bond of the grafted CDs, which is broken under alkaline conditions. Thus, the CDs are released from the F1 paper pieces.

Diclofenac adsorption thermodynamics from the non-adjusted 0.9% NaCl medium was analyzed applying Langmuir and Freundlich isotherm models, as reported before for other CD-grafted materials (Okoli et al., 2014; Wang, Cui et al., 2019; Wang, Guo et al., 2019). Langmuir fitting was better (R^2 = 0.9556) than that recorded for Freundlich model (R^2 = 0.6888).

According to the Langmuir model, the saturation, *S*, corresponded to 0.1886 mmol of diclofenac per·gram of paper (i.e., ca. 60 mg/g), and the affinity, *K*, was 25.467 mM^{-1}. Overall affinity was estimated to be 4.8031. Thus, assuming 1:1 inclusion complex, the amount of functional CDs can be estimated to be 214 mg g^{-1} paper. Previous reports on diclofenac adsorption onto coconut shell activated carbon led to saturation values of 103 mg g^{-1} (Vedenyapina, Stopp, Weichgrebe, & Vedenyapin, 2016). Therefore, F1 papers with *S* values of 60 mg g^{-1} are promising traps for this pollutant.

3.4. Diclofenac desorption

Once diclofenac was retained in the cellulosic material, suitable desorption conditions were investigated. The studies were first carried out with F1 and NF papers previously loaded with the drug by immersion in water solutions (i.e., in the absence of NaCl), which were transferred to ultrapure water or ethanol and kept at room temperature under stirring for 24–48 h. The average amount eluted from F1 papers was 14% and 29% using ultrapure water and ethanol, respectively. As expected, the diclofenac inclusion complexes were more stable in aqueous medium than in ethanol since the hydrophobic interactions are promoted in water, while ethanol can compete and displace diclofenac from the cyclodextrin cavity. Nevertheless, in good agreement with previous reports, ethanol has minor effect on the inclusion complex formation of diclofenac compared to other NSAIDs (Wei & Ju, 2003), which explains that complete elution from the β-CD functionalized paper was not achieved. For NF control paper, the elution was complete

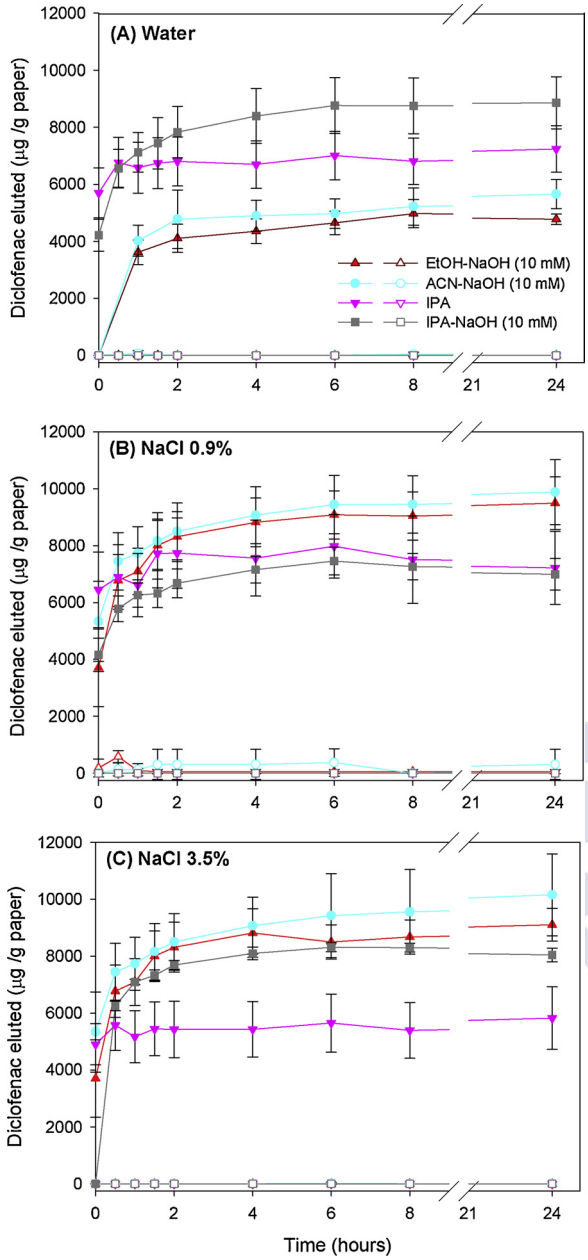


Fig. 7. Desorption kinetic curves recorded for CD-functionalized papers (full symbols) and control papers (NF; white symbols) that had previously loaded diclofenac by immersion in solutions prepared in (A) water, (B) NaCl 0.9% and (C) NaCl 3.5%. Extraction solvents evaluated were ethanol:NaOH 10 mM aq. solution (50:50, v/v) (red line), acetonitrile:NaOH 10 mM aq. solution(50:50, v/v) (cian line), 2-propanol (pink line), and 2-propanol:NaOH 10 mM aq. solution (50:50, v/v) (dark gray line). Legends shown in plot A are the same as for plots B and C. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

but nearly negligible because of the already low amount adsorbed.

Similarly, F1 papers that captured diclofenac from NaCl 0.9% medium were immersed in NaCl 0.9% medium or ethanol and the amount eluted quantified after 24–72 h under stirring. The average amounts eluted were 9% and 17%, respectively. In parallel, some preliminary elution tests were carried out in alkaline medium (NaOH 10 mM) in order to evaluate whether a change in pH could improve the elution of diclofenac. Batch desorption experiments confirmed that amount of diclofenac eluted per gram of paper increased with pH (up to ca. 30%). Elution in alkaline medium may occur because the drug-β-CD complex affinity attenuates as the drug is fully ionized.

To optimize the elution process conditions, the desorption study was expanded and F1 and NF papers that had been exposed to diclofenac solution (10 mL, 40 μg mL^{-1}) in the three saline aqueous media (0, 0.9% and 3.5% NaCl) were subjected to elution using four solvent media: ethanol (EtOH)-NaOH 10 mM (50:50 v:v), acetonitrile (ACN)-NaOH 10 mM (50:50 v:v), 2-isopropanol (IPA), and IPA-NaOH 10 mM (50:50 v:v) mixtures. Extraction kinetics was monitored along 24 h (Fig. 7). The elution equilibrium was reached in 4 to 6 h, depending on the medium. The equilibrium was reached earlier when the extraction medium was alkaline. The highest elution yield (73%) from papers loaded with diclofenac in purified water was obtained using IPA-NaOH 10 mM. For papers loaded in NaCl 0.9%, the best results were provided by ACN-NaOH 10 mM with ca. 72% elution yield, followed closely by EtOH-NaOH 10 mM. Similarly, desorption tests from papers loaded in NaCl 3.5% showed the best results (71% yield) in ACN-NaOH 10 mM. Acetonitrile was more efficient than ethanol or isopropanol due to its higher polarity. The combination of the organic solvent and the alkaline pH diminished the stability constant of the inclusion complex and may also trigger the rupture of the β-CD labile linker to the paper, causing a rapid release of the diclofenac captured by the β-CD- functionalized papers.

The use of ultrasound was evaluated as a way to accelerate the elution process. Papers loaded previously in diclofenac solutions (10 mL, 40 μg mL^{-1}) prepared in ultrapure water were eluted in 5 mL of IPA:NaOH 10 mM for 0.1, 2, 5, 10 and 15 min in an ultrasonic bath (Fig. 8a). Results revealed the effectiveness of the use of an ultrasonic bath for 10 min to elute the diclofenac from functionalized paper, with almost 66% desorbed without damage of the paper structure (Fig. 8b). When applied for 15 min, the percentage increased to 81%; however, the paper was destroyed in this interval of time (Fig. 8c). Comparison of results obtained using the orbital shaker and the ultrasonic bath (Fig. 8a) evidenced that the desorption percentage applying 10 min ultrasound was similar to the one recorded after 4 h in the orbital shaker. As expected, the mass transfer process from adsorbent to solution is favored by ultrasonic cavitation, shortening the time required for elution. However, if the CD-functionalized paper is intended for reuse,

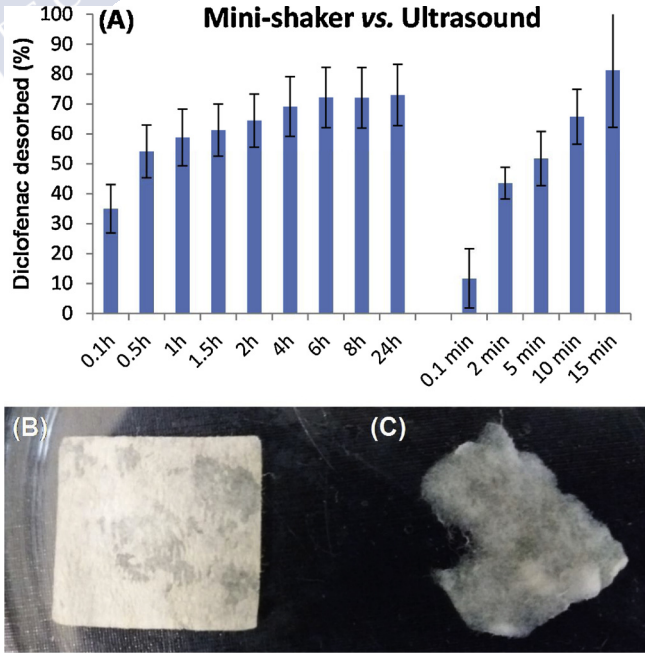


Fig. 8. (A) Percentage of diclofenac desorbed from the CD-functionalized paper in IPA:NaOH 10 mM (50:50 v:v) medium when the vials were shaken for several hours (data on the left from 0.1 to 24 h) or exposed to ultrasound for few minutes (data on the right from 0.1 to 15 min). Appearance of the CD-functionalized paper after (B) 10 min and (C) 15 min exposition to ultrasound.

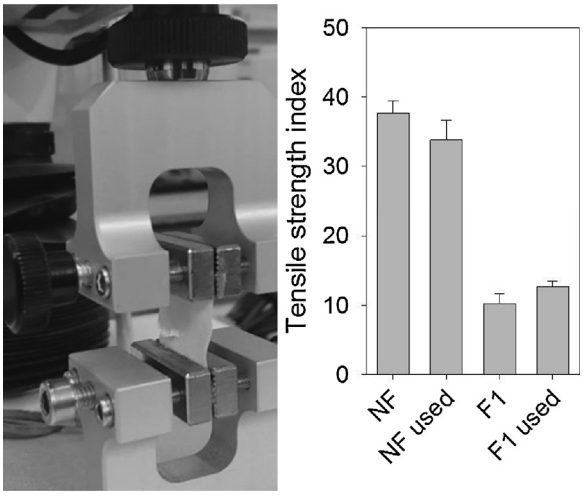


Fig. 9. Setup for the mechanical tests carried out until tearing with both control papers (NF) and CD-functionalized papers (F1) as prepared and after a full cycle of diclofenac adsorption, elution and air-drying.

the ultrasound step should be limited to 10 min.

3.5. Readsorption assay

Next, after the elution test, the F1 papers were challenged against another adsorption cycle in order to elucidate the reusability of the material. The same tests were carried out also with NF papers processed in the same way, used as controls. These F1 and NF papers had been exposed in the first cycle to diclofenac solution (10 mL, 40 μg mL^{-1}) in 3.5% NaCl aq. and eluted in 2-isopropanol medium. The use of NaOH was omitted in this elution protocol in order to avoid any damage on the cellulose and the β-CD grafting, but the paper pieces were further washed with water (one day) and ethanol (one day) to ensure complete removal of previously captured diclofenac and to enable the conditioning of the papers for the subsequent adsorption step.

Thus, papers were transferred again to the adsorption solution (10 mL of 40 μg mL^{-1} diclofenac in 3.5% NaCl aq.) at room temperature and kept under shaking (200 osc min^{-1}) during 24 h. F1 papers reloaded 9533 μg g^{-1} (s.d. 196 μg g^{-1}) after 4 h and 11,823 μg g^{-1} (s.d. 190 μg g^{-1}) after 24 h. These amounts were ca. 10% lower than those adsorbed in the first cycle. Nevertheless, the capability of the F1 papers to uptake diclofenac is still outstanding. In a second elution/readsorption cycle similar behavior was recorded. Therefore, the F1 papers could withstand at least two loading/elution cycles.

3.6. Mechanical tests

Finally, tearing tests were carried out to gain an insight into the effects of the CD-functionalization of the papers and the subsequent adsorption/elution cycles on the mechanical properties of the papers. To perform the analysis, pieces of NF and F1 papers were fixed using a pair of mini-tensile grips (Fig. 9). The maximum force at breaking was transformed into tensile strength index. The values recorded for the NF paper were in good agreement with those previously published for other cellulose filters (Huang, Chen, Lin, Yang, & Gerhardt, 2011; Li, Yang, Li, Lan, & Peng, 2017). CD-functionalization caused a decrease in the tensile strength index of the same order of magnitude as recorded for other surface treatments (Huang et al., 2011). Relevantly, adsorption/elution processing did not modify further the mechanical properties of F1 in good agreement with the behavior shown also by NF paper.

4. Conclusions

Grafting of β-CD transformed a common cellulose paper into a sorbent material that efficiently captured diclofenac from aqueous media. Differently to the ionic-based interactions with ciprofloxacin which were similar for both pristine and CD-functionalized papers, diclofenac was adsorbed through selective inclusion complex formation. Importantly, the diclofenac trapping performance was even favored in saline environment which expands the adequateness of the CD-functionalized paper for remediation and analytical applications. In absolute terms, the implemented CD-functionalization protocol rendered papers that had acceptable mechanical properties and were able to capture up to 25 mg diclofenac per gram in a relatively short time (4 h). Feasibility of recovery of the amount of diclofenac adsorbed (which can be speeded up applying ultrasound) adds value to the CD-functionalized papers as analytical phases that can concentrate the target drug for subsequent quantification. Moreover, reusability in subsequent adsorption/elution cycles may expand the lifespan of the functionalized filter.

Acknowledgements

This research was funded by MINECO [SAF2017-83118-R and RTI2018-096450-B-100], Agencia Estatal de Investigación (AEI) Spain, Xunta de Galicia [Grupo de Referencia CompetitivaED431C 2016/008; Agrupación Estratégica en Materiales-AEMATED431E 2018/08], and FEDER (Spain). R. Anton Segurado from RIAIDT at the University of Santiago de Compostela is acknowledged for help with the SEM analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.055.

References

Ahmed, M. B., Zhou, J. L., Ngo, H. H., Guo, W., Thomaidis, N. S., & Xu, J. (2017). Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review. *Journal of Hazardous Materials, 323*(Part A), 274–298. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.045.

Alvarez-Lorenzo, C., García-González, C. A., & Concheiro, A. (2017). Cyclodextrins as versatile building block for regenerative medicine. *Journal of Controlled Release, 268*, 269–281. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.10.038.

Azanu, D., Styrishave, B., Darko, G., Weisser, J. J., & Abaidoo, R. C. (2018). Occurrence and risk assessment of antibiotics in water and lettuce in Ghana. *Science of The Total Environment, 622*, 293–305. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.287.

Barbosa, M. O., Moreira, N. F. F., Ribeiro, A. R., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. (2016). Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water Research, 94*, 257–279. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.047.

Blanco-Fernandez, B., Lopez-Viota, M., Concheiro, A., & Alvarez-Lorenzo, C. (2011). Synergistic performance of cyclodextrin-agar hydrogels for ciprofloxacin delivery and antimicrobial effect. *Carbohydrate Polymers, 85*, 765–774. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.042.

Carrasquilla, C., Little, J. R. L., Li, Y. F., & Brennan, J. D. (2015). Patterned paper sensors printed with long-chain DNA aptamers. *Chemistry—A European Journal, 21*, 7369–7373. https://doi.org/10.1002/chem.201500949.

Celebioglu, A., Yildiz, Z. I., & Uyar, T. (2017). Electrospun crosslinked polycyclodextrin nanofibers: Highly efficient molecular filtration through host-guest inclusion complexation. *Scientific Reports, 7*, 7369. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07547-4.

Chitpong, N., & Husson, S. M. (2017). Polyacid functionalized cellulose nanofiber membranes for removal of heavy metals from impaired waters. *Journal of Membrane Science, 523*, 418–429.

Commission Implementing Decision (EU) 2018/840 of 5 June 2018 establishing a watch list of substances for union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Implementing Decision (EU) 2015/495. https://eur-lex.europa.eu/eli/dec_impl/2018/840/oj, (Accessed January 2019).

Dargó, G., Boros, K., Péter, L., Malanga, M., Sohajda, T., et al. (2018). Novel medium-throughput technique for investigating drug-cyclodextrin complexation by pH-metric titration using the partition coefficient method. *International Journal of Pharmaceutics, 542*, 100–107. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.03.004.

Dong, C., Ye, Y., Qian, L., Zhao, G., He, B., & Xiao, H. (2014). Antibacterial modification

of cellulose fibers by grafting β-cyclodextrin and inclusion with ciprofloxacin. *Cellulose, 21*, 1921–1932. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.042.
Fardim, P., Moreno, T., & Holmbom, B. (2005). Anionic groups on cellulosic fiber surfaces investigated by XPS, FTIR-ATR, and different sorption methods. *Journal of Colloid and Interface Science, 290*, 383–391. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.04.067.
Ganiyu, S. O., van Hullebusch, E. D., Cretin, M., Esposito, G., & Oturan, M. A. (2015). Coupling of membrane filtration and advanced oxidation processes for removal of pharmaceutical residues: A critical review. *Separation and Purification Technology, 156*(Part 3), 891–914. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.09.059.
Gil, A., Santamaría, L., & Korili, S. A. (2018). Removal of caffeine and diclofenac from aqueous solution by adsorption on multiwalled carbon nanotubes. *Colloid and Interface Science Communications, 22*, 25–28. https://doi.org/10.1016/j.colcom.2017.11.007.
Grgac, S. F., & Malinar, R. (2018). Application of environment-friendly processes aimed at bonding beta-cyclodextrine onto cellulosic materials. *Fibres & Textiles in Eastern Europe, 26*, 63–69. https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.2533.
GWRC (2008). *Development of an international priority list of pharmaceuticals relevant for the water cycle.* Available from:http://edepot.wur.nl/138086(Accessed January 2019).
Hashemian, Z., Khayamian, T., & Saraji, M. (2015). Anticodeine aptamer immobilized on a Whatman cellulose paper for thin-film microextraction of codeine from urine followed by electrospray ionization ion mobility spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 407*, 1615–1623. https://doi.org/10.1007/s00216-014-8392-5.
Hassani, A., Karaca, M., Karaca, S., Khataee, A., Açişili, Ö., & Yilmaz, B. (2018). Preparation of magnetite nanoparticles by high-energy planetary ball mil and its application for ciprofloxacin degradation through heterogeneous Fenton process. *Journal of Environmental Management, 211*, 53–62. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.01.014.
Heinze, T., & Liebert, T. (2001). Unconventional methods in cellulose functionalization. *Progress in Polymer Science, 26*, 1689–1762. https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00022-3.
Hernández-Borrel, J., & Montero, M. T. (1997). Calculating microspecies concentration of zwitterion amphoteric compounds: Ciprofloxacin as example. *Journal of Chemical Education, 74*, 1311–1314. https://doi.org/10.1021/ed074p1311.
Huang, L., Chen, K., Lin, C., Yang, R., & Gerhardt, R. A. (2011). Fabrication and characterization of superhydrophobic high opacity paper with titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Materials Science, 46*, 2600–2605. https://doi.org/10.1007/s10853-010-5112-1.
Huang, D., Tang, Z., Peng, Z., Lai, C., Zeng, G., et al. (2017). Fabrication of water-compatible molecularly imprinted polymer based on β-cyclodextrin modified magnetic chitosan and its application for selective removal of biasphenol A from aqueous solution. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 77*, 113–121. https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.04.030.
Jansook, P., Ogawa, N., & Loftsson, T. (2018). Cyclodextrins: Structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics, 535*, 272–284. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.018.
Jianbin, C., Liang, C., Hao, X., & Dongpin, M. (2002). Preparation and study on the solid inclusion complex of ciprofloxacin with β-cyclodextrin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 58*, 2809–2815. https://doi.org/10.1016/S1386-1425(02)00078-1.
Johnson, A. C., Keller, V., Dumont, E., & Sumpter, J. P. (2015). Assessing the concentrations and risks of toxicity from the antibiotics ciprofloxacin, sulfamethoxazole, trimethoprim and erythromycin in European rivers. *Science of The Total Environment, 511*, 747–755. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.055.
Kabir, A., Mesa, R., Jurmain, J., & Furton, K. G. (2017). Fabric phase sorptive extraction explained. *Separations, 4*, 1–21. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2016.10.020.
Kazantzi, V., & Anthemidis, A. (2017). Fabric sol–gel phase sorptive extraction technique: A review. *Separations, 4*, 1–20. https://doi.org/10.3390/separations4020020.
Khan, U., & Nicell, J. (2015). Human health relevance of pharmaceutically active compounds in drinking water. *AAPS Journal, 17*, 558–585. https://doi.org/10.1208/s12248-015-9729-5.
Li, H., Yang, J., Li, P., Lan, T., & Peng, L. (2017). A facile method for preparation superhydrophobic paper with enhanced physical strength and moisture-proofing property. *Carbohydrate Polymers, 160*, 9–17. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.018.
Lucas, D., Castellet-Rovira, F., Villagrasa, M., Badia-Fabregat, M., Barceló, D., et al. (2018). The role of sorption processes in the removal of pharmaceuticals by fungal treatment of wastewater. *Science of The Total Environment, 610–611*, 1147–1153. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.118.
Mansour, F., Al-Hindi, M., Yahfoufi, R., Ayoub, G. M., & Ahmad, M. N. (2018). The use of activated carbon for the removal of pharmaceuticals from aqueous solutions: A review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 17*, 109–145. https://doi.org/10.1007/s11157-017-9456-8.
Mirzaei, R., Yunesian, M., Nasseri, S., Gholami, M., Jalilzadeh, E., Shoeibi, S., et al. (2018). Occurrence and fate of most prescribed antibiotics in different water environments of Tehran, Iran. *Science of The Total Environment, 619–620*, 446–459. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.272.
Mondal, S. K., Saha, A. K., & Sinha, A. (2018). Removal of ciprofloxacin using modified advanced oxidation processes: Kinetics, pathways and process optimization. *Journal of Cleaner Production, 171*, 1203–1214. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.091.
Moore, R. A., & Derry, C. (2013). Efficacy of OTC analgesics. *International Journal of Clinical Practice, 67*, 21–25. https://doi.org/10.1111/ijcp.12054.
Okoli, C. P., Adewuyi, G. O., Zhang, Q., Diagboya, P. N., & Guo, Q. (2014). Mechanism of dialkyl phthalates removal from aqueous solution usingγ-cyclodextrin and starch based polyurethane polymer adsorbents. *Carbohydrate Polymers, 114*, 440–449.
Olivera, M. E., Manzo, R. H., Junginger, H. E., Midha, K. K., Shah, V. P., Stavchansky, S., et al. (2011). Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Ciprofloxacin hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 100*, 22–33. https://doi.org/10.1002/jps.22259.
Pan, M., & Chu, L. M. (2018). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in soils from wastewater irrigation areas in the Pearl River Delta region, southern China. *Science of The Total Environment, 624*, 145–152. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.008.
Perini, J. A. L., Tonetti, A. L., Vidal, C., Montagner, C. C., & Nogueira, R. F. P. (2018). Simultaneous degradation of ciprofloxacin, amoxicillin, sulfathiazole and sulfamethazine and disinfection of hospital effluent after biological treatment via photo-Fenton process under ultraviolet germicidal irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental, 224*, 761–771. https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.11.021.
Pobudkowska, A., & Domańska, U. (2014). Study of pH-dependent drugs solubility in water. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly, 20*, 115–126. https://doi.org/10.2298/CICEQ120531116P.
Pose-Vilarnovo, B., Rodriguez-Tenreiro, C., dos Santos, J. F. R., Vazquez-Doval, J., Concheiro, A., et al. (2004). Modulating drug release with cyclodextrins in hydroxypropyl methylcellulose gels and tablets. *Journal of Controlled Release, 94*, 351–363. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.10.002.
Rivera-Jaimes, J. A., Postigo, C., Melgoza-Alemán, R. M., Aceña, J., Barceló, D., & López de Alda, M. (2018). Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. *Science of The Total Environment, 613–614*, 1263–1274. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.134.
Roca Jalil, M. E., Baschini, M., & Sapag, K. (2015). Influence of pH and antibiotic solubility on the removal of ciprofloxacin from aqueous media using montmorillonite. *Applied Clay Science, 114*, 69–76. https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.05.010.
Sahra, K., Dinar, K., Seridi, A., & Kadri, M. (2015). Investigation on the inclusion of diclofenac with β-cyclodextrin: A molecular modeling approach. *Structural Chemistry, 26*, 61–69. https://doi.org/10.1007/s11224-014-0468-5.
Samanidou, V. F., & Kabir, A. (2015). Fabric phase sorptive extraction in pharmaceutical analysis. *Pharmaceutica Analytica Acta, 6*, e177. https://doi.org/10.4172/21532435.1000e177.
Scheytt, T., Mersmann, P., Lindstädt, R., & Heberer, T. (2005). 1-Octanol/water partition coefficients of 5 pharmaceuticals from human medical care: Carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, and propyphenazone. *Water, Air, and Soil Pollution, 165*, 3–11. https://doi.org/10.1007/s11270-005-3539-9.
Siemoneit, U., Schmitt, C., Alvarez-Lorenzo, C., Luzardo, A., Otero-Espinar, F., et al. (2006). Acrylic/cyclodextrin hydrogels with enhanced drug loading and sustained release capability. *International Journal of Pharmaceutics, 312*, 66–74. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.12.046.
Sikder, M. T., Rahman, M. M., Jakariya, M., Hosokawa, T., Kurasaki, M., & Saito, T. (2019). Remediation of water pollution with native cyclodextrins and modified cyclodextrins: A comparative overview and perspectives. *Chemical Engineering Journal, 355*, 920–941. https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.218.
Stana-Kleinschek, K., Ribitsch, V., Kreze, T., & Fras, L. (2002). Determination of the adsorption character of cellulose fibres using surface tension and surface charge. *Materials Research Innovations, 6*, 13–18. https://doi.org/10.1007/s10019-002-0168-4.
Sticchi, C., Alberti, M., Artioli, S., Assensi, M., Baldelli, I., et al. (2018). Regional point prevalence study of healthcare-associated infections and antimicrobial use in acute care hospitals in Liguria, Italy. *Journal of Hospital Infection, 99*, 8–16. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.12.008.
Styszko, K., Szczurowski, J., Czuma, N., Makowska, D., Kwastler, M., & Uruski, Ł. (2018). Adsorptive removal of pharmaceuticals and personal care products from aqueous solutions by chemically treated fly ash. *International Journal of Environmental Science and Technology, 15*, 493–506. https://doi.org/10.1007/s13762-017-1415-y.
Sun, L. J., Xiao, G. F., Qian, X. R., & An, X. H. (2019). Alkyne functionalized cellulose fibers: A versatile "clickable" platform for antibacterial materials. *Carbohydrate Polymers, 207*, 68–78. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.068.
Tyagi, C., Tomar, L. K., & Singh, H. (2009). Surface modification of cellulose filter paper by glycidyl methacrylate grafting for biomolecule immobilization: Influence of grafting parameters and urease immobilization. *Journal of Applied Polymer Science, 111*, 1381–1390. https://doi.org/10.1002/app.28933.
Vedenyapina, M. D., Stopp, P., Weichgrebe, D., & Vedenyapin, A. A. (2016). Adsorption of diclofenac sodium from aqueous solutions on activated carbon. *Solid Fuel Chemistry, 50*, 46–50.
Verlicchi, P., Al Aukidy, M., & Zambello, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Science of The Total Environment, 429*, 123–155. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028.
Vismara, E., Melone, L., Gastaldi, G., Cosentino, C., & Torri, G. (2009). Surface functionalization of cotton cellulose with glycidyl methacrylate and its application for the adsorption of aromatic pollutants from wastewate. *Journal of Hazardous Materials, 170*, 798–808. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.05.042.
Wang, Z., Cui, F., Pan, Y., Hou, L., Zhang, B., Li, Y., et al. (2019). Hierarchically micro-mesoporous β-cyclodextrin polymers used for ultrafast removal of micropollutants from water. *Carbohydrate Polymers, 213*, 352–360. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.021.
Wang, X. L., Guo, D. M., An, Q. D., Xiao, Z. Y., & Zhai, S. R. (2019). High-efficacy adsorption of Cr(VI) and anionic dyes onto beta-cyclodextrin/chitosan/hexamethylenetetramine aerogel beads with task-specific, integrated components. *International Journal of Biological Macromolecules, 128*, 268–278. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.139.
Wei, W., & Ju, H. X. (2003). Affinity capillary electrophoresis studies on the influence of

alcohols on the interaction of β-cyclodextrin with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Chromatographia, 58*, 449–453. https://doi.org/10.1365/s10337-003-0093-8.
Wu, M., Li, P., Zhu, Q., Wu, M., Li, H., & Lu, F. (2018). Functional paper-based SERS substrate for rapid and sensitive detection of Sudan dyes in herbal medicine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 196*, 110–116. https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.02.014.
Xiao, P., Weibel, N., Dudal, Y., Corvini, P. F. X., & Shahgaldian, P. (2015). A cyclodextrin-based polymer for sensing diclofenac in water. *Journal of Hazardous Materials, 299*, 412–416. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.06.047.
Ye, C., Wu, Y., & Wang, Z. (2016). Modification of cellulose paper with polydopamine as a thin film microextraction phase for detection of nitrophenols in oil samples. *RSC Advances, 6*, 9066–9071. https://doi.org/10.1039/C5RA23232E.
Zhang, J., Liu, D., Shi, Y., Sun, C., Niu, M., et al. (2017). Determination of quinolones in wastewater by porous β-cyclodextrin polymer based solid-phase extraction coupled with HPLC. *Journal of Chromatography B, 1068–1069*, 24–32. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.09.046.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Talanta 174 (2017) 454–461

Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

A fast bioanalytical method based on microextraction by packed sorbent and UPLC–MS/MS for determining new psychoactive substances in oral fluid

A.M. Ares[a], P. Fernández[b], M. Regenjo[a], A.M. Fernández[c], A.M. Carro[a,*,1], R.A. Lorenzo[a,*,1]

[a] Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry and Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain
[b] Institute of Forensic Sciences, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain
[c] Drug Addiction Assistance Unit, Monforte de Lemos, 27400 Lugo, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Synthetic cathinones
New psychoactive substances
Microextraction by packed sorbent (MEPS)
Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS)
Oral fluid

ABSTRACT

The emergence in recent years of potentially dangerous new psychoactive substances (NPS) that are not under international control has led to the development of multi-analyte procedures for their unequivocal quantification. A fast ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method (UPLC-MS/MS), in combination with a sample pretreatment based on microextraction by packed sorbent (MEPS), was for the first time used in this work for the simultaneous determination of NPS in oral fluid. This matrix is an effective alternative to typical biological samples for drug control in substitution therapy programs, and also for the prevention and reduction of traffic accidents. The proposed method allowed the separation and quantification of eleven synthetic cathinones, six opiates, scopolamine, cocaine and two metabolites in less than 3.0 min by using appropriate isotope-labelled internal standards. The MEPS procedure, which is a miniaturized version of the SPE technique, is completed within 15 min. The influence of variables such as the washing solution and eluent volumes, phase type, number of aspirate–dispense cycles and pH was investigated by using a $3^4 4^1//16$ asymmetric screening design and a response surface methodology based on a Doehlert design. The MEPS process performed optimally with a mixed-mode C8/SCX sorbent and a sample pH of 9. The proposed method was validated according to major guidelines and found to span the linear concentration range 0.5–500 ng mL^{-1} ($R^2 \geq 0.9903$), and to be selective and precise (within- and between-day precision as %RSD were both lower than 13.7%). The accuracy, in terms of analyte extraction recovery, ranged from 75% to 125% for most of the analytes. The MEPS-UPLC–MS/MS method was successfully used to analyse twelve real samples from patients on a drug detoxification programme and proved an effective tool for drug monitoring.

1. Introduction

The overall number of users of illicit drugs has increased steadily since the late 1990s. However, the use of classical drugs of abuse levelled off in 2009, whereas that of new psychoactive substances (NPS) has continued to grow. The risks and adverse effects of illicit drugs on public health have been the subject of a World Drug Report [1]. Cocaine is the most commonly used illicit stimulant drug in Europe and the most prevalent in south-western European countries. Although heroin is the most widely used opioid, consumption of synthetic opioids such as methadone, buprenorphine and naloxone, and their use in replacement therapies, has also increased in recent years. Over the last decade, new synthetic drugs that are escaping international control such as cathinones have emerged and their abuse led to increased hospital emergency admissions and even some deaths [2]. Cathinone is a beta-keto amphetamine analogue with stimulant properties, present in the leaves of *Catha edulis* ("Khat" bush). Synthetic cathinones are frequently used as substitutes for controlled stimulants such as amphetamine, MDMA (ecstasy) and cocaine, and are sold as either legal substitutes or as substances under no drug regulation. Between 2005 and 2014, more than 80 cathinone derivatives were reported to the EU Early Warning System (EWS) [3,4]. In

* Correspondence to: Dep. Química Analítica, Nutrición y Bromatología Facultad de Química, Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), Avda de las Ciencias S/N, 15782 Santiago de Compostela, Spain.
E-mail addresses: tuchi.carro@usc.es (A.M. Carro), rosaantonia.lorenzo@usc.es (R.A. Lorenzo).
[1] These two authors contributed equally to this work and should be considered as co-final author.

http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.022
Received 9 March 2017; Received in revised form 8 June 2017; Accepted 9 June 2017
Available online 20 June 2017
0039-9140/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

addition, there has been an increasing number of patients admitted to emergency departments after undergoing chemical submission to manipulate their will or to modify their behavior for criminal purposes. One of the most commonly used substances in this context is scopolamine, which causes memory loss to perpetrate drug-facilitated robberies, traffic accidents and sexual assaults [5].

Oral fluid (OF) is an effective, advantageous alternative to typical biological matrices for drug analysis. Thus, it can be easily obtained in a rapid, non-invasive manner, is much more difficult to adulterate than urine, has a lower risk of infection than blood and is a better indicator of recent drug consumption [6].

The growing interest in using NPS and their hazards to public health have promoted the development of selective analytical methods for their determination (especially because most NPS go undetected in drug screening tests on drivers suspected of being under the influence of drugs). Confirmatory techniques for the quantification of various drugs of abuse in biological fluids include gas chromatography–mass spectrometry [7–10] and liquid chromatography–mass spectrometry [11–20]. Usually, samples are prepared by using liquid–liquid extraction (LLE) [8,9,15,21,22] or solid phase extraction (SPE) [10–12,14,16,17] to preconcentrate the target drugs. Recent developments in sample treatment have largely been aimed at miniaturization and automation. Microextraction by packed sorbent (MEPS) is a miniaturized version of SPE with some advantages over the parent technique including short extraction times, reduced sample and solvent consumption and easy operation. In MEPS, a sorbent is directly packed into a small cartridge that is placed between the body and needle of a syringe [23–26]. A sorbent washing step is used after the analytes are eluted to avoid reduce carry-over effect, thereby allowing the MEPS sorbent to be re-used up to 90 times with OF. This technique has been used in analyses for various compounds such as antidepressants [27], anesthetics [28], parabens [29], NSAIDs [30], fluoroquinolones [31] and drug associations [32] in biological fluids. As regards illicit drugs, however, MEPS has only been used to determine methadone in urine [7] and blood spots [20], cannabinoids in OF [19], and opiates and codeine metabolites in urine [33]. Also, to the best of our knowledge, only one MEPS-LC–MS/MS method for determining multi-class drugs (cocaine, amphetamines, natural and synthetic opioids and hallucinogens) in OF has to date been reported [18].

An experimental design is a chemometric tool for estimating the effect of potentially influential factors on the analytical response. Screening designs allow the most influential factors to be identified with a relatively small number of experiments, and response surface designs are typically used to find the optimum values of the major variables [34].

The supply and consumption of NPS is a dynamic problem, and a risk to public health and road safety. Effectively controlling NPS use is a tough practical and bioanalytical challenge. The proposed method is a confirmatory tool for quantifying trace amounts of illicit drugs previously detected in screening tests on drivers. Also, it affords quantification of NPS that cannot be identified with screening tests. In this work, a total of eleven cathinones, six opiates, cocaine and two cocaine-related compounds, and scopolamine were simultaneously extracted from OF by MEPS for their determination by UPLC–MS/MS. An asymmetric screening design and a Doehlert design were used to examine the influence of selected variables with a view to optimizing the MEPS procedure. The ensuing validated method was successfully used to analyse real samples from patients on a drug detoxification programme.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and materials

Morphine (MOR), 6-monoacetylmorphine (6-MAM), cocaine (COC), cocaethylene (COCET), benzoylecgonine (BEG), methadone (METHA), 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP), methylenedioxypyrovalerone (MDPV), mephedrone (MEP), methylone (MET), buprenorphine (BUP), naloxone (NAL), pentedrone (PENT), ethylone (ETH), butylone (BUT), ethylcathinone (ETCAT), ethylcathinone ephedrine metabolite (ETCATEP), methylephedrine metabolite (METEP), pyrovalerone (PYR), flephedrone (FLE) and scopolamine (SCO), all at a 1 mg mL^{-1} concentration, and the internal standards (IS) 6-MAM-d3, COC-d3, COCET-d8, BEG-d8, METHA-d9, EDDP-d3, MDPV-d8, MEP-d3, BUP-d4, NAL-d5, ETH-d5, BUT-d3, ETCATEP-d5, METEP-d3 (100 μg mL^{-1}), were obtained from Cerilliant (Round Rock, TX, USA).

Acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), methylene chloride, 2-propanol, formic acid, acetic acid and ammonium hydroxide were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) in LC–MS grade. Water was purified by passage through a Milli-Q apparatus from Millipore (Bedford, MA, USA). Analytes were extracted by using an eVol® XR digital analytical syringe (100 and 500 μL) packed with sorbent material (C8, octyl-silica; C18, octadecyl-silica; or M1, a mixed mode sorbent containing 80% C8 and 20% SCX strong cation exchanger) from SGE Analytical Science (SGE Europe, Ltd., Chester, United Kingdom). PTFE syringe filters or 0.22 μm pore size were purchased from Membrane Solutions (Dallas, TX, USA). A Minicen centrifuge supplied by Orto Alresa (Ajalvir, Madrid, Spain) was also used.

2.2. Standard stock solutions, calibration and QC samples

Individual stock solutions for each drug were prepared at a 1 mg mL^{-1} concentration (100 μg mL^{-1} for the internal standards) in methanol. All solutions were stored at −20 °C. Working-strength solutions were prepared by dilution of the stock solutions in mobile phase: 0.1% formic acid in water (A) or acetonitrile (B), 90:10 (v:v). Calibration curves were constructed at eight different concentration levels by spiking blank OF with appropriate aliquots of the working-strength solutions to a final concentration within the range 0.5–100 ng mL^{-1}. The internal standards were added at 25 ng mL^{-1}. In-house procedures using quality control (QC) samples at different concentration levels and various OF matrices were used to check for performance characteristics. Precision was assessed by using 5, 25 and 100 ng mL^{-1} QC samples for the low, middle and high concentration levels that were stored refrigerated at 4 °C. QC samples for assessing process efficiency were prepared at four different concentration levels (10, 25, 50 and 100 ng mL^{-1}) in fortified OF matrix. The MEPS procedure was optimized by spiking a drug-free matrix blank with a 100 ng mL^{-1} concentration of each drug.

A phosphate buffer (50 mM, pH 9) was prepared by dissolving 3.4 g of potassium dihydrogen phosphate in 0.5 L of Milli-Q water and adjusting to pH 9.0 with potassium hydroxide.

2.3. Sample collection

Drug-free oral fluid was collected from healthy volunteers, using a device from Salivette® (Sarstedt, Germany). The device includes a cotton swab for direct insertion into the mouth. The swab should not be touched with the fingers; rather, it should be gently chewed by the donors and rolled around their mouth for 2 min before it is transferred to its tube for centrifugation and storage at −20 °C until analysis.

All tests were performed in accordance with the Committee on Research Ethics of Galicia (Spain) and complied with the principles of the Helsinki Declaration [35].

2.4. Sample preparation and MEPS procedure

Oral fluid samples were pretreated to remove potential interferents such as proteins, food debris and air bubbles. For this purpose, a volume of 300 μL of oral fluid spiked with the analytes was mixed with 200 μL of methanol and shaken by hand for 30 s. The resulting solution was centrifuged at 15,596 × *g* for 5 min. Then, 300 μL of supernatant

was diluted with 200 µL of phosphate buffer (50 mM, pH 9) and centrifuged at 15,596 × *g* for 5 min to remove any traces of proteins, which might have blocked the sorbent phase.

The MEPS procedure was performed by using eVol® hand-held automated analytical syringes (500 and 100 µL). The needle was fitted with a barrel insert containing 4 mg of a mix-mode sorbent: C_8 mixed with a strong cation exchanger (C_8/SCX). The sorbent was conditioned with 100 µL of methanol first and 100 µL of water then. An aliquot of 100 µL of pretreated OF sample was passed through the sorbent by aspirating and dispensing the same aliquot six times at 10 µL s^{-1} in order to increase retention of the analytes. Then, the sorbent was washed with 50 µL of water/methanol 90:10 (v:v) at 20 µL s^{-1} to remove interferences and dried for 0.5 min, after which retained analytes were eluted with 90 µL of dichloromethane / 2-propanol / ammonium hydroxide (78:20:2, v:v:v) at 10 µL s^{-1}. The extract thus obtained was evaporated under a nitrogen stream at 40 °C and reconstituted in 50 µL of mobile phase. 5 µL of reconstituted extract was then injected into the UPLC–MS/MS instrument for analysis.

In order to reduce memory effects, the sorbent was washed with 100 µL of eluent, 100 µL of methanol, 100 µL of water (four times), 100 µL of a 0.1% formic acid solution (four times) and 100 µL of methanol (four times) at 20 µL s^{-1} between extractions.

2.5. LC–MS/MS analysis and operating conditions

The target analytes were determined by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Chromatographic separation was performed on an Acquity UPLC H-Class system equipped with an Acquity UPLC™ BEH Shield RP 18 chromatographic column (100 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 µm particle size) and interfaced to a Xevo® TQD mass spectrometer from Waters (Milford, MA, USA). Separation of the twenty one drugs was accomplished by using a gradient elution programme with a mobile phase consisting of 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B) that was circulated at 0.4 mL min^{-1}. The programme was as follows: 90% solvent A for 0–0.2 min; 30% solvent A for 3.5 min and 90% solvent A for 4 min. The column temperature was thermostated at 55 °C, the autosampler compartment temperature was set at 10 °C and the injected volume was 5 µL.

The electro-spray ionization source (ESI) was operated in the positive mode, using a capillary voltage of 0.6 kV and an ion source temperature of 120 °C. The MS detector was used in the multiple reaction monitoring (MRM) mode with all target drugs. Nitrogen was used both as nebulizer (50 L h^{-1}) and as drying gas (500 °C, 1100 L h^{-1}). These variables were optimized on an individual basis for each standard in methanol (1 µg mL^{-1}), which was injected at 20 µL min^{-1}. The other MS/MS parameter values for the target compounds and internal standards are summarized in Table 1. Data were acquired by using MassLynx™ Application Manager. Fig. 1-S in the Supplementary material shows a typical ion chromatogram in the MRM mode for a spiked OF sample circulated at 100 µg mL^{-1}.

2.6. Method validation

The optimized MEPS-UPLC–MS/MS method was validated according to guidelines of the US Food and Drug Administration (FDA) [36], the International Conference on Harmonization (ICH) [37] and Eurachem [38] in order to ensure accurate and reliable results. Accuracy and reliability were assessed in terms of linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision, trueness, recovery and matrix effects.

Linearity was assessed by constructing a calibration curve for each analyte using internal standards. Each curve was obtained by using eight different concentration levels in triplicate and plotting the ratio of the quantitative ion peak area for each analyte to that for the isotopically labelled IS against the corresponding analyte concentration (ng mL^{-1}), the two being related by linear least-squares regression.

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for each drug were calculated as the lowest concentrations resulting in a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively. The precision of the method was assessed at three concentration levels (5, 25 and 100 ng mL^{-1}) in QC samples that were analysed on the same day to estimate within-day precision and on different days for between-day precision.

Matrix effects were assessed according to Matuszewski et al. [39] and to the review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods of Kruve et al. [40]. The procedure involved acquiring peak areas for three different sample sets. Set A consisted of standard solutions and was used to calculate the ratio of the peak area for each analyte to that for IS in the mobile phase. Set B consisted of matrix-standards and was used to calculate the ratio of peak area for each standard to that for IS spiked after extraction of blank OF. Finally, set C consisted of samples to which the analytes had been added before extraction in OF and was used to calculate the ratio of the peak area for each target compound to that for IS spiked before extraction. Matrix effects (ME) were determined by analysing QC samples circulated at 100 ng mL^{-1} six times:

$$ME\ (\%) = B/A \times 100$$

The overall process efficiency (PE) was estimated by analysing 6 replicates of QC samples at each concentration level (10, 25, 50 and 100 ng mL^{-1}) that were prepared as described in Section 2.4:

$$PE\ (\%) = C/A \times 100$$

3. Results and discussion

The MEPS conditions were carefully optimized by using experimental designs to examine the influence of selected operational variables (washing solvent and eluent volumes, phase type, number of aspirate–dispense cycles and pH) on MEPS efficiency. The chemometric study was preceded by preliminary tests in order to select the most suitable eluent and washing solvent.

3.1. Selection of the eluent

A total of five eluents were assessed for extraction efficiency, namely: the mobile phase (0.1% formic acid in water / 0.1% formic acid in ACN, 90:10), methanol, dichloromethane/2-propanol/ammonium hydroxide (DCM/IPA/NH_4OH) (78:20:2, v:v:v), 5% NH_3 in acetonitrile and 5% NH_3 in methanol. Fig. 1 shows the normalized chromatographic responses obtained with each eluent. The drug extraction efficiency of DCM/IPA/NH_4OH and 5% NH_3 in ACN ranged from 80% to 100%. The ammonium solutions maximized ionization of the analytes. Some of the responses obtained with the 5% NH_3 in ACN were slightly better than those provided by DCM/IPA/NH_4OH. The morphine and EDDP responses with 5% NH_3 in ACN as eluent were approximately 20% lower than those obtained with DCM/IPA/NH_4OH. This led us to choose the ternary solution as eluent.

3.2. Selection of the washing solvent

The washing solvent was used before drying the sorbent in order to selectively remove non-specific matrix analytes without loss of any target drug. The following tests were performed for this purpose: extraction without washing and after washing with Milli-Q water, 0.1% formic acid, water/methanol (90:10, v:v), 0.1 M acetic acid/water/methanol (1:2:2, v:v:v) and 50 mM NH_3 in water/methanol (90:10, v:v). The results of the tests using no washing solvent were highly variable and similar to those obtained with 50 mM NH_3 in water/methanol. The 0.1% formic acid solution proved the best washing solvent for most of the classic drugs. However, the best results for morphine were obtained with water/methanol (90:10, v-v), which provided good results for all target drugs (Fig. 2). We thus chose to use this binary solution as the washing solvent.

Table 1
UPLC-MS/MS parameters for the analytes studied and internal standards.

Analyte	Drug category	RT (min)	Precursor ion (*m/z*)	Quantitative product ion (*m/z*)	RCE% (V)	Qualitative product ion (*m/z*)	RCE% (V)	CV (V)	pKa	IS
Morphine	Opioid	0.61	286.0	201.04	24	165	38	55	9.48	6-MAM-d3
Naloxone	Opioid	0.80	328.37	310.08	18	212.0	36	35	9.16	NAL-d5
Methylone	Cathinone	0.86	207.93	159.95	16	190.01	12	30	7.74	ETH-d5
Flephedrone	Cathinone	0.89	181.99	164.05	10	148.95	20	26	7.24	ETCATEP-d5
Ethylcathinone	Cathinone	0.89	178.02	160.07	12	131.84	16	28	–	ETCATEP -d5
Ethylcathinone ephedrine metabolite	Cathinone	0.88	180.04	162.09	12	117.0	20	24	–	ETCATEP -d5
Scopolamine	Alkaloid	0.92	304.0	138.0	22	102.94	38	40	8.01	6-MAM-d3
6-MAM	Opioid	1.02	328.0	165.0	40	211.01	26	55	9.41	6-MAM-d3
Ethylone	Cathinone	1.01	22.14	174.10	16	204.02	12	30	7.75	ETH-d5
Methylephedrine	Cathinone	1.17	180.04	162.09	14	91.04	26	22	9.04	METEP-d3
Butylone	Cathinone	1.20	222.01	174.11	16	201.04	12	30	7.74	BUT-d3
Mephedrone	Cathinone	1.23	177.96	159.95	12	144.93	20	25	7.41	MEP-d3
Pentedrone	Cathinone	1.71	192.16	174.10	12	131.88	18	28	7.21	MDPV-d8
BEG	Cocaine	2.05	299.0	168.13	18	105.02	26	42	3.35	BEG-d8
Cocaine	Alkaloid	2.14	304.0	182.0	20	82.0	30	40	8.97	COC-d3
MDPV	Cathinone	2.19	276.06	126.08	26	175.04	22	40	8.41	MDPV-d8
Cocaethylene	Cocaine	2.40	318.0	196.09	20	82.05	32	12	9.04	COCET-d8
Pyrovalerone	Cathinone	2.45	246.15	104.96	24	175.02	18	35	8.22	MDPV-d8
EDDP	Opioid	2.74	278.09	234.06	30	249.06	22	50	7.71	EDDP-d3
Buprenorphine	Opioid	2.78	468.34	55.06	48	54.35	46	60	9.47	BUP-d4
Methadone	Opioid	2.94	310.0	104.96	30	265.0	15	33	9.05	METHA-d9
Naloxone-d5		0.79	333.19	315.18	18	212.09	38	36		
Ethylcathinone Ephedrine-d5		0.88	185.07	167.13	12	117.08	20	30		
6-MAM-d3		0.98	331.39	165.05	34	211.03	26	55		
Ethylone-d5		0.99	227.07	179.04	18	209.02	12	30		
Methylephedrine-d3		1.15	183.52	165.19	12	91.03	24	22		
Butylone-d3		1.15	225.10	177.12	16	207.04	12	35		
Mephedrone-d3		1.20	181.07	163.06	12	148.04	20	25		
BEG-d8		1.95	298.22	171.05	20	109.9	26	32		
Cocaine-d3		2.08	307.37	104.96	34	85.05	32	40		
MDPV-d8		2.14	284.18	175.09	22	134.42	26	40		
Cocaethylene-d8		2.35	326.14	201.08	18	85.04	30	34		
EDDP-d3		2.71	281.22	234.10	30	249.12	30	50		
Buprenorphine-d4		2.75	472.35	59.02	48	101.04	40	76		
Methadone-d9		2.91	319.21	268.10	14	104.89	28	28		

RT: retention time. RCE: relative collision energy. CV: cone voltage. IS: internal standard.

3.3. MEPS optimization with experimental designs

3.3.1. Screening design

We used the statistical software NemrodW® to develop experimental designs, evaluate experimental data and plot effects and response surfaces [41].

A $3^4 4^1//16$ asymmetric or mixed-level factorial design was initially used to screen five variables at different numbers of levels [42]. Thus, four factors were examined at three levels and one at four levels. The studied variables were as follows:

- b_1. Volume of washing solution [water/methanol (90:10, v-v)] (50, 100 and 200 μL).
- b_2. Volume of eluent (DCM/IPA/NH_4OH) (50, 100 and 500 μL).
- b_3. Number of aspirate–dispense cycles (2, 5 and 8 strokes).
- b_4. Nature of the sorbent phase (C8, C18 and mixed-mode C8/SCX).
- b_5. pH (6, 7, 8 and 9).

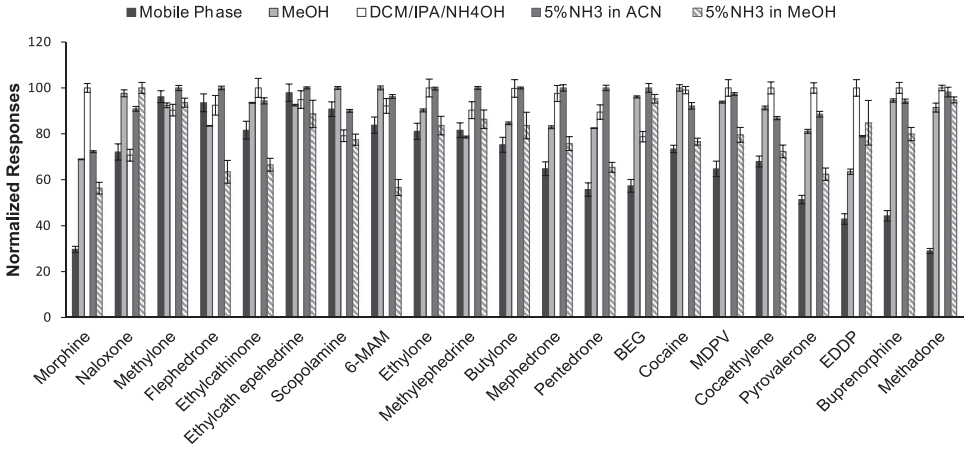


Fig. 1. Optimization of elution solvent. Responses expressed as mean ± standard deviation (n = 3).

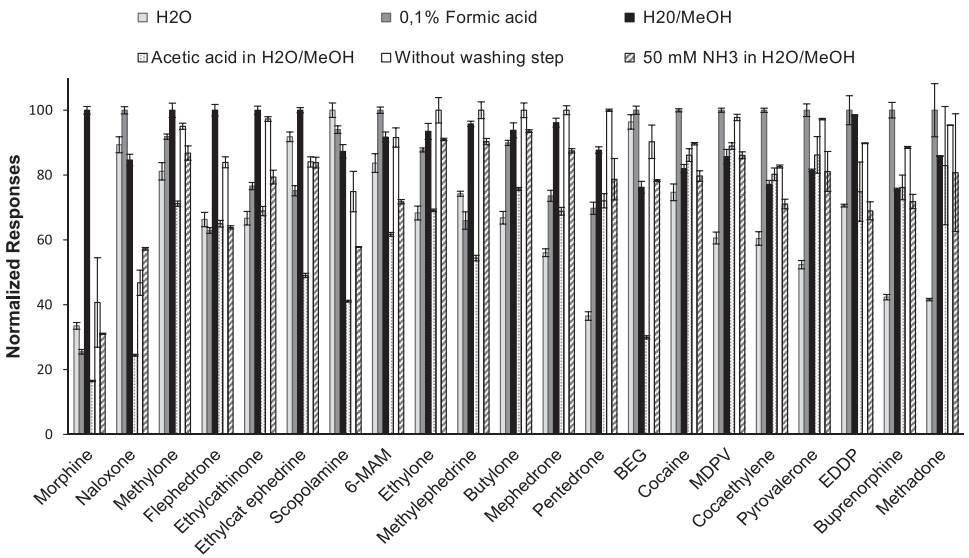


Fig. 2. Influence of different washing solvents. Responses expressed as mean ± standard deviation (n = 3).

The experimental conditions for the design are shown in Table 1-S of the Supplementary material.

The ANOVA results revealed statistical significance for cocaine, methylone, butylone, morphine, 6-MAM, methylephedrine, ethylone and ethylcathinone at the 95% confidence level, and also for scopolamine, BEG and naloxone at the 99% level. These statistical results are best depicted as delta weight plots [42], which allow differential effects of each factor to be exposed by considering two different levels of the factor taken two by two. The length of the plot bars is proportional to the relative magnitude of the effect, which is negative for bars going leftwards and positive for bars going rightwards. Dotted lines in a plot represent the statistical significance level corresponding to a 95% confidence level [42]. We also used total effect plots [42], where bar length is proportional to the effect of each factor level on the analytical response, to identify the best level for each variable that was not statistically significant. By way of example, Fig. 3 shows the delta weight plots (3A and 3B) and total effect plots (3C and 3D) for scopolamine and morphine, respectively. The influence of the sorbent phase (variable b_4) was statistically significant for fourteen analytes. In most cases, the mixed-mode phase (C8/SCX) provided the best extraction results—by exception, the C18 phase provided better responses for buprenorphine and methadone. Also, pyrovalerone and naloxone gave similar results with C8/SCX and C18. The mixed-mode phase was ultimately selected because it consisted of silica gel bonded with octyl and phenylsulphonic acid groups, which is a suitable composition for polar analytes such as acid and basic drugs [24].

The pH (b_5) was statistically significant for seventeen drugs. A pH 9 proved the most suitable value for extracting all drugs except methadone and EDDP, which were more efficiently extracted at pH 7. Since the pK_a values for the drugs ranged from 3.4 to 9.5, the extraction efficiency was increased by the acid–base equilibrium of most of the drugs being shifted to the dissociated basic form at high pH values. A pH 9 was therefore chosen for subsequent work.

A volume of washing solution b_1 = 50 μL was the best choice for the MEPS procedure for all analytes; this was the statistically significant level of the variable for naloxone, scopolamine and BEG. The results for some drugs were similar with 100 and 50 μL of washing solution.

Using a large number of aspirate–dispense cycles (strokes), b_3, facilitated interaction of the sample with the sorbent phase and hence extraction. The number of cycles was statistically significant for eleven drugs, 8 cycles increasing the extraction yield for eight analytes but 5 cycles resulting in more efficient extraction of morphine and naloxone. This factor had no statistically significant effect on extraction efficiency for the other drugs, which peaked at 8 or 5 cycles.

The volume of eluent, b_2, was statistically significant for scopolamine and morphine; however, the results were inconclusive as regards the optimum value for maximal extraction. For these reasons, the last two factors were studied in greater detail by using a response surface design.

3.3.2. Doehlert design

The influence of eluent volume and number of strokes (aspirate–dispense cycles) was studied by using a Doehlert (uniform shell) design, that is suitable for exploring quadratic response surfaces [42]. With two factors, the design comprises the six vertices of a hexagon and three central points, so it requires a total of 9 experimental runs. Factors were explored at different numbers of levels (one at three and the other at five in a two-factor design). The eluent volumes examined ranged from 75 to 475 μL and the number of strokes from 2 to 8. The experimental conditions for the Doehlert design used are shown in Table 2-S of the Supplementary material. Desirability functions based on partial Derringer functions [42] were used to identify the experimental conditions leading to the best trade-offs between variables (viz., to responses falling within acceptable ranges). The overall objective function D, which represented the overall desirability function, was defined as the weighted geometric mean of n individual desirability functions. The experimental results were evaluated by ANOVA; the regression results were statistically significant at the 95% confidence level for five drugs. Also, the eluent volume was statistically significant at $p < 0.05$ for 12 drugs, a medium–high level being the best choice.

Fig. 2-SA, 2-SB, 2-SC and 2-SD in the Supplementary material show response surfaces illustrating the mutual dependence of the previous factors for ethylcathinone, butylone, naloxone and cocaine, all other drugs behaved similarly in this respect. The best results for scopolamine were obtained by using a low eluent volume and a medium number of strokes (Fig. 2-SE). Dissimilarity in the values for optimal determination of all drugs required a multi-criterion decision analysis based on desirability functions (Fig. 2-SF). The highest responses for all drugs corresponded to high eluent volumes and a medium number of cycles (D = 1). The optimal conditions were found to be 90 μL of eluent (DCM/IPA/NH_4OH) and six aspirate–dispense cycles.

3.4. Method validation

The linearity of the proposed method was assessed with provision for the ranges of therapeutic levels in patients on methadone or buprenorphine–naloxone substitution therapy programs. Standard solutions from LOQ to 500 ng mL^{-1} and each IS at an appropriate concentration were

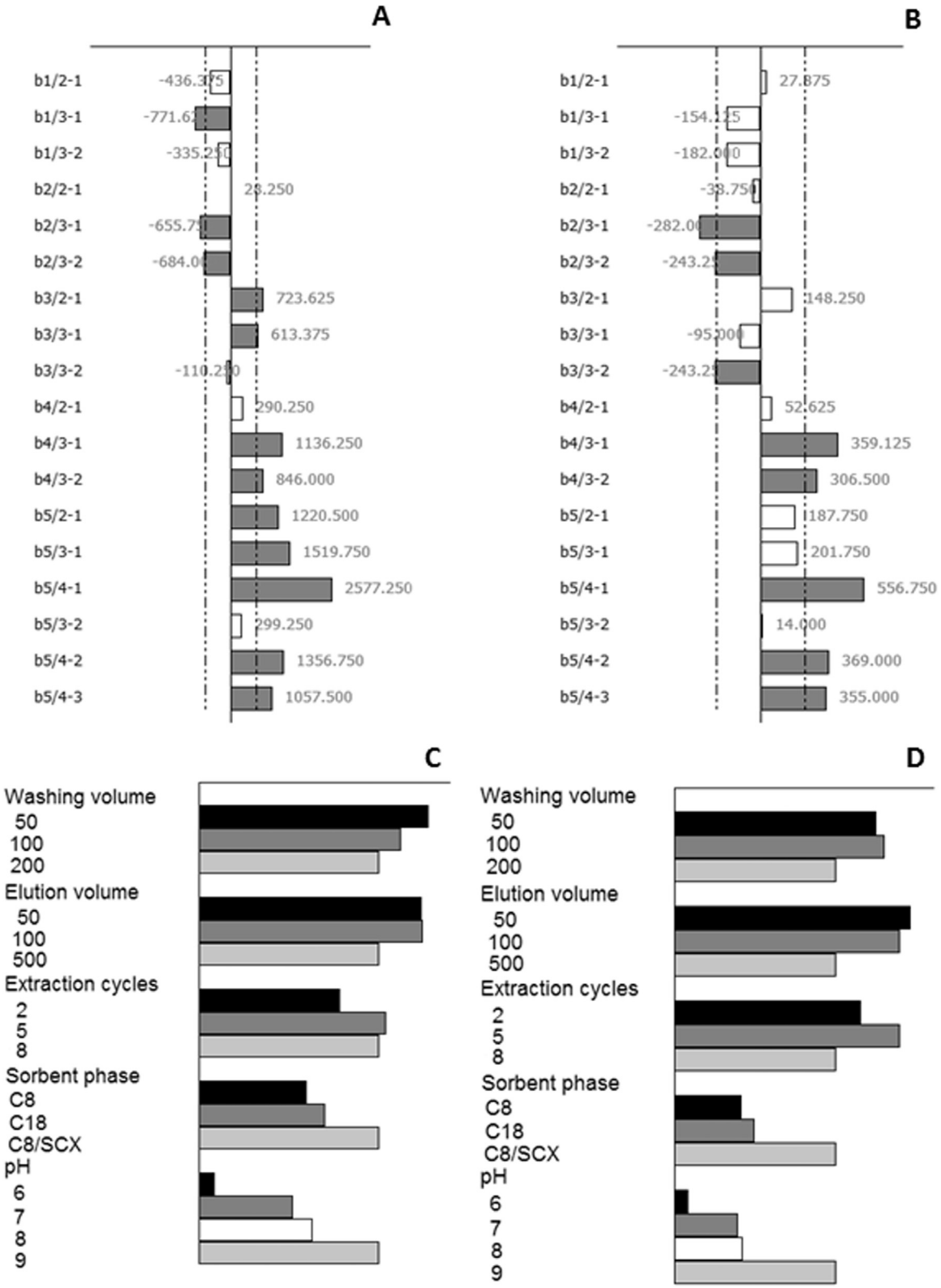


Fig. 3. Delta Weights plots for scopolamine (A) and morphine (B). Total Effects plots for scopolamine (C) and morphine (D).

used for this purpose. The linear concentration range for mephedrone (LOQ–250 ng mL^{-1}) was the narrowest. The closest IS analogue was used when no isotopically labelled IS was available for a drug. As can be seen from Table 3-S in the Supplementary material, regression analysis of the results provided good determination coefficients for all drugs (0.9903–0.9995).

As can be seen in Table 3-S, LOQs ranged from 0.5 to 1.0 ng mL^{-1} for all except morphine (10 ng mL^{-1}), 6-MAM and scopolamine (2.5 ng mL^{-1}). These limits are lower than most previously reported values [7–10,13–15,17,18,20,33] but similar to those obtained by Concheiro et al. [9] who used SPE for sample preparation.

The results obtained in the matrix effect assessment tests are shown

Table 2
Results of determination of drugs of abuse in oral fluid by MEPS-UPLC-MS/MS (ng mL^{-1}) (n = 2).

Sample number	Morphine	6-MAM	Cocaine	BEG	Cocaethylene	Methadone	EDDP	Naloxone	Buprenorphine
1	nd	nd	nd	nd	nd	328 ± 11	15 ± 1	nd	nd
2	nd	nd	7 ± 1	13 ± 4	nd	505 ± 12	16 ± 1	nd	nd
3	nd	nd	nd	nd	nd	144 ± 2	9 ± 0.3	nd	nd
4	nd	nd	nd	nd	nd	–	–	433 ± 110	4197 ± 363
5	nd	nd	926 ± 161	1180 ± 288	14 ± 1	7 ± 0.03	8 ± 1	nd	nd
6	nd	24 ± 8	89 ± 23	85 ± 10	< LOQ	–	–	114 ± 15	1502 ± 109
7	734 ± 187	109 ± 16	19,296 ± 197	26,582 ± 3041	< LOQ	134 ± 7	17 ± 1	nd	nd
8	nd	nd	19 ± 8	nd	nd	1455*	78 ± 1	nd	nd
9	nd	nd	14 ± 1	< LOQ	nd	7 ± 0.2	8 ± 1	nd	nd
10	3734*	310 ± 48	121 ± 4	446 ± 31	< LOQ	89 ± 1	10 ± 0.4	nd	nd
11	1194*	202 ± 11	21 ± 3	56 ± 1	< LOQ	2355*	13 ± 0.3	nd	nd
12	nd	nd	30 ± 1	43 ± 0.2	< LOQ	237 ± 0.1	15 ± 0.2	nd	nd

nd: not detected.
* n = 1.

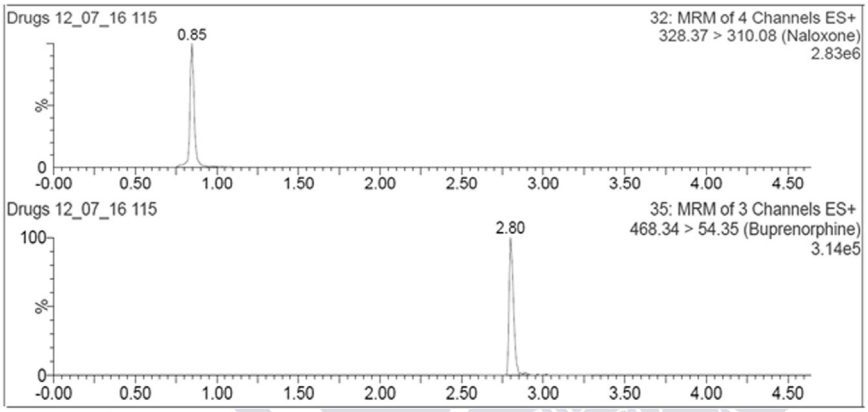


Fig. 4. UPLC-MS/MS chromatogram in MRM mode of two detected drugs (naloxone and buprenorphine not spiked) in the sample 4 from Table 2.

in Table 4-S of the Supplementary material. Ion suppression or enhancement by effect of the matrix was acceptable (80–117%) for all compounds except morphine, naloxone and flephedrone (< 75%), which exhibited suppressed ionization.

The accuracy of the proposed method was assessed as trueness and precision [37,40]. Precision was evaluated in QC samples containing the analytes at three concentration levels, using four replicates per level for within-day and between-day precision. The results are shown as relative standard deviations (%RSD) in Table 3-S. As can be seen, the precision was satisfactory (RSD values from 0.4% to 14.4%) for all drugs except morphine (RSD ≤ 16.6%). The overall trueness was evaluated as process efficiency (% PE) [40], using four concentration levels and six replicates per QC sample (Table 4-S). The mean process efficiency ranged from 75% for methylone to 125% for ethylcathinone and butylone. Morphine, scopolamine and flephedrone exhibited poor % PE values at concentrations below 100 ng mL^{-1}, probably because of the increased variability in their ionization process. However, these three drugs gave excellent % PE values at the 100 ng mL^{-1} concentration, which ensured their accurate quantification. These results are better than those reported by other authors using SPE [8,9,14] or MEPS with classic drugs of abuse in oral fluid [18].

3.5. Application to real samples

The ability of the proposed method to determine the target drugs was assessed analysing OF samples from twelve patients on a methadone or buprenorphine/naloxone substitution therapy programme. The volume collected with the Salivette® allowed samples to be analysed in duplicate. The samples from the patients on the methadone therapy additionally contained its metabolite EDDP.

All samples tested positive for at least one of the target drugs. The concentrations found are shown in Table 2 and the MRM chromatograms for sample 4 are shown by way of example in Fig. 4. The real samples testing positive for the different drugs contained 734–3734 ng mL^{-1} morphine, 24–310 ng mL^{-1} 6-MAM, 7–19,296 ng mL^{-1} cocaine, 13–26,582 ng mL^{-1} BEG, < LOQ–14 ng mL^{-1} cocaethylene, 7–2355 ng mL^{-1} methadone, 8–78 ng mL^{-1} EDDP, 114–433 ng mL^{-1} naloxone and 1502–4197 ng mL^{-1} buprenorphine. As can be seen from Table 2, 83% of the subjects used methadone and 17% were under buprenorphine/naloxone therapy. Although 75% of the individuals used cocaine, its metabolites BEG and cocaethylene were associated to cocaine consumption in only 67% and 50% of subjects, respectively. Finally, heroin use was evidenced by the presence of its metabolites 6-MAM (33%) and morphine (25%). Some subjects exhibited illicit drug concentrations that were compatible with recent use of heroin (3 cases for morphine and 4 for 6-MAM) and/or cocaine (9 cases for cocaine, 6 for cocaethylene and 8 for BEG).

4. Conclusions

MEPS is a miniaturized version of SPE based on the same physico–chemical principles and sorbent materials as the parent technique. An MEPS-UPLC–MS/MS method was optimized for the simultaneous extraction of twenty-one drugs of abuse including eleven new psychoactive substances (NPS) and various metabolites in oral fluid (OF). The proposed method uses sample and solvents sparingly, and involves light laboratory work. The results obtained with real samples show that the method is useful in subjects on substitution therapy programs, and also for preventing and reducing traffic accidents among potential drug users.

Because synthetic cathinones are structurally related to amphetamines, they tend to give false positives with on-site screening devices. These errors can be avoided by using the proposed method for

confirmation and quantification of NPS in OF. Also, the method could be used to simultaneously determine synthetic cathinones, naloxone buprenorphine and scopolamine in OF.

Finally, the development of new sorbents based on stimuli-responsive nanomaterials and molecularly imprinted polymers is bound to widen the scope of MEPS for quantifying NPS in biological matrices.

Acknowledgements

This work was funded by Ministerio del Interior-DGT (Project SPIP2015-01838), and also by Ministerio de Economía y Competitividad (Project AGL-2014-53647-R) of Spain and the European Regional Development Fund (FEDER). The authors are grateful to Professor M.I. Loza (BioFarma Research Group–USC) for assistance with the instrumentation.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.talanta.2017.06.022.

References

[1] UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime), Worlds Drug Report. New Psychoactive Substances: Concepts and Definitions, Vienna, 2013, pp. 60–115. ⟨http://www.unodc.org/unodc/secured/wdr/wdr2013/World_Drug_Report_2013.pdf⟩. (Accessed in December 2016).

[2] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, European Drug Report 2016: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2016. ⟨http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2637/TDAT16001ENN.pdf⟩. (Accessed in December 2016).

[3] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, New Psychoactive Substances in Europe, An Update from the EU Early Warning System (March 2015), Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2015. ⟨http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_235958_EN_TD0415135ENN.pdf⟩ (Accessed in December 2016).

[4] J.B. Zawilska, D. Andrzejczak, Next generation of novel psychoactive substances on the horizon – a complex problem to face, Drug Alcohol Depend. 157 (2015) 1–17.

[5] J. Sáiz, T. Duc Mai, M. López López, C. Bartolomé, P.C. Hauser, C. García-Ruiz, Rapid determination of scopolamine in evidence of recreational and predatory use, Sci. Justice 53 (2013) 409–414.

[6] S. Anizan, M.A. Huestis, The potential role of oral fluid in antidoping testing, Clin. Chem. 60 (2014) 307–322.

[7] A. El-Beqqali, M. Abdel-Rehim, Quantitative analysis of methadone in human urine samples by microextraction in packed syringe-gas chromatography-mass spectrometry (MEPS-GC-MS), J. Sep. Sci. 30 (2007) 2501–2505.

[8] K. Langel, T. Gunnar, K. Ariniemi, O. Rajamäki, P. Lillsunde, A validated method for the detection and quantitation of 50 drugs of abuse and medicinal drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. B 879 (2011) 859–870.

[9] K.S. Hagan, L. Reidy, Detection of synthetic cathinones in victims of sexual assault, Forensic Sci. Int. 257 (2015) 71–75.

[10] D. Lee, C.W. Chronister, J. Hoyer, B.A. Goldberger, Ethylone-related deaths: toxicological findings, J. Anal. Toxicol. 39 (2015) 567–571.

[11] M.J. Swortwood, D.M. Boland, A.P. DeCapio, Determination of 32 cathinone derivatives and other designer drugs in serum by comprehensive LC-QQQ-MS/MS analysis, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 1383–1397.

[12] M. Concheiro, S. Anizan, K. Ellefsen, M.A. Huestis, Simultaneous quantification of 28 synthetic cathinones and metabolites in urine by liquid chromatography- high resolution mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 9437–9448.

[13] P. Jankovics, A. Váradi, L. Tölgyesi, S. Lohner, J.N. Palotás, H.K. Szalai, Identification and characterization of the new designer drug 4′-methylethcathinone (4-MEC) and elaboration of a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) screening method for seven different methcathinone analogs, Forensic Sci. Int. 210 (2011) 213–220.

[14] P. Amaratunga, B.L. Lemberg, D. Lemberg, Quantitative measurement of synthetic cathinones in oral fluid, J. Anal. Toxicol. 37 (2013) 622–628.

[15] M. Sykutera, M. Cychowska, E.B. Boguslawska, A fatal case of pentedrone and alpha-pyrrolidinovalerophenone poisoning, J. Anal. Toxicol. 39 (2015) 324–329.

[16] A. de Castro, E. Lendoiro, H.F. Vega, S. Steinmeyer, M.L. Rivadulla, A. Cruz, Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of selected synthetic cathinones and two piperazines in oral fluid. Cross reactivity study with an on-site immunoassay device, J. Chromatogr. A 1374 (2014) 93–101.

[17] M. Concheiro, M. Castaneto, R. Kronstrand, M.A. Huestis, Simultaneous determination of 40 novel psychoactive stimulants in urine by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and library matching, J. Chromatogr. A 1397 (2015) 32–42.

[18] C. Montesano, M.C. Simeoni, R. Curini, M. Sergi, C. Lo Sterzo, D. Compagnone, Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with LC-MS/MS, Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 3647–3658.

[19] M. Sergi, C. Montesano, S. Odoardi, L.M. Rocca, G. Fabrizi, D. Compagnone, R. Curini, Microextraction by packed sorbent coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cannabinoids in oral fluids, J. Chromatogr. A 1301 (2013) 139–146.

[20] M.A. Saracino, C. Marcheselli, L. Somaini, M.C. Piere, G. Gerra, A. Ferranti, M.A. Raggi, A novel test using dried blood spots for the chromatographic assay of methadone, Anal. Bioanal. Chem. 404 (2012) 503–511.

[21] M. Svidrnoch, L. Lneníková, I. Válka, P. Ondra, V. Maier, Utilization of micellar electrokinetic chromatography-tandem mass spectrometry employed volatile micellar phase in the analysis of cathinone designer drugs, J. Chromatogr. A 1356 (2014) 258–265.

[22] S. Strano. Rossi, A.B. Cadwallader, X. de la Torre, F. Botrè, Toxicological determination and in vitro metabolism of designer drug methylenedioxypyrovalerone (MDPV) by gas chromatography / mass spectrometry and liquid chromatography / quadrupole time-of-flight mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom. 24 (2010) 2706–2714.

[23] M. Abdel-Rehim, Microextraction by packed sorbents (MEPS): a tutorial, Anal. Chim. Acta 701 (2011) 119–128.

[24] M. Abdel-Rehim, Recent advances in microextraction by packed sorbents for bioanalysis, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2569–2580.

[25] M. Mahdi Moein, R. Said, F. Bassyouni, M. Abdel-Rehim, Solid phase microextraction and related techniques for drugs in biological samples, J. Anal. Methods Chem. (2014) 24, Article ID 921350. http://dx.doi.org/10.1155/2014/921350 (Accessed in December 2016).

[26] M.M. Moein, A. Abdel-Rehim, M. Abdel-Rehim, Microextraction by packed sorbent (MEPS), Trends Anal. Chem. 67 (2015) 34–44.

[27] V. Alves, J. Gonçalves, C. Conceiçao, H.M. Teixeira, An improved analytical strategy combining microextraction by packed sorbent combined with ultra-high pressure liquid chromatography for the determination of fluoxetine, clomipramine and their active metabolites in human urine, J. Chromatogr. A 1408 (2015) 30–40.

[28] S. Mosaye Daryanavard, A. Jeppsson-Dadoun, L.I. Andersson, M. Hashemi, A. Colmsjö, M. Abdel-Rehim, Molecularly imprinted polymer in microextraction by packed sorbent for the simultaneous determination of local anesthetics: lidocaine, ropivacaine, mepivacaine and bupivacaine in plasma and urine samples, Biomed. Chromatogr. 27 (2013) 1481–1488.

[29] V.C. Cristina Jardim, L. de Paula Melo, D. Soares Domingues, M.E. Costa Queiroz, Determination of parabens in urine samples by microextraction using packed sorbent and ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. B 974 (2015) 35–41.

[30] M. Locatelli M, V. Ferrone, R. Cifelli, R.C. Barbacane, G. Carlucci, Microextraction by packed sorbent and high performance liquid chromatography determination of seven non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma and urine, J. Chromatogr. A 1367 (2014) 1–8.

[31] M. Locatelli, M.T. Ciavarella, D. Paolino, C. Celia, E. Fiscarelli, G. Ricciotti, A. Pompilio, G. Di Bonaventura, R. Grande, G. Zengin, L. Di Marzio, Determination of ciprofloxacin and levofloxacin in human sputum collected from cystic fibrosis patients using microextraction by packed sorbent-high performance liquid chromatography photodiode array detector, J. Chromatogr. A 1419 (2015) 58–66.

[32] V. D'Angelo, F. Tessari, G. Bellagamba, E. De Luca, R. Cifelli, C. Celia, R. Primavera, M. Di Francesco, D. Paolino, L. Di Marzio, M. Locatelli, Microextraction by packed sorbent and HPLC–PDA quantification of multiple anti-inflammatory drugs and fluoroquinolones in human plasma and urine, J. Enzym. Inhib. Med. Chem. 31 (2016) 110–116.

[33] E. Candish, A. Gooley, H.J. Wirth, P.A. Dawes, R.A. Shellie, E.F. Hilder, A simplified approach to direct SPE-MS, J. Sep. Sci. 35 (2012) 2399–2406.

[34] B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications, J. Pharm. Biomed. Anal. 56 (2011) 141–158.

[35] World Medical Association Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, JAMA-J Am. Med. Assoc. 310, 2013, pp. 2191–2194.

[36] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, Draft Guidance, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 2013. ⟨http://www.fda.gov/downloads/Drugs/%20GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf⟩. (Accessed in December 2016).

[37] ICH Harmonized Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), International Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005. ⟨http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm265700.htm⟩. (Accessed in December 2016).

[38] B. Magnusson, U. Örnemark, Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd ed., Eurachem, Teddington, 2014.

[39] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, Anal. Chem. 75 (2003) 3019–3030.

[40] A. Kruve, R. Rebane, K. Kipper, M.L. Oldekop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravio, I. Leito, Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: part II, Anal. Chim. Acta 870 (2015) 8–28.

[41] D. Mathieu, J. Nony, R. Phan-Tan-Luu, NemrodW®, Version 2011, LPRAI, Marseille.

[42] G.A. Lewis, D. Mathieu, R. Phan-Tan-Luu, Pharmaceutical Experimental Design, Marcel Dekker, New York, 1999.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RightsLink®

Home | Help | Live Chat | Sign in | Create Account



An analytical strategy for designer benzodiazepines and Z-hypnotics determination in plasma samples using ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry after microextraction by packed sorbent

Author: A.M. Ares-Fuentes,R.A. Lorenzo,P. Fernández,A.M. Carro

Publication: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

Publisher: Elsevier

Date: 5 February 2021

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights

BACK CLOSE WINDOW

© 2021 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Terms and Conditions
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jul 19, 2021

This Agreement between Miss. Ana Ares-Fuentes ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5112531275269
License date	Jul 19, 2021
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Separation Science
Licensed Content Title	Microextraction by packed sorbent followed by ultra high performance liquid chromatography for the fast extraction and determination of six antidepressants in urine
Licensed Content Author	Rosa Antonia Lorenzo, Antonia M Carro, Ana Maria Fernández, et al
Licensed Content Date	Apr 24, 2019
Licensed Content Volume	42
Licensed Content Issue	11
Licensed Content	9

Pages	
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	Ph. Student
Institution name	University of Santiago de Compostela
Expected presentation date	Jul 2021
Specific Languages	Spanish
Requestor Location	Miss. Ana Ares-Fuentes Avda das Ciencias Santiago de Compostela, La Coruña 15782 Spain Attn: Universidad de Santiago de Compostela
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a"Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.

- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order,** is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.

- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner.**For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you

shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.

- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.

- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.

- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.

- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.

- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and

WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.

- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.

- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.

- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC)License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library
http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html

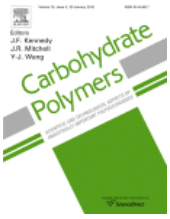
Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

RightsLink®

Home | Help | Live Chat | Sign in | Create Account



Cyclodextrin-functionalized cellulose filter paper for selective capture of diclofenac

Author:
Ana M. Ares,Raquel Muiño,Alejandro Costoya,Rosa A. Lorenzo,Angel Concheiro,Antonia M. Carro,Carmen Alvarez-Lorenzo

Publication: Carbohydrate Polymers

Publisher: Elsevier

Date: 15 September 2019

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights

BACK CLOSE WINDOW

© 2021 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Terms and Conditions
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

Home | Help | Live Chat | Sign in | Create Account



A fast bioanalytical method based on microextraction by packed sorbent and UPLC–MS/MS for determining new psychoactive substances in oral fluid

Author: A.M. Ares,P. Fernández,M. Regenjo,A.M. Fernández,A.M. Carro,R.A. Lorenzo

Publication: Talanta

Publisher: Elsevier

Date: 1 November 2017

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights

BACK CLOSE WINDOW

© 2021 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Terms and Conditions
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com