CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE PSICOFÁRMACOS Y DROGAS DE ABUSO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES MEDIANTE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS

María Regenjo Vázquez

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN AVANCES E NOVAS ESTRATEXIAS EN CIENCIA FORENSE

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2019

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Evaluación de la presencia de psicofármacos y drogas de abuso en muestras biológicas y ambientales mediante nuevas metodologías analíticas.

D./Dña. María Regenjo Vázquez

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
3) La tesis es la versión definitiva presentada para a su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

En Santiago de Compostela, 25 de octubre de 2019.

Firmado: María Regenjo Vázquez

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA

Evaluación de la presencia de psicofármacos y drogas de abuso en muestras biológicas y ambientales mediante nuevas metodologías analíticas.

Dña. Purificación Fernández Gómez
Dña. Antonia María Carro Díaz

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña. María Regenjo Vázquez, bajo nuestra dirección, y autorizamos a su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 25 de octubre de 2019.

Asdo. Purificación Fernández Gómez

Asdo. Antonia María Carro Díaz

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE PSICOFÁRMACOS Y DROGAS DE ABUSO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES MEDIANTE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS

Dña. María Regenjo Vázquez

Declara no tener ningún conflicto de interés

En Santiago de Compostela, 25 de octubre de 2019

Asdo.....

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ASPECTOS ÉTICOS

EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE PSICOFÁRMACOS Y DROGAS DE ABUSO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES MEDIANTE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS

Dña. María Regenjo Vázquez

Declara que:

Las investigaciones de esta tesis se realizaron siguiendo la legislación vigente en cuanto al tratamiento y protección de los datos de carácter personal, de acuerdo con:

Los "Principios éticos para la investigación médica implicando seres humanos". World Medical Association. Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. JAMA – J. Am. Med. Assoc. 2013; 310: 2191-2194

La ley 14/2007 «BOE» núm. 159, de 4 de julio de 2007 Capítulo III Utilización de muestras biológicas humanas con fines de investigación biomédica pp. 26-28

El informe favorable del Comité Autonómico de Ética de la Investigación de Galicia. Código de Registro: 2015/488 (Anexos).

Existe un compromiso por parte de la doctoranda y las directoras de la tesis de garantizar el cumplimiento de los principios éticos y la normativa vigente referida a la investigación.

En Santiago de Compostela, 25 de octubre de 2019.

Asdo. María Regenjo Vázquez

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMO

Esta tese doutoral describe a optimización e validación de diferentes métodos de separación e determinación de benzodiazepinas e drogas de abuso en augas residuais e mostras biolóxicas, como plasma, ouriños e fluido oral e a súa posterior aplicación a mostras reais. As benzodiazepinas son sustancias amplamente prescritas no sistema nacional de saúde polo que a súa detección é habitual en numerosos laboratorios clínicos e toxicolóxicos. No caso das drogas de abuso, aínda que prohibidas, a maioría delas relaciónanse con un alto número de consumidores, polo que é habitual encontrar numerosas mostras positivas en investigacións toxicolóxicas.

Nesta tese doutoral optimízanse métodos de extracción baseados na miniaturización de técnicas como son a microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) e a microextración con adsorbentes empaquetados (MEPS), derivadas das clásicas extracción líquido-líquido (LLE) e extracción en fase sólida (SPE), respectivamente. Estas técnicas presentan numerosas vantaxes fronte as técnicas convencionais pois reducen o tempo de extracción, as cantidades de mostra e disolventes necesarios e os custos do procedemento. A optimización das condicións experimentais destas técnicas levouse a cabo mediante ferramentas quimiométricas baseadas nos diseños de experimentos. A separación e determinación das diferentes drogas levouse a cabo coa axuda da cromatografía líquida de ultra resolución, que reduce tempo e gasto de disolventes, acoplada á detección con rede de diodos ou á espectrometría de masas.

Finalmente, todos os métodos optimizados foron validados seguindo as directrices marcadas por guías de validación internacionais, e aplicáronse á determinación destes analitos en mostras reais.

RESUMEN

Esta tesis doctoral describe la optimización y validación de diferentes métodos de separación y determinación de benzodiazepinas y drogas de abuso en aguas residuales y muestras biológicas, como plasma, orina y fluido oral, y su posterior aplicación a muestras reales. Las benzodiazepinas son sustancias ampliamente prescritas en el sistema nacional de salud por lo que su detección es habitual en numerosos laboratorios clínicos y toxicológicos. En el caso de las drogas de abuso, aunque prohibidas, la mayoría de ellas se relacionan con un alto número de consumidores, por lo que es habitual encontrar numerosas muestras positivas en investigaciones toxicológicas.

En esta tesis doctoral se optimizan métodos de extracción basados en la miniaturización de las técnicas como son la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y la microextración con adsorbentes empaquetados (MEPS), derivadas de las clásicas extracción líquido-líquido (LLE) y extracción en fase sólida (SPE), respectivamente. Estas técnicas presentan numerosas ventajas frente a las técnicas convencionales pues reducen el tiempo de extracción, las cantidades de muestra y disolventes necesarios y los costes del procedimiento. La optimización de las condiciones experimentales de estas técnicas se llevó a cabo mediante herramientas quimiométricas basadas en los diseños de experimentos. La separación y determinación de las diferentes drogas se llevó a cabo con la ayuda de la cromatografía líquida de ultra resolución, que reduce tiempo y gasto de disolventes, acoplada a la detección con red de diodos o a la espectrometría de masas.

Finalmente, todos los métodos optimizados fueron validados siguiendo las directrices marcadas por guías de validación internacionales, y se aplicaron a la determinación de los analitos en muestras reales.

ABSTRACT

This doctoral thesis describes the optimization and validation of different methods of separation and determination of benzodiazepines and drugs of abuse in wastewater and biological samples, such as plasma, urine and oral fluid, and their subsequent application to real samples. Benzodiazepines are widely prescribed substances in the national health system so their detection is common in many clinical and toxicological laboratories. In the case of drugs of abuse, although prohibited, most of them are related to a high number of consumers, so it is common to find numerous positive samples in toxicological investigations.

In this doctoral thesis, extraction methods are optimized based on the miniaturization of techniques such as dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and microextraction by packed sorbents (MEPS), derived from the classic liquid-liquid extraction (LLE) and solid phase extraction (SPE), respectively. These techniques have numerous advantages over conventional techniques because they reduce the extraction time, the amount of sample and solvent volumes needed and the costs of the process. The optimization of the experimental conditions of these techniques was carried out using chemometric tools based on experimental designs. The separation and determination of the different drugs were carried out by ultra-performance liquid chromatography that reduces time and solvent costs, coupled to the detection with photodiode array or mass spectrometry.

Finally, all optimized methods were validated following international validation guides, and were applied to the determination of the target analytes in real samples.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

"Dosis sola facit venenum"

La dosis hace al veneno.

Paracelso

Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

Marei Curie.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos os que me axudástedes neste longo proceso.

En primeiro lugar as miñas directoras de tese Purificación Fernández Gómez y Antonia María Carro Díaz por darme a oportunidade de realizar este traballo, e á profesora Rosa Antonia Lorenzo Ferreira que aínda que non figura como tal é unha directora máis deste traballo.

Á Xunta de Galicia pola bolsa de movilidade do Programa Iacobus POCTEP Interreg 2014-2020 e á Profesora Mª Lourdes Bastos por permitirme realizar unha estancia na Universidade de Porto e aprender un pouquiño mais, e a Vera por acompañarme neses días que estiven alí.

Á Xunta de Galicia, Ministerio do Interior-DGT e fondos FEDER polos contratos obtidos (Proxecto 10TAL209005PR e SPIP2015-01838).

Á profesora Maria Isabel Loza, por permitirme realizar parte deste traballo no CIMUS, e como non a Jose M. Ramos por acompañarme cando o cromatógrafo non tiña un bo día.

A todos os compañeiros do laboratorio de Toxicoloxía, Pamela, Chus, Ana, Angelines e en especial a Iván por todos esos, deixeiche ahí, botalle un ollo, e toda a paciencia que ten conmigo, e a Ana por todas as comidas.

A José Manuel por toda a axuda cos tramites.

A Abel, Alex, Ana, Antía, Brais, Dani, David, Eva, Fabián, Fátima, Fernando, Isa, Iván, Joana, Jonathan, Laura, Lucia, Lucia T., Marcos, Marta, Mónica, Noa, Paula, Raquel, Raul, Saray, Uxía, a todos os meus nenos e os que están por vir gracias por todo o que me enseñastedes, en especial a Mónica, Eva e Saray porque con vos empecei esa aventura que se acabou convertendo en parte do sustento desta tese.

A todos eses amigos Cris, Ángel, Vareluda, Anxo, Lara, María, Martín, Lore, Fachi… gracias por estar sempre ahí.

A todos os compañeiros do Concello de Lousame en especial a Ramón e Silvia por escoitar as miñas queixas e a Teresa por todos os bos consellos e esperanzas.

Por ultimo e máis importante:

A meus pais e meu irmán por toda a axuda nestes anos, e a miña nai por insistir e retarme para que me embarcase nesta viaxe, porque me fixo comerme as palabras “eu cando acabe a carreira non vou facer a tese”, pois aquí estou a piques de rematala.

Os meus avos que xa non puideron chegar ao final pero que foron parte importante, a miñas avoas e a Dolores a miña segunda nai.

A Adri por acompañarme na viaxe e non deixarme abandonar o barco nas horas baixas.

O meu pequerrecho por acompañarme na escritura desta tese, fíxose máis levadeiro contigo o meu lado.

ÍNDICE

RESUMO

ÍNDICE

ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. BENZODIAZEPINAS. 3

1.1.1. Propiedades fisicoquímicas. 3

1.1.2. Propiedades farmacológicas. 5

1.1.3. Farmacocinética. 6

1.1.4. Toxicidad y abuso. 8

1.2. COCAINA Y METABOLITOS. 11

1.2.1. Propiedades físicoquímicas. 11

1.2.2. Propiedades farmacológicas. 12

1.2.3. Farmacocinética. 13

1.2.4. Toxicidad y Abuso. 15

1.3. OPIÁCEOS 18

1.3.1. Propiedades fisicoquímicas. 18

1.3.2. Propiedades farmacológicas. 20

1.3.3. Farmacocinética. 21

1.3.4. Toxicidad y Abuso. 24

1.4. CATINONAS. 29

1.4.1. Propiedades fisicoquímicas. 29

1.4.2. Propiedades farmacológicas. 31

1.4.3. Farmacocinética. 32
1.4.4. Toxicidad y abuso. 33
1.5. ESCOPOLAMINA. 35
1.5.1. Propiedades fisicoquímicas. 35
1.5.2. Propiedades farmacológicas. 36
1.5.3. Farmacocinética. 36
1.5.4. Toxicidad y abuso. 37
1.6. MUESTRAS BIOLÓGICAS. 38
1.6.1. Sangre. 38
1.6.2. Orina. 39
1.6.3. Saliva. 40
1.6.4. Comparación y elección de muestras. 41
1.7. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN. 45
1.7.1. Microextracción líquido líquido dispersiva (DLLME). 46
1.7.2. Microextracción con sorbentes empaquetados (MEPS). 48
1.7.3 Revisión bibliográfica 51
1.8 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS. 57
1.8.1. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC). 57
1.8.2. Cromatografía Líquida de Ultra Eficacia (UPLC). 61
1.8.3. Detector de array de diodos (DAD). 62
1.8.4. Detector de Espectrometría de Masas (MS/MS). 63
1.8.5 Revisión bibliográfica. 65
1.9. DISEÑOS EXPERIMENTALES 86
1.9.1. Introducción. 86

1.9.2. Diseños de screening o cribado. 88
1.9.3. Diseños de optimización. 89
1.10. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS. 91
1.10.1. Linealidad y Efecto Matriz. 91
1.10.2. Sensibilidad. 92
1.10.3. Selectividad. 92
1.10.4. Límites de Detección y Cuantificación. 92
1.10.5. Precisión. 93
1.10.6. Recuperación. 94
1.11. BIBLIOGRAFÍA. 95
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS 119
2.1. JUSTIFICACIÓN. 121
2.2. OBJETIVOS. 125
3. METODOLOGÍA 127
3.1. DETERMINACIÓN DE BENZODIAZEPINAS (BZD) EN ORINA Y AGUAS RESIDUALES DE HOSPITALES 129
3.1.1. Reactivos. 129
3.1.2. Muestras de orina y agua. 129
3.1.3. Procedimiento de UA-DLLME. 130
3.1.4. Condiciones de UPLC-PDA. 131
3.1.5. Diseño Experimental: Diseño Doehlert. 132
3.2. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN PLASMA MEDIANTE DLLME-HPLC-PDA 134

3.2.1. Reactivos. 134
3.2.2. Muestras de plasma. 134
3.2.3. Procedimiento de US-DLLME. 134
3.2.4. Condiciones de HPLC-PDA. 135
3.2.5. Diseño experimental. 136
3.3. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN PLASMA MEDIANTE MEPS-UPLC-PDA 138
3.3.1. Reactivos. 138
3.3.2. Muestras de plasma. 138
3.3.3. Procedimiento de MEPS. 139
3.3.4. Condiciones de UPLC-PDA. 140
3.3.5. Diseño experimental. Diseño de screening asimétrico. ..141
3.4. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN SALIVA MEDIANTE DLLME-UPLC-MS/MS 143
3.4.1. Reactivos. 143
3.4.2. Muestras de saliva. 143
3.4.3. Procedimiento de US-DLLME. 144
3.4.4. Condiciones de UPLC-MS/MS 144
3.4.5. Diseño experimental. 148
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 151
4.1. DETERMINACIÓN DE BENZODIAZEPINAS EN ORINA Y AGUAS RESIDUALES DE HOSPITALES MEDIANTE US-DLLME - UPLC-PDA. 153
4.1.1. Optimización de la US-DLLME. 155

4.1.2. Validación del método analítico. 162

4.1.3. Aplicación del método a muestras de orina y aguas residuales. 167

4.1.4. Bibliografía. 171

4.2. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN PLASMA MEDIANTE US-DLLME-HPLC-P 176

4.2.1. Optimización del procedimiento US-DLLME. 177

4.2.2. Validación del método analítico. 184

4.2.3. Aplicación del método a muestras de plasma. 188

4.2.4. Bibliografía. 190

4.3. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN PLASMA MEDIANTE MEPS - UPLC-PDA. 196

4.3.1. Optimización de MEPS. 198

4.3.2. Validación del método analítico. 207

4.3.3. Aplicación del método a muestras de plasma. 212

4.3.4. Bibliografía. 214

4.4. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN SALIVA MEDIANTE US-DLLME - UPLC-MS/MS. 221

4.4.1. Optimización de las condiciones de US-DLLME. 223

4.4.2. Validación del método. 231

4.4.3. Aplicación del método a muestras reales. 239

4.4.4. Bibliografía. 242

5. CONCLUSIONES 245

ANEXOS 251

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura general de las benzodiazepinas

Figura 2: Mecanismo de acción de las benzodiazepinas.

Figura 3: Consumo de benzodiazepinas en España 2000-2012.

Figura 4: Planta erythroxylon coca.

Figura 5: Estructura de la cocaína, benzoilecgonina y cocaetileno.

Figura 6: Mecanismo de acción de la cocaína.

Figura 7: Metabolismo de la cocaína.

Figura 8: Prevalencia del consumo de cocaína en adultos jóvenes (15-34).

Figura 9. Formas de abuso de la cocaína: a) Hojas de coca, b) Pasta de coca, c) clorhidrato de cocaína, d) Crack.

Figura 10: Amapola del opio.

Figura 11: Estructura de los opiáceos.

Figura 12: Metabolismo de la heroína y la morfina.

Figura 13: Metabolismo de la metadona.

Figura 14: “Golden triangle”.

Figura 15: Estimaciones nacionales de prevalencia anual del consumo de opiáceos de alto riesgo, tendencias seleccionadas y datos más recientes.

Figura 16: Estructura general de las catinonas.

Figura 17: Estructuras químicas de etilcatinona efedrina y la metilefedrina.

Figura 18: Metabolismo de la metilona.

Figura 19: (a) Hyoscyamus Niger, (b) Datura Stramonium, (c) Brugmasia Candida.

Figura 20: Estructura de la escopolamina.

Figura 21: Plasma y suero.

Figura 22: Nefrona.

Figura 23: Glándulas salivares.

Figura 24: Recogida de saliva.

Figura 25: Períodos de detección de drogas en distintas muestras biológicas.

Figura 26: Procedimiento de la DLLME.

Figura 27: Esquema de MEPS.

Figura 28: Esquema de un equipo HPLC.

Figura 29: Detector de array de diodos (DAD).

Figura 30: Componentes de un Espectrómetro de Masas.

Figura 31: Las 20 drogas más citadas en los servicios de urgencias en hospitales centinela en 2018.

Figura 32: Tasas de mortalidad inducida por drogas entre adultos (15-64 años): tendencias seleccionadas y datos más recientes (Años 2000-2017).

Figura 33: Número de artículos según la muestra biológica para el análisis de drogas de abuso en el período 2010-2016.

Figura 34: Procedimiento de la DLLME para benzodiazepinas en orina y aguas residuales.

Figura 35: Procedimiento de DLLME para la extracción de drogas en plasma.

Figura 36: Procedimiento de MEPS para la extracción de drogas en plasma.

Figura 37: Procedimiento de DLLME para la extracción de drogas en saliva.

Figura 38: Variables optimizadas para el procedimiento DLLME. (a) Efecto de los disolventes extractantes, (b) Efecto de los disolventes

dispersantes, (c) Efecto del volumen de disolvente dispersante (acetona) y (d) Efecto de la adición de sal.

Figura 39: Superficies de repuesta (a) del pH frente al tiempo de agitación en el US, (b) volumen de disolvente frente a tiempo de agitación en el US y (c) volumen de cloroformo frente a pH para el diazepan.

Figura 40: Superficies de respuesta de la deseabilidad global obtenidas mediante un diseño Doehlert, (a) en función del volumen de cloroformo y el tiempo de ultrasonidos, con pH 9,5 fijo, (b) pH y tiempo de ultrasonidos, con volumen de cloroformo fijado a 140 mL.

Figura 41: Distribución de las benzodiazepinas encontradas en: (a) 30 muestras de orina humana y (b) 30 muestras de aguas residuales.

Figura 42: Cromatogramas de: (a) la muestra de orina (código 2, Tabla 18) que contiene 0,21 µg/mL de alprazolam y 1,01 µg/mL de lormetacepam y (b) la muestra de agua residual del hospital (código 2, Tabla 18) que contiene 6,68 ng/mL de alprazolam.

Figura 43: Optimización del disolvente extractante.

Figura 44: Optimización del (a) disolvente dispersante; (b) pH; (c) adición de sal; (d) tipo de agitación.

Figura 45: Superficies de respuesta: (a) volumen de extractante versus tiempo de agitación para morfina (MOR) y (b) cocaína (COC); volumen de dispersante versus tiempo de agitación para (c) benzoilecgonina (BZE) y (d) 6-acetilmorfina (6AM).

Figura 46: Gráficos de isorespuesta desde cero (área gris) a uno de deseabilidad para la deseabilidad general D. Las flechas indican el área donde hay valores óptimos para los factores estudiados.

Figura 47: Cromatograma de una muestra patrón que contiene las cinco drogas (línea continua) y una muestra blanco (línea punteada).

Figura 48: Efecto de (a) elución del disolvente y (b) disoluciones de lavado, en la eficiencia de extracción de MEPS de los fármacos diana (n = 3).

Figura 49: Estudio gráfico de los efectos de los factores en los MEPS basados en los diagramas de pesos delta para (a) el cocaetileno y (b) la mefedrona, y los diagramas de efectos totales para (c) el cocaetileno y (d) la mefedrona. Las unidades de barra son las áreas de pico cromatográficos.

Figura 50: Efecto del pH en la eficiencia de extracción mediante MEPS de drogas usando las condiciones óptimas.

Figura 51: Cromatogramas obtenidos por MEPS/UPLC-PDA en una muestra de plasma libre de drogas (línea punteada) y plasma enriquecido con todos los fármacos bajo investigación a 1 μg/mL (línea continua). Las líneas del cromatograma están espaciadas artificialmente.

Figura 52: Optimización (a) del disolvente extractante y (b) del disolvente dispersante.

Figura 53: (a) Pesos delta y (b) efectos totales para la pentedrona.

Figura 54: Superficies de respuesta para (a) morfina, (b) metilona, y (c) etilcatinona. (d) Función de deseabilidad global para todas las drogas.

Figura 55: Cromatograma de (a) una muestra de saliva blanco (b) Cromatograma de una muestra de saliva con drogas.

Figura 56: Cromatograma de muestra real (código 9, Tabla 30).

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Estructura química de las benzodiazepinas estudiadas.

Tabla 2: Parámetros farmacocinéticos de las benzodiazepinas.

Tabla 3: Concentraciones letales de benzodiazepinas en diferentes tejidos (µg/mL ó µg/g).

Tabla 4: Concentraciones letales de cocaína en distintos tejidos (µg/mL ó µg/g).

Tabla 5: Usos clínicos de los opiáceos.

Tabla 6: Parámetros farmacocinéticos de los opiáceos.

Tabla 7: Concentraciones letales de opiáceos en distintos tejidos. (µg/mL ó µg/g).

Tabla 8. Estructura química de las catinonas estudiadas.

Tabla 9: Concentraciones de la escopolamina en sangre y orina (µg/mL).

Tabla 10: Comparación de las muestras biológicas usadas en Toxicología.

Tabla 11: Revisión bibliográfica de DLLME aplicada a la extracción de drogas a partir de muestras biológicas.

Tabla 12: Revisión bibliográfica de MEPS aplicada a la extracción de drogas a partir de muestras biológicas.

Tabla 13: Revisión bibliográfica de las técnicas cromatográficas usados para el análisis de drogas en muestras biológicas.

Tabla 14: Tiempo de retención y longitud de onda máxima de cada compuesto.

Tabla 15: Tiempos de retención y longitudes de onda máxima de las drogas estudiadas.

Tabla 16: Tiempo de retención y longitud de onda máxima de cada droga.

Tabla 17: Parámetros de UPLC-MS/MS.

Tabla 18. Plan de experimentación del Diseño Doehlert (BZD en orina y aguas).

Tabla 19: Datos de linealidad (n=3) y LOD y LOQ (ng/mL) para las BZD estudiadas.

Tabla 20: Estudio de precisión (% RSD) para muestras de orina y aguas residuales (n=9).

Tabla 21: Estudio de la recuperación (%) en orina y aguas residuales para las BZD estudiadas (n=9).

Tabla 22: Concentración de BZD encontradas en muestras de orina humana (µg/mL) y aguas residuales de un hospital (ng/mL). (Freq.: Número de muestras positivas).

Tabla 23. Plan de experimentación.

Tabla 24: Parámetros de validación de drogas en plasma (rango de linealidad 0,1-10 µg/mL).

Tabla 25: Concentraciones de drogas (µg/mL) en 22 muestras reales de plasma.

Tabla 26: Datos de muestras de plasma, reportados por varios autores.

Tabla 27: Condiciones experimentales para el diseño de screening asimétrico $2^2 3^4 4^1$//18 experimentos en la MEPS de drogas de abuso a partir del plasma.

Tabla 28: Parámetros de validación

Tabla 29: Precisión intradía e interdía del método propuesto a partir de muestras de plasma de control de calidad (QC), enriquecida con las drogas estudiadas.

Tabla 30: Resultados obtenidos del análisis de muestras reales utilizando DLLME-UPLC-PDA y SPE-GC-MS.

Tabla 31. Condiciones experimentales para un diseño de cribado asimétrico: $2^1 3^4 4^1$//18 experimentos en US-DLLME de nuevas sustancias psicoactivas en fluido oral.

Tabla 32. Condiciones experimentales para un diseño Doehlert en US-DLLME de nuevas sustancias psicoactivas en fluido oral.

Tabla 33: Rango lineal, LOD, LOQ y %EM.

Tabla 34: Precisión intradía e interdía.

Tabla 35: Exactitud del método de extracción en saliva.

Tabla 36: Concentraciones de las drogas en muestras de saliva de sujetos consumidores.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS

A

ACN Acetonitrilo

Alpra Alprazolam

6-AM Monoacetilmorfina

ATD Antidepresivos

B

BEG Benzoilecgonina

BMIm PF_6 Hexafluorofosfato de Butilimidazolio

Broma Bromacepam

Bupre Buprenorfina

BZD Benzodiazepinas

C

CE Electroforesis Capilar (Capillary Electrophoresis)

CD Detección coulométrica (Coulometric Detection)

CG Cromatografía de Gases (Gas Chromatography)

Clona Clonacepam

COC Cocaína

COCET Cocaetileno

CPE Extracción en Punto de Nube (Cloud Point Extraction)

CTAB Bromuro de cetilmetil amonio

CV Coeficiente de Variación

D

DAD Detector Array de Diodos (Diode Array Detector).

DBS Manchas de sangre seca (Dried Blood Spots)

DART Análisis Directo en Tiempo Real (Direct Analysis in Real Time)

DCM Diclorometano

Dia Diacepam

DIE Dietilpropiona

DLLME Microextracción Líquido Líquido Dispersiva (Dispersive Liquid Liquid Microextraction)

DNUM Microextracción Dispersiva con Nanomateriales asistida por Ultrasonidos (Dispersive Nanomaterial-Ultrasounds assisted Microextraction)

D-μSPE Microextracción en fase sólida dispersiva (Dispersive μSPE)

E

EDAR Estación De Aguas Residuales.

EDDP 2-etileno-1, 5-dimetil-3, 3-difenilpirrolidina

ESI Ionización por Electrospray (Electrospray Ionization)

EtOH Etanol

F

FASS Espectrometría de Absorción Atómica de Llama (Flame Atomic Absorption Spectroscopy)

FID Detector de Ionización en Llama (Flame Ionization Detector)

FD Detección Fluorométrica (Fluorometric Detection)

FM Fase Móvil

G

GABA Ácido Gamma-Amino butírico

GC Cromatografía de Gases (Gas Chromatography)

H

HPLC Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (High Performance Liquid Chromatography)

HV Humor Vítreo

I

IPA Isopropanol

L

LC Cromatografía Líquida (Liquid Chromatography)

LLE Extracción Líquido Líquido (Liquid Liquid Extraction)

LOD Límite de Detección

Lora Loracepam

Lormet Lormetacepam

LOQ Límite de Cuantificación

LSD Dietilamida del Ácido Lisérgico ((6a*R*,9*R*)-*N*, *N*-dietil-7-metil-4,6,6a,7,8,9-hexahidroindolo [4,3-*fg*]quinolina-9-carboxamid)

M

M1 Modo mixto (SCX-C8)

MAE Extracción Asistida por Microondas (Microwave Assisted Microextraction)

MDPV Metilendioxipirovalerona

MEPS Microextracción con Adsorbentes Empaquetados (Microextraction by Packed Sorbents)

MeOH Metanol

MET Metadona

MIPS Polímeros de Impronta Molecular (Molecularly Imprinted Polymers)

MOR Morfina

MS Espectrometría de Masas (Mass Spectrometry)

N

Nalo Naloxona

NPS Nuevas Substancias Psicoactivas (New Psychoactive Substances)

P

PCP Fenilciclohecilpiperidina

PDA Fotodetector de red de Diodos (Photodetector Diode Array)

Q

QC Control de calidad (Quality Control)

QTOF-MS Cuadrupolo de Tiempo de Vuelo-Espectrometría de Masas **(**Quadrupole Time of Flight-Mass Spectrometry)

QuEChERS Método rápido, sencillo, económico, eficaz, robusto y seguro (**Qu**ick, **E**asy, **Ch**eap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe method)

S

SNC Sistema Nervioso Central

SDS Dodecil Sulfato Sódico

SIB Sibutramina

SPE Extracción en Fase Sólida (Solid Phase Extraction)

SPED Extracción en Fase Sólida Dispersiva (Solid Phase Dispersive Extraction)

SPME Microextracción en Fase Sólida (Solid Phase Microextraction)

SSLLE Extracción líquido líquido en soporte sólido (Solid-Supported Liquid-Liquid Extraction)

T

Tetra Tetracepam

TOF Tiempo de Vuelo (Time of Flight)

U

UHPLC Cromatografía Líquida de Ultra Eficacia (Ultra High Performance Liquid Chromatography)

UPLC Cromatografía Líquida de Ultra Eficacia (Ultra Performance Liquid Chromatography)

UV Ultravioleta

V

VANS Micromuestreo de Absorción Volumétrica (Volumetric Absorptive Microsampling)

VIS Visible

VWD Detector de longitud de onda variable

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. INTRODUCCIÓN

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BENZODIAZEPINAS.

1.1.1. Propiedades fisicoquímicas.

Las benzodiazepinas son los fármacos más prescritos en el mundo. Formadas por un anillo poco habitual de siete lados, fusionado con un anillo aromático, con cuatro grupos sustituyentes principales que pueden modificarse sin pérdida de actividad (Figura 1, Tabla 1). [1, 2]

Alprazolam: Polvo cristalino blanco. Soluble en cloroformo y diclorometano, poco soluble en alcohol y acetona y prácticamente insoluble en agua. 8-chloro-1-methyl-6-phenyl-4H-[1,2,4] triazolo [4,3-α] [1,4]. $C_{17}H_{13}ClN_4$. Peso molecular: 308,8 g/mol. Nombre comercial: Trankimazin. pK_a 2,4.

Bromazepam: Polvo cristalino blanco o amarillo. Parcialmente soluble en alcohol y diclorometano y prácticamente insoluble en agua. 7-bromo-1,3-dihidro-5-(2-piridinilo)-2H-1,4-benzodiacepin-2-ona. $C_{14}H_{10}BrN_3O$. Peso molecular: 316,2 g/mol. Nombre comercial: Lexatin. pK_a 11.

Clonazepam: Polvo cristalino blanco o amarillo claro. Soluble en acetona y cloroformo. 5. (2-clorofenilo)-1,3-dihidro-7-nitro-2H-1,4-benzodiacepin-2-ona $C_{15}H_{13}ClN_3O_3$. Peso molecular: 315,7 g/mol. Nombre comercial: Rivotril. pK_a 1,5/10,5.

Diazepam: Polvo cristalino blanco o amarillo. Ligeramente soluble en agua, soluble en etanol y cloroformo. 7-cloro-1,3-dihidro-1-metilo-5-fenilo-2H-1,4-benzodiacepin-2-ona. $C_{16}H_{13}ClN_2O$. Peso molecular: 284,7 g/mol. Nombre comercial: Valium. pK_a 3,3.

Lorazepam: Polvo blanco. Soluble en etilacetato, alcohol y cloroformo. 7-cloro-5-(2-clorofenilo)-1,3-dihidro-3-hidroxi-2H-1,4-benzodiacepin-2-ona. $C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$. Peso molecular: 312,2 g/mol. Nombre comercial: Orfidal. pK_a 1,3/11,5.

Lormetazepam: Polvo blanco cristalino. Soluble en cloroformo, parcialmente soluble en etanol y metanol y prácticamente insoluble en agua. 7-cloro-5-(2-clorofenilo)-1,3-dihidro-3-hidroxi-1-metil-2H-1,4-benzodiacepin-2-ona. $C_{16}H_{12}Cl_2N_2O_2$. Peso molecular: 335,2 g/mol. Nombre comercial: Loramet.

Tetrazepam: Cristal amarillo-castaño. 7-cloro-5-(1-clorohexen-1-il)-1,3-dihidro-1-metil-2H-1,4-benzodia-cepin-2-ona. $C_{16}H_{17}ClN_2O$. Peso molecular: 288,8 g/mol. Nombre comercial: Myolastan. [3]

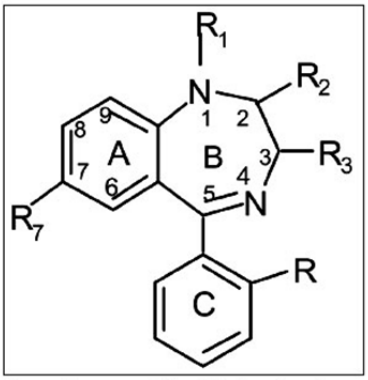


Figura 1: Estructura general de las benzodiazepinas.

Tabla 1: Estructura química de las benzodiazepinas estudiadas.

Droga	R_1	R_2	R_3	R	R_7
Alprazolam	Anillo triazol fusionado		H	Cl	Cl
Bromazepam	H	=O	H	N	Br
Clonazepam	H	=O	H	Cl	NO_2
Diazepam	CH_3	=O	H	H	Cl
Lorazepam	H	=O	OH	Cl	Cl
Lormetazepam	CH_3	=O	OH	Cl	Cl
Tetrazepam	H	=O	CH_3	-	Cl

1.1.2. Propiedades farmacológicas.

Las benzodiazepinas se usan habitualmente como hipnóticos, ansiolíticos, anticonvulsivantes y relajantes. Son depresores del SNC a través del neurotransmisor ácido gamma-amino butírico (GABA), el principal inhibidor del SNC. La unión del GABA a su receptor desencadena la apertura de un canal de cloro, incrementando el paso de este ión. Las benzodiazepinas aumentan la frecuencia de apertura de los canales, producida por el GABA. La entrada de estos iones causa una leve hiperpolarización que aleja el potencial postsináptico de su umbral de descarga y, por lo tanto, inhibe la formación de potenciales de acción (Figura 2). [1, 4-5]

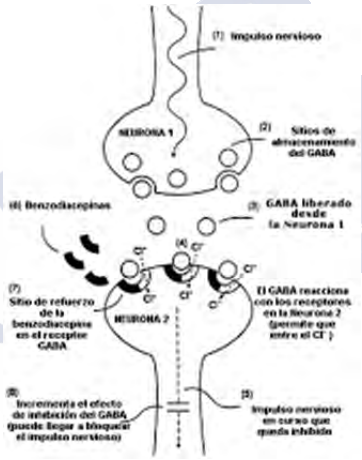


Figura 2: Mecanismo de acción de las benzodiazepinas. Con permiso de Prof. C. Heather Ashton, DM, FRCP (www.benzo.org.uk/espman/bzcha01.htm)

Las benzodiazepinas no poseen actividad antipsicótica ni analgésica y no afectan al sistema nervioso autónomo. Todas las benzodiazepinas presentan en mayor o menor grado las siguientes acciones: reducción de la ansiedad, acción sedante, hipnótica, anticonvulsivante, relajante muscular y amnesia retrógrada.

Los usos terapéuticos de las distintas benzodiazepinas son trastornos musculares y del sueño, amnesia y convulsiones, reducción de la ansiedad y de la agresión.

Los efectos adversos de las benzodiazepinas incluyen somnolencia y estado de confusión. A dosis altas, produce ataxia que impide realizar actividades que requieran una actividad motora fina. Su grado de seguridad es alto pero potencian la toxicidad de otros depresores del SNC. Debido a la confusión que existe sobre sus acciones tóxicas, se usan frecuentemente en los intentos de suicidio. [1, 4]

1.1.3. Farmacocinética.

Absorción y distribución: Se pueden administrar por vía oral, intravenosa o intramuscular. La absorción de la benzodiazepinas, por vía oral, es buena, aunque el tiempo que puede tardar el proceso puede variar notablemente. El tiempo de absorción puede variar entre media hora y ocho horas. La absorción por vía muscular es aleatoria y errática y algo lenta, obteniéndose niveles inferiores en la sangre que los obtenidos por vía oral.

Las benzodiazepinas se distribuyen ampliamente por todos los tejidos, cruzan la barrera placentaria y hematoencefálica y la mayor parte de ellas se pueden encontrar en la leche materna (Tabla 2).

Tabla 2: Parámetros farmacocinéticos de las benzodiazepinas.

Droga	Vida media (h)	Vol. Distribución (L/kg)	Unión a proteínas (%)	Dosis diaria (mg)
Alprazolam	11-15	0,7	70-80	1-3
Bromazepam	8-19	0,9	70	3-18
Clonazepam	20-40	3	86	4-8
Diazepam	20-100 (media 48)	0,5-2,5	98-99	5-30
Lorazepam	9-24	1-2	90	1-10
Lormetazepam	10	5	90	0,5-1,5
Tetrazepam	10-25	-	-	25-150

Metabolismo: Son metabolizadas en el hígado con ayuda de las enzimas microsomales. La primera fase de la ruta metabólica incluye hidroxilación, desalquilación, desaminación y/o reducción. Tras la formación de productos hidroxilados, se produce la conjugación con ácido glucurónico.

Alprazolam: Se metaboliza por oxidación y conjugación. Los principales metabolitos son α-hidroxialprazolam, 4-hidroxialprazolam y α,4-hidroxialprazolam. La escisión del enlace 5,6-azometina forma el 3-hidroxi-5-metiltriazoil, análogo de la clorobenzofenona (HMTPB).

Bromazepam: Es metabolizado en primer lugar por 3-hidroximetilación y escisión del anillo de siete miembros, seguida por la conjugación glucurónida.

Clonazepam: Su principal metabolito es el 7-aminoclonacepam, formado por la reducción del grupo 7-nitro del clonazepam. Este es conjugado por N-acetilación para formar 7-acetamidoclonazepam. Tanto el compuesto como los metabolitos sufren 3-hidroxilación y conjugación.

Diazepam: El diazepam sufre N-desmetilación a nordiazepam, ambos son convertidos a los 3-hidroxi derivados (temazepam y oxazepam).

Lorazepam: Es rápidamente conjugado con el ácido glucurónico, formando un metabolito inactivo.

Lormetazepam: Su metabolito más importante es el derivado glucurónido. El lorazepam es un metabolito activo que se produce en menor cantidad.

Tetrazepam: Se metaboliza vía N-desmetilación, hidroxilación de las posiciones 3 y 3´ y conjugación. La dihidroxilación del anillo ciclohexil, seguida de la deshidratación lleva a la formación del diazepam y nordiazepam. [1, 3, 4-6]

Eliminación: La vía principal de eliminación es la renal, como glucurónidos o metabolitos oxidados.

Alprazolam: Aproximadamente el 94% de la dosis es excretado, en las primeras 72 horas, en orina (80%), encontrándose un 20% como compuesto inalterado

Bromazepam: Sobre el 2% de la dosis es eliminado en las primeras 72 horas en la orina como bromazepam, 27% como 3-hidroxibromazepam y 40% como producto hidroxilado y conjugado.

Clonazepam: Menos de un 0,5% de la dosis es excretada sin cambios en la orina en las primeras 24 horas, y el 49-60% de la dosis se excreta como metabolitos libres y conjugados.

Diazepam: En la orina solo se encuentran trazas de diazepam y nordiazepam; sobre el 33% de la dosis es excretada como oxazepam glucurónido y el 20% como conjugados del nordiazepam, 4-hidroxidiazepam y temazepam.

Lorazepam: Sobre el 75% de la dosis es eliminado en la orina como lorazepam glucurónido en un periodo de unos cinco días, y sobre el 14% como conjugados o metabolitos menores, que incluyen productos de hidroxilación del anillo.

Lormetazepam: El 86% de la dosis se elimina en la orina y el 3% en heces en un período de siete días. Los metabolitos urinarios incluyen lormetazepam glucurónido (70%), lorazepam glucurónido (6%) y compuesto inalterado (1%).

Tetrazepam: El 57% de la dosis se elimina en tres días, como derivado hidroxilado y metabolitos conjugados. [1,6]

1.1.4. Toxicidad y abuso.

La toxicidad de las benzodiazepinas viene derivada de la acción sedante sobre el Sistema Nervioso Central. Las benzodiazepinas producen sedación, posteriormente hipnosis, y estupor en dosis superiores. Sin embargo, los efectos cardiorespiratorios son leves, y la parálisis respiratoria es excepcional, apareciendo solo en casos de poli-intoxicación con otros depresores del SNC y sobre todo con el alcohol.

La intoxicación por benzodiazepinas en la primera fase incluye incoordinación motora, ataxia, vértigos, habla balbuceante similar a la embriaguez, sin el componente excitante del alcohol. Según avanza la intoxicación, el nivel de conciencia disminuye hasta llegar al coma. Complicaciones muy frecuentes son las lesiones nerviosas por compresión y los síndromes de aplastamiento (Tabla 3).

Tabla 3: Concentraciones letales de benzodiazepinas en diferentes tejidos (µg/mL o µg/g)

Droga	Sangre	Orina	Bilis	Vítreo	Hígado	Riñón
Alprazolam	0,13-2,1	1,0	2,8	0,6	0,2-9,2	3,8
Bromazepam	0,82-7,7	-	-	-	-	-
Clonazepam	0,68-1,4	-	-	-	-	-
Diazepam	5-30	3	0,8	-	16	-
Lorazepam	0,04-0,8	-	-	-	-	-
Lormetazepam	-	-	-	-	-	-
Tetrazepam	-	-	-	-	-	-

Las benzodiazepinas están involucradas en más del 40% de las intoxicaciones medicamentosas. Aunque su grado de seguridad es alto, potencian la acción de otros depresores del SNC.

El consumo de benzodiazepinas como ansiolíticos e hipnóticos no ha disminuido en el período 2010-2018 (Figura 3) y diversos estudios muestran que España se sitúa por encima de la media europea. Diazepam y lormetazepam son las benzodiazepinas que han aumentado ligeramente su consumo durante este período [7]. Aunque la mayoría de las sustancias por las cuales se acude a urgencias son drogas de abuso, una cuarta parte de las intoxicaciones se producen a causa del abuso de medicamentos con o sin receta (opioides y benzodiazepinas). Así, en 2015 clonazepam, diazepam y alprazolam se encontraban entre las veinte drogas más citadas en servicios de urgencias en Europa. [8, 9]

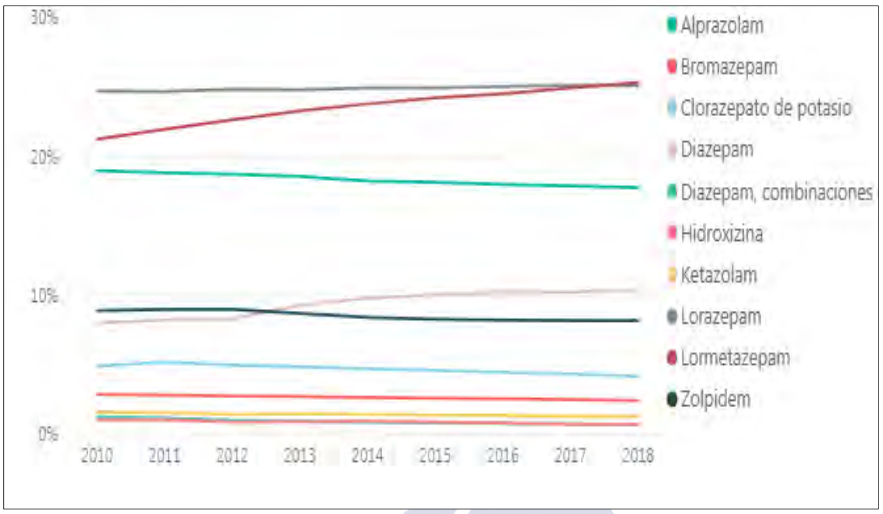


Figura 3: Evolución de las benzodiazepinas en España 2010-2018. Con permiso de Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. AEMPS "Informe de utilización de medicamentos" U/HAY/V1/17012014.

1.2. COCAINA Y METABOLITOS.

1.2.1. Propiedades físicoquímicas.

La cocaína es un alcaloide tropano encontrado en la *Erythroxylon coca*, (Figura 4) en cantidades de hasta el 2% de su peso. Esta planta crece principalmente en los Andes, y en menor medida en India, África e Indonesia. [1, 2]

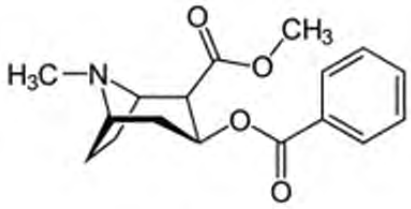
Figura 4. Planta e*rythroxylon coca. Con permiso de Fundation Wikipedia Inc*.

Cocaína: Methyl-(1S, 3S, 4R, 5R)-3-benzoyloxy-8-methyl-8-azabicyclo-[3,2,1] octane-4-carboxylate. Es un polvo blanco cristalino, poco volátil y soluble en agua, pK 8,6. $C_{12}H_{21}NO_4$. Peso molecular: 303,4g/mol.

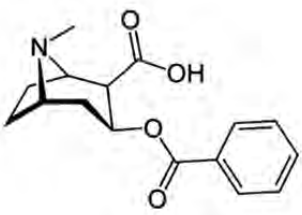
Benzoilecgonina: 3-(Benzoyloxy)-8-methyl-8-azabicyclo [3,2,1] octane-2-carboxylic acid. La forma hidratada se presenta en cristales. Es muy soluble en agua caliente, soluble en etanol y prácticamente insoluble en éter. $C_{16}H_{19}NO_4$. Peso molecular: 289,3g/mol.

Cocaetileno: Ethyl (1R, 2R, 3S, 5S)-3-(benzoyloxy)-8-methyl-8-azabicyclo [3, 2, 1] octane-2-carboxylate**.** $C_{18}H_{22}NO_4$ Peso molecular: 317.4g/mol.

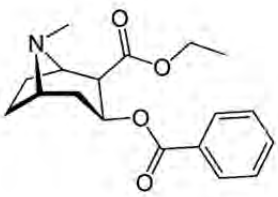
La Figura 5 muestra las estructuras de la cocaína y sus metabolitos benzoilecgonina y cocaetileno. [2]



Cocaína



Benzoilecgonina



Cocaetileno

Figura 5: Estructura de la cocaína, benzoilecgonina y cocaetileno

1.2.2. Propiedades farmacológicas.

La cocaína fue usada como anestésico local y principalmente como droga de abuso por sus efectos estimulantes. Su mecanismo de acción clínica más importante radica en su habilidad para bloquear la conductancia del canal de sodio y así aumentar el umbral necesario para generar un potencial de acción.

La cocaína inhibe la recaptación de neurotransmisores como dopamina, noradrenalina y serotonina (Figura 6), lo que facilita su acumulación en la hendidura presináptica, y una prolongación de los impulsos nerviosos. Los efectos son midriasis, vasoconstricción, hipertensión, taquicardia, hipertermia, euforia, aumento de la excitación sexual, y autoconfianza. Los efectos indeseables incluyen paranoia, alucinaciones y disforia. [1, 6, 10-11]

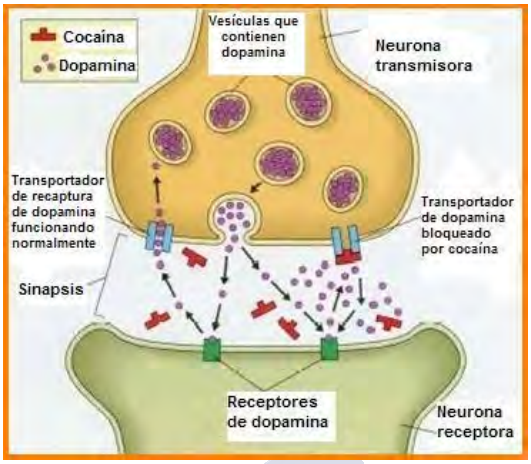


Figura 6: Mecanismo de acción de la cocaína. Con permiso de Isipedia.com.

1.2.3. Farmacocinética.

Absorción y distribución: La cocaína se puede administrar por vía intravenosa, intranasal, oral o fumada, siendo poco frecuente la vía oral porque produce efectos reducidos debido a su liberación ineficaz al cerebro. La vía intravenosa es la única ruta que produce el 100% de la biodisponibilidad de la droga. La biodisponibilidad de las rutas intranasal e inhalada es variable, sin embargo la conveniencia de esas rutas se debe al rápido e intenso inicio de los efectos. [1] La cocaína es rápida y eficazmente absorbida por las membranas de las mucosas y de los pulmones. Sin embargo, el ritmo al que la cocaína aparece en la sangre depende de la ruta de administración. [10]

La cocaína es distribuida ampliamente por todo el organismo, y puede encontrarse en el cerebro, bazo, riñón, pulmón, sangre, corazón y músculo. El volumen de distribución varía entre 1,5 y 2 L/Kg. [11]

Metabolismo: La cocaína es inicialmente metabolizada a benzoilecgonina (BEG) y ecgonina metil ester (EME). Mediante

diferentes mecanismos, las esterasas hepáticas producen el metabolito inactivo EME, mientras que la BEG se forma espontáneamente al pH fisiológico y alcalino, así como a partir de la cocaína gracias a la carboxilesterasa hepática. La cocaína también puede ser N-desmetilada mediante el citocromo P-450 que produce la norcocaína, un metabolito inactivo.

Cuando la cocaína es administrada junto con alcohol etílico se forma el cocaetileno (COCET) por transesterificación mediada por las metilesterasas hepáticas. Este compuesto lipofílico cruza la barrera hematoencefálica y se conoce su contribución a los efectos psicológicos producidos por la cocaína. La aparición del cocaetileno en la sangre puede retrasarse entre 10 y 30 minutos.

Cuando la cocaína es inhalada se forma un producto de pirolisis, la anhidro-ecgonina metil ester. [1,10]

La Figura 7 muestra las distintas rutas metabólicas de la cocaína.

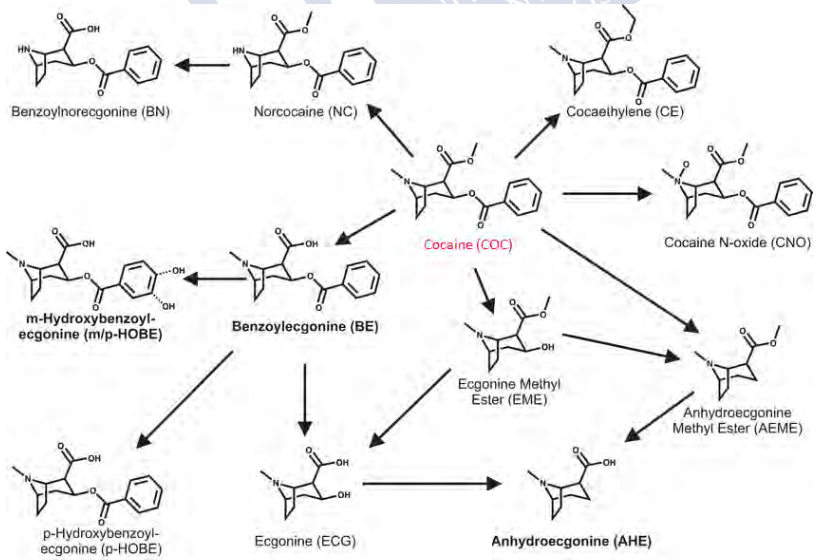


Figura 7: Metabolismo de la cocaína

Eliminación: La cocaína es eliminada por la orina: entre 1 y 9% como droga sin modificar (según el pH de la orina), entre 35 y 45% como benzoilecgonina, entre 32 y 49% como ecgonina metil ester y entre 2 y 3% como ecgonina, en un período de 24 horas. [1, 10]

La presencia de benzoilecgonina en orina es el marcador más utilizado para determinar el consumo de cocaína. Se puede detectar en orina hasta dos o tres días después del consumo, y su concentración dependerá de la cantidad de droga consumida y de la vía de administración. [11]

1.2.4. Toxicidad y Abuso.

La cocaína es la segunda droga ilegal más consumida en Europa. Fue originalmente conocida como "la droga de los ricos" pero los bajos precios y las formas menos costosas de la droga, como el crack, han dado lugar al uso generalizado entre toda la población. Muchos consumidores de cocaína la toman en contextos recreativos, viéndose aumentado el consumo los fines de semana y vacaciones.

Se estima que 17,5 millones de adultos europeos (de 15 a 64 años) han consumido cocaína en algún momento de su vida. Entre ellos hay unos 2,3 millones de jóvenes de 15 a 34 años que han consumido la droga durante el último año. En España, 2008 fue el año de mayor consumo de esta droga entre los más jóvenes, comenzando una bajada que todavía se mantiene en la actualidad; aún así, España es uno de los países europeos con mayor porcentaje de jóvenes que consume cocaína (Figura 8). [8, 12, 13]

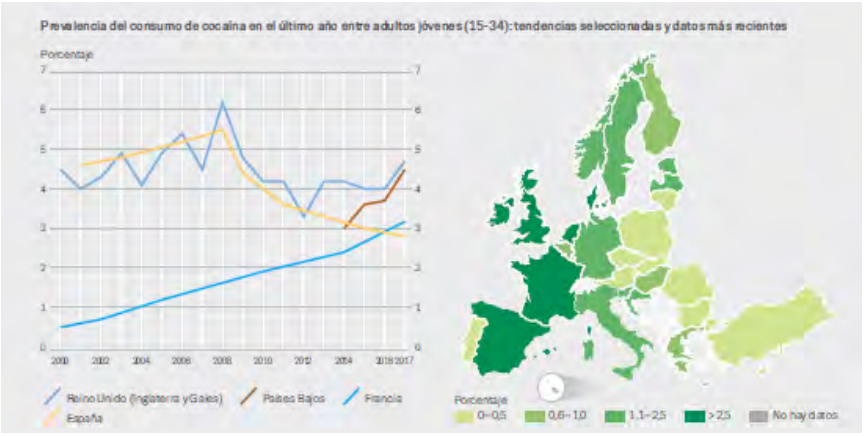


Figura 8: Prevalencia del consumo de cocaína en adultos jóvenes (15-34 años). Con permiso de Observatorio Europeo sobre drogas y toxicomanía "Informe europeo sobre drogas. Tendencias y novedades" Luxemburgo: Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, 2019

Los principales países de producción de cocaína se encuentran en Sudamérica y desde ahí se lleva al resto de países. En Europa la principal ruta de entrada es la costa Atlántica, aunque a causa de los mayores registros se han creado rutas alternativas desde África por el Mediterráneo (Figura 9). [7]

Las sobredosis por cocaína son relativamente bajas considerando lo popular que es su consumo. Se estima que la dosis letal mínima es de 1,2 g pero personas más sensibles a la droga han muerto con dosis tan pequeñas como 30 mg. Sin embargo, los adictos pueden tolerar dosis de hasta 5 g. Se han observado efectos tóxicos con concentraciones en sangre que van desde 0,5 a 5 µg/mL y letales con concentraciones de más de 1 mg/L. En la Tabla 4 se pueden ver los rangos de concentraciones letales en distintos tejidos. [2, 14]

Tabla 4: Concentraciones letales de cocaína en distintos tejidos (µg/mL ó µg/g).

	Sangre	**Cerebro**	**Hígado**	**Riñón**	**Orina**	**HV**	**Bilis**
Rango	0,1-330	0,04-74	0,2-393	3,8-28	0,05-402	0,8-13	2-468

Existen diferentes formas de abuso de la cocaína que determinan las vías de administración de la droga y que condicionan la farmacocinética, la farmacología, el grado de adicción y la toxicidad. Se conocen las siguientes formas de abuso:

Hojas de coca: es la forma de consumo más habitual en Sudamérica. La absorción es variable dependiendo de la cantidad de droga en las hojas (Figura 9a).

Pasta de coca: Es el producto bruto, no refinado que resulta del primer proceso de extracción de la cocaína a partir de las hojas. Se obtiene de la maceración de las hojas con ácido sulfúrico u otros productos químicos y sirve de base para la posterior elaboración de clorhidrato de cocaína. Se fuma (Figura 9b).

Clorhidrato de cocaína: Es la sal de la cocaína formada con ácido clorhídrico que se presenta en forma de cristales blancos. Se consume por vía intravenosa o intranasal, siendo esta última la más habitual (Figura 9c).

Crack: Es la base libre de la cocaína. Se obtiene mezclando el clorhidrato de cocaína con una solución básica, se disuelve con éter, se deja que se evapore y se forma un precipitado "rock". El crack es la segunda forma de consumo de la cocaína y produce una gran dependencia. Se fuma usando pipas de crack (Figura 9d). [6, 11]

Figura 9. Formas de abuso de la cocaína. a) Hojas de coca, b) Pasta de coca, c) clorhidrato de cocaína, d) Crack. con permiso de www.teinteresa.es

1.3. OPIÁCEOS.

1.3.1. Propiedades fisicoquímicas.

Usados durante más de 2000 años, los opiáceos son analgésicos y alcaloides naturales obtenidos de la amapola del opio (Figura 10).

Figura 10. Amapola del opio. Acceso libre

Los exudados obtenidos de la planta contienen numerosos compuestos activos entre los que se incluyen la morfina y la codeína. El término opiáceos se usa para nombrar los alcaloides naturales y semisintéticos obtenidos a partir del opio, así como los preparados sintéticos cuyos efectos farmacológicos y estructuras son similares a los de la morfina. La heroína fue el primer opioide semisintético, obtenido a partir de la morfina en 1874. [1]

6-acetilmorfina: Metabolito de la heroína. Cristales. Soluble en agua. $C_{19}H_{21}NO_4$. Peso molecular: 363,8 g/mol.

Buprenorfina: Polvo cristalino blanco. Poco soluble en agua, soluble en alcohol y metanol. $C_{29}H_{41}NO_4$. Peso molecular: 467,6 g/mol. Pk 8,5-10,0.

Heroína: Diacetato de (5α, 6α)-7,8-didehidro-4,5-epoxi-17-metilmorfiinan-3,6-diol. Polvo blanco cristalino. Soluble en etanol. $C_{21}H_{23}NO_5$. Peso molecular: 369,41g/mol. Pk 7,6.

Metadona: 6-Dimetilamino-4,4-difenil-3-heptanone. Cristales incoloros o polvo cristalino blanco. Soluble en agua. $C_{21}H_{27}NO$. Peso molecular 309,5 g/mol. Pk 8,3. Nombres comerciales: Dolofina, Methadose.

EDDP: 2-Etilidene-1,5-dimetil-3,3-difenilpyrrolidine. Metabolito de la metadona. $C_{20}H_{23}N$. Peso molecular: 277,4 g/mol.

Morfina: (5α, 6α)-7,8-Didehydro-4,5-epoxy-17-metilmorfinan-3,6-diol. Principal alcaloide del opio. Polvo blanco cristalino. $C_{17}H_{19}NO_3$. Peso molecular: 303,4 g/mol. Pk 8,0.

Naloxona: (5ª)-4, 5-Epoxy-3, 14-dihydroxy-17-(2-propenyl) morphinan-6-one. Cristales. Soluble en cloroformo, insoluble en éter. $C_{19}H_{21}NO_4$. Peso molecular: 327,4 g/mol. Pk 7,9. [2]

La Figura 11 muestra la estructura de los opiáceos.

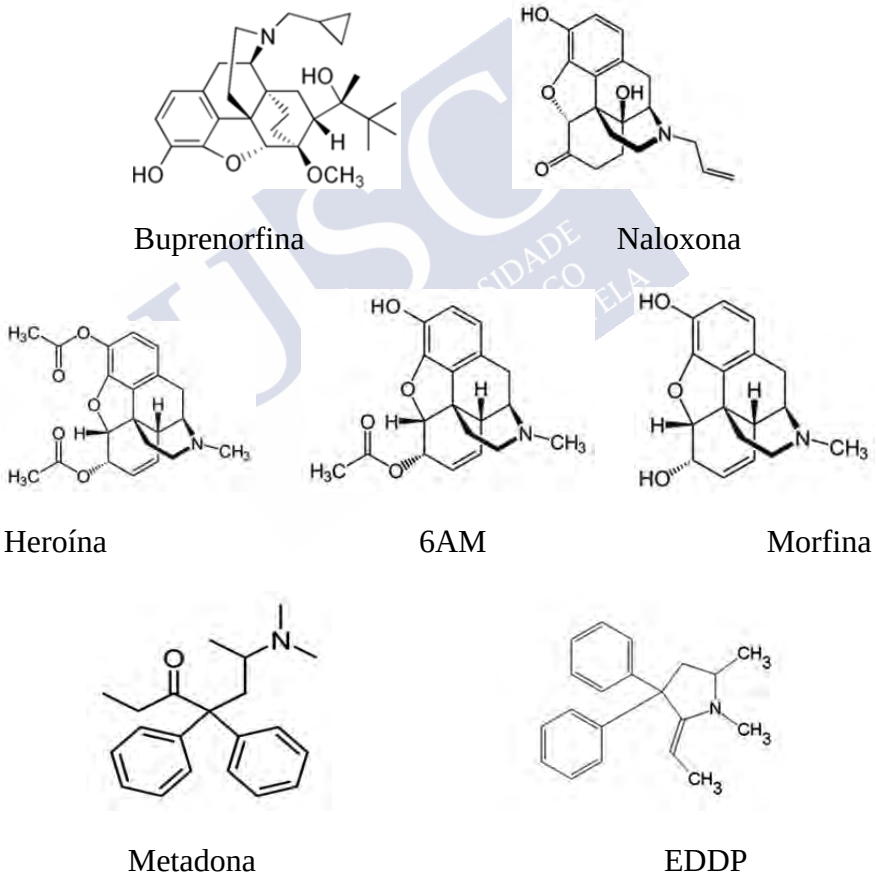


Figura 11: Estructura de los opiáceos.

1.3.2. Propiedades farmacológicas.

Los opiáceos actúan como analgésicos postoperatorios y en emergencias médicas y quirúrgicas como los infartos, traumas, quemaduras y dolor ortopédico. Otras indicaciones incluyen dolor crónico asociado con el cáncer y enfermedades terminales, así como su uso como anestésico o sedante. La Tabla 5 resume los usos específicos de los opiáceos.

Tabla 5: Usos clínicos de los opiáceos.

Droga	Usos	Alivio del dolor	Potencial abuso
Buprenorfina	Infarto, suplemento anestésico, ortopedia, obstetricia	Moderado a severo	Bajo
Metadona	Desintoxicación, mantenimiento	Severo	Alto
Morfina	Cáncer, sedación preoperatoria, suplemento anestésico, obstetricia	Moderado a severo	Alto
Naloxona	Sobredosis de opiáceos, choque séptico	Moderado a severo	Bajo

Los opiáceos ejercen su mayor efecto sobre el SNC. Su importancia clínica se debe a su capacidad para anestesiar sin causar inconsciencia. La anestesia se acompaña de euforia, sedación y mente nublada. Además, pueden producir efectos pulmonares y gastrointestinales, incluyendo depresión respiratoria, náuseas, vómitos y estreñimiento. Otros riesgos incluyen coma, hipotermia, hipotensión y convulsiones. La mayor desventaja asociada al uso de los opiáceos es el riesgo de fallo respiratorio, que es la principal causa de muerte en los casos de intoxicación.

La metadona se usa frecuentemente para la desintoxicación y mantenimiento de las personas dependientes de opiáceos. La buprenorfina es una alternativa a la metadona para la desintoxicación. [2]

1.3.3. Farmacocinética.

Absorción y Distribución: La mayoría de los opiáceos son absorbidos después de la inyección intramuscular o subcutánea. La absorción gastrointestinal es buena, pero la farmacocinética y la biodisponilidad varían considerablemente. Los opiáceos liposolubles tienen una absorción nasal o bucal efectiva, además de las rutas usuales. Las drogas altamente liposolubles pueden absorberse transdérmicamente y actuar rápidamente después de la absorción subcutánea a causa de su absorción acelerada y entrada en el SNC.

La administración intravenosa es la más común en el consumo ilícito por sus rápidos efectos. Debido al miedo por el contagio de enfermedades y la mayor pureza de las drogas, la vía pulmonar se ha hecho más popular para muchas drogas de abuso, como la heroína. Esas rutas de administración pueden no proporcionar la misma euforia que la ruta intravenosa. [3]

En la Tabla 6 se pueden ver los parámetros farmacocinéticos de los opiáceos.

Tabla 6: Parámetros farmacocinéticos de los opiáceos.

Droga	Vida media (h)	Vol. Distr. (L/kg)	Duración analgesia (h)	Unión a proteínas (%)	Rutas administración
Bupre	2-4 (parenteral) 18-49 (SL)	1,4	6,2	4-8	PO, IM, IV, SL, E
Heroína	0,03-0,10	25	3-5	<5	PO,IM, IV, SC, F, IN
Metadona	15-55	4-7	4-6	87	PO, IM, IV, SC
Morfina	1,3-6,7	2-5	4-5	35	PO, IM, IV, SC, E
Naloxona	0,5-1,3	2,6-2,8	1-4	40	PO, IM, IV, SC

PO: oral, PR: rectal, IV: intravenosa, IM: intramuscular, SC: subcutánea, SL: sublingual, E: epidural, F: fumada IN: intranasal. [1, 3, 6]

Metabolismo: El metabolismo tiene lugar en el hígado, formando metabolitos polares.

Buprenorfina, es metabolizada principalmente por N-desalquilación para formar norbuprenorfina, la cual es activa farmacológicamente, y por conjugación del glucurónido de buprenorfina y norbuprenorfina.

Heroína, es desacetilada rápidamente a 6AM y ésta es hidrolizada más lentamente a morfina (Figura 12). La primera reacción es catalizada por las esterasas de la sangre y es inhibida por la adición de fluoruro sódico o tetraetil pirofosfato, mientras que la segunda reacción ocurre presumiblemente en el hígado.

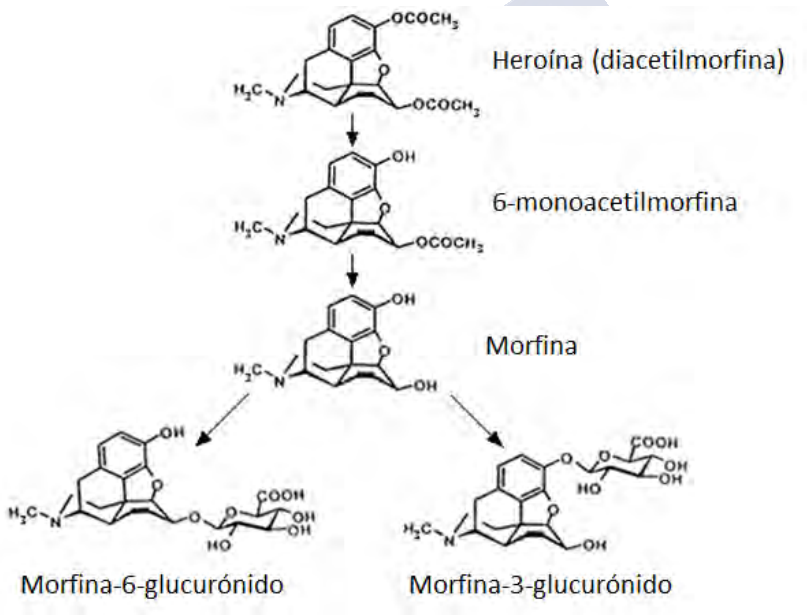


Figura 12: Metabolismo de la heroína y la morfina.

Morfina, se convierte mayoritariamente en morfina-3-glucurónido y aproximadamente un 5% de la dosis es N-desmetilada a normorfina. El metabolismo ocurre principalmente en el hígado (Figura 12).

Metadona, es metabolizada en el hígado por N-desmetilación dando lugar a metabolitos inestables, los cuales experimentan ciclación para formar los metabolitos EDDP y EMDP (Figura 13). Los tres compuestos son parahidroxilados con la posterior conjugación con ácido glucurónico. Metabolitos menores como el metadol y normetadol se producen en baja concentración.

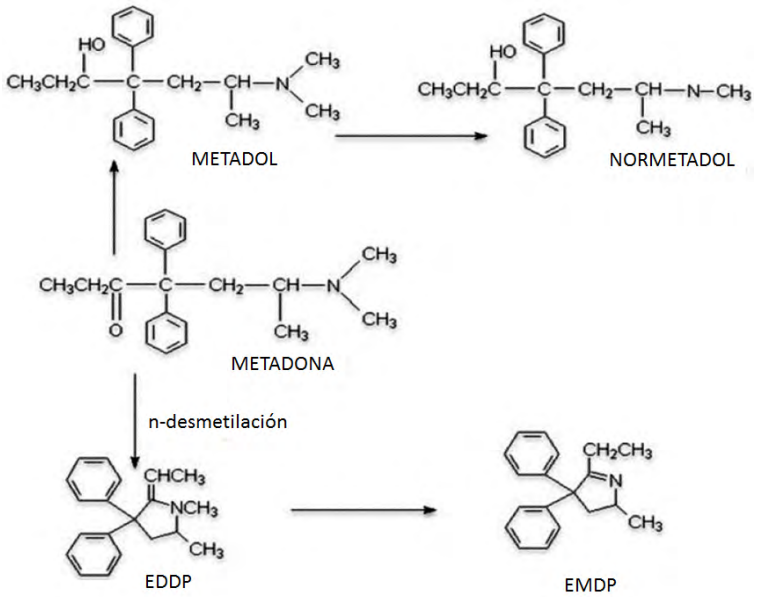


Figura 13: Metabolismo de la Metadona.

Naloxona, es metabolizada en el hígado por N-desalquilación, reducción del grupo 6-ceto y O-glucuronidación. [6, 10, 16]

Excreción: Los metabolitos de los opiáceos son excretados principalmente por la orina.

Buprenorfina: es eliminada principalmente en las heces como droga libre y en menor medida por la orina. Se detecta solo entre 1 y 3 días después de su uso.

Heroína: se elimina por la orina como 6AM, morfina y morfina conjugada. La presencia de 6AM es una evidencia del consumo de heroína. Aproximadamente el 87% de la dosis es eliminada en la orina dentro de las primeras 24 horas, principalmente como morfina-3-glucurónido; solo sobre un 0,1% es eliminado como droga libre.

Morfina: es excretada en un 90% en la orina y 10% eliminada en la bilis. Aproximadamente el 87% de la dosis es excretada en la orina en las 72 h posteriores al consumo, 75% como Morfina-3-glucurónido, el 10% como morfina libre, fracción que puede aumentar dependiendo del pH, y el resto como morfina-6-glucurónido, morfina-3-sulfato, normorfina y conjugados.

Metadona: se elimina por la orina como droga sin modificar y EDDP, y en menor medida como EMDP. Sobre el 33% de la dosis es excretada en la orina como droga sin modificar en las primeras veinticuatro horas. [1, 10]

Naloxona: se elimina por la orina, con una semivida plasmática de 1 a 1,5 horas después de la administración por vía parenteral. El aclaramiento corporal total es de 22 mL/min/kg.

1.3.4. Toxicidad y Abuso.

La intoxicación por opiáceos puede mostrar diversas características clínicas que incluyen pupilas dilatadas, depresión respiratoria, nivel reducido de consciencia, hipotensión y movilidad gastrointestinal retardada. [15]

La toxicidad de los distintos opiáceos depende, no solo de la cantidad de droga consumida, sino también del grado de adicción.

Tabla 7: Concentraciones letales de opiáceos en distintos tejidos. (µg/mL ó µg/g) [14]

Droga		Sangre	Orina	Bilis	Cerebro	Vítreo	Hígado	Riñón
Buprenorfina		0,14-13	0,06-3,4	0,8-2,0	6,4	-	-	-
Heroína	6AM	0-0,53	0,4	-	-	0,004-0,17	-	-
	Morfina	0,01-1,7	0,01-12	0,002-40	0,02-0,7	0,01-0,2	0,04-10	0,7-1,9
Morfina		0,2-7,2	11-323	0,05-248	0,05-1	0,03-0,8	0,05-18	0,05-7
Metadona		0,2-4,5	17-132	5,5-41	0,4-3,7	0,03-0,08	0,8-50	2,9-8
Naloxona		0,004-0,08*	-	-	-	-	-	-

*Terapéutica, no hay datos de concentraciones letales.

El "Golden triangle" incluye Birmania, China y Laos, que son los principales países de producción de opio ilícito, siendo Birmania la que produce el 60-80% de la producción mundial de heroína (Figura 14). [17]

Figura 14: "Golden triangle". Acceso libre.

En Europa, la heroína es el opiáceo más común en el mercado de la droga, que llega principalmente de Afganistán y en menor medida de Asia sudoriental. También han incautado opio y medicamentos como la morfina, metadona, buprenorfina, tramadol y fentanilo. [7, 18]

El opiáceo ilegal más consumido en Europa es la heroína, usando diversas vías:

Fumada (chino de heroína), se suele consumir mezclada con tabaco o cannabis. Es la forma más habitual de consumo en la actualidad.

Esnifada, la heroína se calienta en un papel de aluminio y se inhalan los vapores.

Vía parenteral, se disuelve el producto en agua caliente, se le agrega unas gotas de jugo de limón o vinagre y se inyecta. Hasta el descubrimiento del SIDA fue la forma más habitual de consumo. Proporciona la mayor intensidad y causa la oleada de euforia más rápida.

En Europa ha habido varias oleadas de adicción a la heroína, la primera a mediados de la década de los 70 y que afectó a muchos países de la parte occidental y una segunda entre mediados y finales de los 90 que afectó a países especialmente de la parte central y oriental. La prevalencia del consumo de opioides de alto riesgo entre adultos (de 15 a 64 años) se sitúa en el 0,4 % de la población de la UE, que equivale a 1,3 millones de personas en 2017. A escala nacional, las estimaciones de prevalencia de este tipo de consumo varían entre uno y ocho casos por cada 1 000 habitantes de 15 a 64 años, situándose España en torno a dos por cada 1000 habitantes, cifra que se mantiene desde el 2009. Los cinco países más poblados de la Unión Europea (Alemania, España, Francia, Italia y Reino Unido), que representan el 62% de su población, concentran aproximadamente las tres cuartas partes (77 %) de su cifra estimada de consumidores de opioides de alto riesgo (Figura 15). [13]

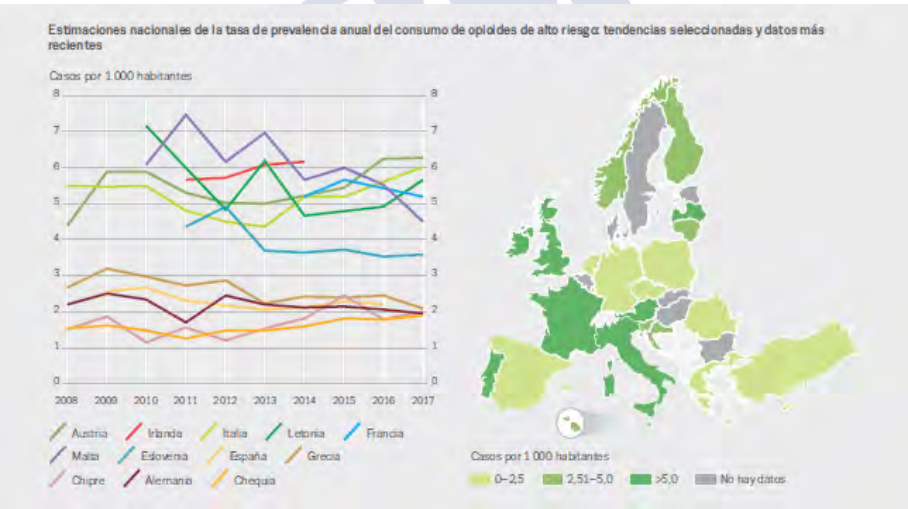


Figura 15: Estimaciones nacionales de prevalencia anual del consumo de opiáceos de alto riesgo, tendencias seleccionadas y datos más recientes. Con permiso de Observatorio Europeo sobre drogas y toxicomanía "Informe europeo sobre drogas. Tendencias y novedades" Luxemburgo: Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, 2019

El aumento de la mortalidad entre los consumidores de opiáceos está principalmente relacionado con la sobredosis, pero existen otras

causas relacionadas como las infecciones, la violencia, los accidentes o los suicidios. Los consumidores de opiáceos tienen una probabilidad entre 5 y 10 veces mayor de morir que personas no consumidoras de su mismo sexo y edad. En la mayoría de muertes por sobredosis hay presencia de opiáceos, con un 78% de varones y un 42-43% de sujetos entre 25 y 64 años. En España, se observa una bajada en el consumo desde 2008 hasta 2012, pero a partir de este año vuelve a aumentar. [6, 7, 13, 18].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4. CATINONAS.

1.4.1. Propiedades fisicoquímicas.

Las catinonas, "sales de baño o bath salts", son nuevas sustancias psicoactivas (NPS) químicamente relacionadas con la catinona, un alcaloide encontrado en el arbusto *Catha edulis* (Khat) que crece en el este de África y el sur de Arabia. Las variantes sintéticas de la catinona son normalmente más potentes que el compuesto natural. [1, 19]

Las catinonas sintéticas son derivados de la fenilalquilamina y están estrechamente relacionadas con las anfetaminas, diferenciándose en el grupo cetona introducido en la posición β de la cadena aminoalquilo unida al anillo fenilo (Figuras 16 y 17, Tabla 8). Estas drogas se usan como alternativas legales a otras drogas, en especial a las anfetaminas.

Catinona: Benzoyletanamina. $C_9H_{11}NO$. Peso molecular: 149,2 g/mol.

Butilona: 2-Methylamino-1-(3, 4-methylenedioxyphenyl) butan-1-one. (βk-MBDB). $C_{12}H_{15}NO_3$. Peso molecular: 221,3 g/mol.

Etilona: 2-Ethylamino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl) propan-1-one. (bk-MDEA). $C_{12}H_{15}NO_3$. Peso molecular: 221,2 g/mol.

Etilcatinona: 2-(ethylamino)-1-phenylpropan-1-one. $C_{11}H_{15}NO$. Peso molecular: 177,2 g/mol.

Etilcatinona efedrina: Metabolito primario de la etilcatinona. $C_{11}H_{17}NO$. Peso molecular: 215,7 g/mol.

Flefedrona: 4-fluoromethcathinone. 1-(4-fluorophenyl)-2-methyl-aminopropan-1-one. $C_{10}H_{12}FNO$. Peso molecular: 181,2 g/mol.

MDPV: Metilendioxipirovalerona. (RS)-1-(Benzo[d] [1,3] dioxol-5-yl)-2-(pyrrolidin-1-yl) pentan-1-one. También conocida como Ola de marfil, Cielo de vainilla, Bendición, Droga caníbal o Leyenda Viviente. $C_{16}H_{21}NO_3$. Peso molecular: 275,3 g/mol.

Mefedrona: (RS)-2-methylamino-1-(4-methylphenyl) propan-1-one. También conocida como 4-MMC, Mf, Comida para Cactus,

meow meow, Miau, CatMef, o MMCAT. $C_{11}H_{15}NO$. Peso molecular: 177,2 g/mol.

Metilefedrina: (1R, 2S)-2-(Dimethylamino)-1-phenylpropan-1-ol. Polvo blanco cristalino. Soluble en cloroformo y éter, fácilmente soluble en agua. $C_{11}H_{17}NO$. Peso molecular: 179,3 g/mol. pK 9,3.

Metilona: 2-Methylamino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl) propan-1-one. MDMC, βk-MDMA. $C_{11}H_{13}NO_3$. Peso molecular: 207,2 g/mol.

Pentedrona: 2-(Methylamino)-1-phenyl-1-pentanone. $C_{12}H_{17}NO$. Peso molecular: 191,3 g/mol.

Pirovalerona: 1-(4-Methylphenyl)-2-(1-pyrrolidinyl)-1-pentanone $C_{16}H_{23}NO$. Peso molecular: 245,4 g/mol. [2, 20, 21]

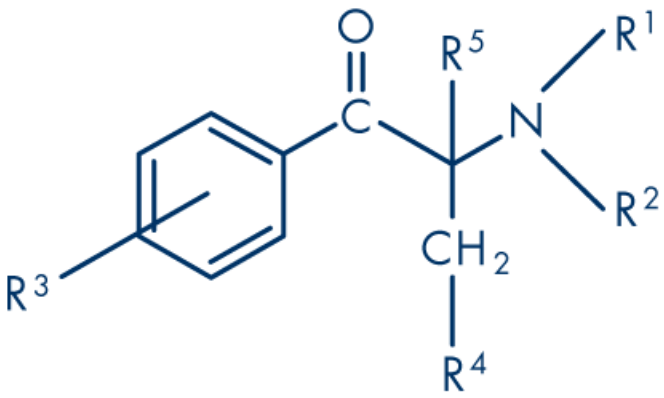
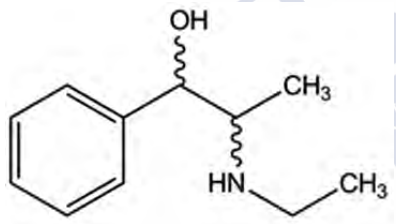
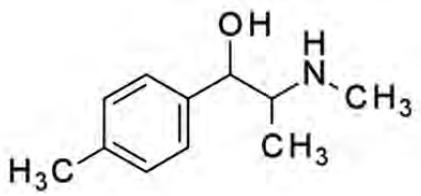


Figura 16: Estructura general de las catinonas

Tabla 8. Estructura química de las catinonas estudiadas

Droga	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
Catinona	H	H	H	H	H
Metilona	Metil	H	3,4-Metilenedioxi	H	H
Etilona	Etil	H	3,4-Metilenedioxi	H	H
Butilona	Metil	H	4-Metil	Metil	H
Mefedrona	Metil	H	4-Metil	H	H
Flefedrona	Metil	H	4-F	H	H
Pirovalerona	{pirrolidino}		4-Metil	Etil	H
MDPV	{pirrolidino}		3,4-Metilenedioxi	Etil	H
Pentedrona	H	H	H	Etil	H
Etilcatinona	H	Metil	H	H	H





Etilcatinona efedrina Metilefedrina

Figura 17: Estructuras químicas de etilcatinona efedrina y la metilefedrina.

1.4.2. Propiedades farmacológicas.

Hay muy pocos datos sobre la farmacocinética y farmacodinamia humana de las catinonas. Al igual que las anfetaminas, las catinonas sintéticas ejercen sus efectos estimulantes al aumentar la concentración sináptica de catecolaminas. Estas moléculas son capaces de inhibir los transportadores de captación de monoaminas produciendo una eliminación reducida de los neurotransmisores de la sinapsis. Además, pueden causar la liberación de aminas biogénicas

de los almacenes intracelulares. Se comportan como depresores del SNC, aunque con una potencia menor que la feniletilamina análoga correspondiente; esto se debe al grupo β-ceto que hace que la molécula sea más polar, dificultando que ésta cruce la barrera hematoencefálica.

Las catinonas poseen propiedades analgésicas lo que reduce la reacción motora producida por un estímulo doloroso térmico o irritativo, por lo tanto, un efecto inhibitorio en la percepción de dolor.

La intoxicación por sales de baño presenta síntomas que incluyen psicosis, hipertermia y taquicardia, que pueden venir acompañados de ataques violentos. El problema más importante de las catinonas quizás sea el "delirio emotivo" en el cual los pacientes sufren agitación extrema, delirio e hipertermia, junto con rabdomiolisis y la consiguiente insuficiencia renal. [12, 19, 21, 22]

1.4.3. Farmacocinética.

Absorción y distribución: Después de una dosis, la catinona alcanza una concentración plasmática máxima en 1 hora aproximadamente. Las piperazinas y las catinonas tienen vidas medias cortas, en torno a 4-5 h, lo que permite concluir que los efectos serán más cortos que los de las anfetaminas.

Metabolismo: El metabolismo hepático de primer paso de la catinona conduce a la formación de norefedrina. Las catinonas sintéticas son N-desmetiladas, el grupo ceto se reduce a hidroxilo y los grupos alquilo del anillo se oxidan. El metabolismo primario de la metilona (Figura 18), etilona y butilona comienza con la desmetilación del anillo metilendioxi, seguida por una O-metilación mediada por la catecol-O metiltransferasa dando lugar a 4-OH-3-metoxi o 3-OH-4-metoximetcatinona. También sufre este proceso la mefedrona, que es N-desmetilada a una amina primaria. A continuación, los grupos cetona son reducidos a alcoholes y finalmente el grupo "totyl" es oxidado al correspondiente alcohol. La N-desalquilación parece ser otra vía metabólica.

El metabolismo de MDPV se evaluó in vitro, demostrando que los principales metabolitos son catecol y metil-catecol pirovalerona, que a su vez son sulfatados y glucuronados.

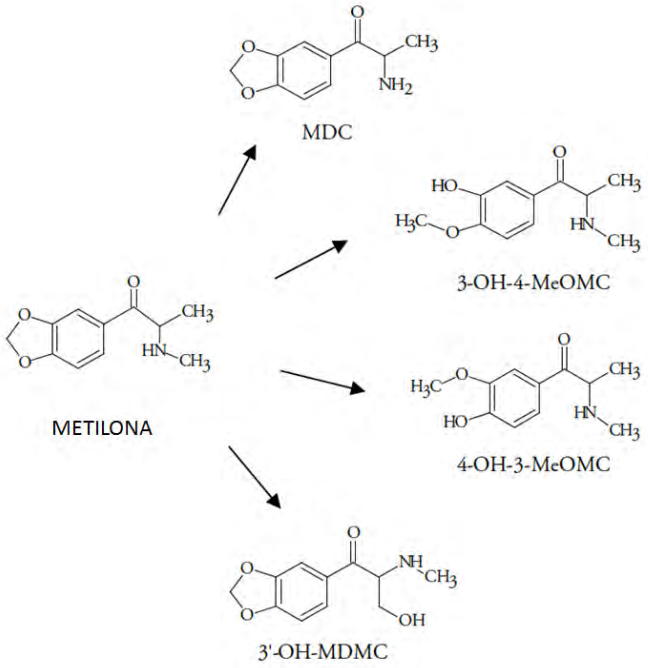


Figura 18: Metabolismo de la metilona.

Excreción: El 2% de la catinona se excreta sin modificar. La semivida de eliminación de la catina y la catinona es de 5,2 ± 3,4 y 1,5 ± 0,8 h respectivamente. Las catinonas sintéticas son eliminadas principalmente por la orina, como metabolitos y, en menor medida, como droga sin modificar. [23]

1.4.4. Toxicidad y abuso.

Las catinonas sintéticas fueron inicialmente usadas con fines terapéuticos y finalmente introducidas en el mercado de drogas recreativas como substitutos legales de las drogas ilegales, en especial de las anfetaminas. [20]

Los efectos tóxicos de las catinonas incluyen incremento de la frecuencia cardíaca, agitación, dificultad para respirar e incremento de la presión arterial. Las muertes son causadas por toxicidad aguda pero a menudo se ven implicadas otras drogas. Las catinonas también se asocian con ideas suicidas lo que da como resultado casos de suicidios asociados con su uso.

Las catinonas sintéticas constituyen el segundo grupo de nuevas substancias vigiladas por la EMCDDA. Se han detectado un total de 118, catorce de ellas por primera vez en el año 2016. El aumento de la demanda de estas substancias se debe a la percepción entre los jóvenes de que son alternativas legales relativamente seguras. Sin embargo, cada vez es más evidente que su consumo es problemático en algunos ámbitos y en poblaciones vulnerables.

En 2015, las catinonas sintéticas representaron casi un tercio de las incautaciones de nuevas substancias psicoactivas y casi un 60% de ellas procedían de China. En 2017 el número de incautaciones fue del 25% del total ocupando el segundo lugar solo por detrás de los cannabinoides sintéticos [7, 8, 12, 13].

1.5. ESCOPOLAMINA.

1.5.1. Propiedades fisicoquímicas.

La escopolamina, hioscina o burundanga es un alcaloide tropano que se encuentra en las plantas de la familia de las solanáceas, como la hyoscyamus niger o beleño negro, la datura stramonium o estramonio y la brugmasia candida o trompa de ángel (Figura 19). [1, 6]

a b c

Figura 19: (a) Hyoscyamus Niger, (b) Datura Stramonium, (c) Brugmasia Candida. Acceso libre.

La escopolamina (1α,2β,4β,5α,7β)-9-metil-3-oxa-9azatriciclo [3.3.1.$0^{2,4}$] non-7-il-(α-S)-α-(hidroximetil) benceno acetato (Figura 20) es un líquido viscoso que forma cristales monohidratados. Soluble en agua caliente, etanol, cloroformo, acetona y eter. $C_{17}H_{21}NO_4$. Peso molecular: 303,4 g/mol. pK 7,6 [2]

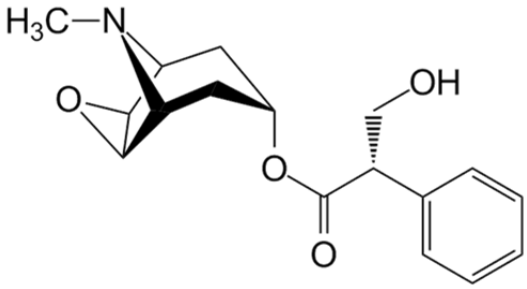


Figura 20: Estructura de la escopolamina.

1.5.2. Propiedades farmacológicas.

La escopolamina fue el primer fármaco que se comercializó en un dispositivo terapéutico transdérmico que suministra fármaco (Scopoderm®). Se utiliza para los mareos, prevención de náuseas y vómitos postoperatorios, el parche se coloca en una zona sin pelo detrás de la oreja. También se usa el hidrobromuro de escopolamina en oftalmología para provocar la dilatación de la pupila. A causa de sus propiedades como antagonista muscarínico y depresor del sistema nervioso central tiene diversas aplicaciones terapéuticas que incluyen el uso como pre-anestésico, tratamiento del Parkinson y desórdenes gastrointestinales. [6, 24]

La escopolamina tiene un efecto peculiar, bloquea la memoria de los hechos recientes; por este motivo, se usa con fines delictivos, diluido en bebidas alcohólicas, aspirado en cigarrillos, para sedar a personas que luego serán víctimas de violación, secuestro o robo. La escopolamina en altas dosis también puede causar euforia y es posible el consumo abusivo de esta sustancia aunque esto no es habitual. [22, 24]

1.5.3. Farmacocinética.

Absorción y distribución: La escopolamina se absorbe bien tras la aplicación por vía transdérmica y gastrointestinal. La biodisponibilidad tras la ingesta oral es del 27%. El volumen de distribución de la escopolamina es 1,6-1,9 L/kg. [6, 24, 25]

***Metabolismo*:** Los datos sobre el metabolismo en el ser humano son limitados y la variedad potencial de los metabolitos de la escopolamina es elevada. La mayoría de los datos sobre metabolitos se refieren a otros mamíferos.

***Excreción*:** Es excretada principalmente por el hígado y menos de un 10% se elimina por vía renal, un 5% como droga sin modificar. [25, 26]

1.5.4. Toxicidad y abuso.

A causa de la limitada información sobre la toxicidad aguda de la escopolamina, no está claro qué metabolitos contribuyen a la toxicidad del fármaco. Los efectos de la intoxicación por escopolamina son: piel seca, hipertermia, sequedad de boca y ausencia de saliva y sudor, midriasis, visión borrosa, taquicardia y retención urinaria. Pueden también observarse cambios de humor, ataxia, falta de atención y pérdida de memoria. A dosis elevadas produce desorientación, ligera euforia y alucinaciones, delirio, coma e incluso la muerte. [22, 24]

Las concentraciones letales de escopolamina no han sido determinadas puesto que las muertes por esta droga son raras. En niños, dosis de 10 mg pueden ser letales. En la Tabla 9 se pueden ver los rangos tóxicos en sangre y orina, y el rango terapéutico en sangre. [2, 24]

Tabla 9: Concentraciones de la escopolamina en sangre y orina (µg/mL).

Escopolamina	Terapéutica	Tóxica	Letal
Sangre	0,0002-0,019	0,0009	-
Orina	-	0,11	-

La escopolamina no es en sí misma una droga de abuso, pero a causa de sus propiedades sedantes se usa mezclada en bebidas alcohólicas o en cigarrillos, con fines delictivos, como robos o violaciones. [22, 24]

1.6. MUESTRAS BIOLÓGICAS.

1.6.1. Sangre.

La sangre es una de las muestras más apropiadas en la investigación toxicológica. Tiene dos componentes principales el plasma y las células (glóbulos rojos o eritrocitos, glóbulos blancos o leucocitos y plaquetas). La mayoría de los métodos optimizados para el análisis de tóxicos se hacen en plasma o suero, siendo el plasma el más usado de los dos (Figura 21). Para la obtención del plasma a partir de la sangre total recogida con adición de un anticoagulante, ésta se somete a centrifugación, separándose así los hematíes de los leucocitos y el plasma. [1, 3, 27, 28]

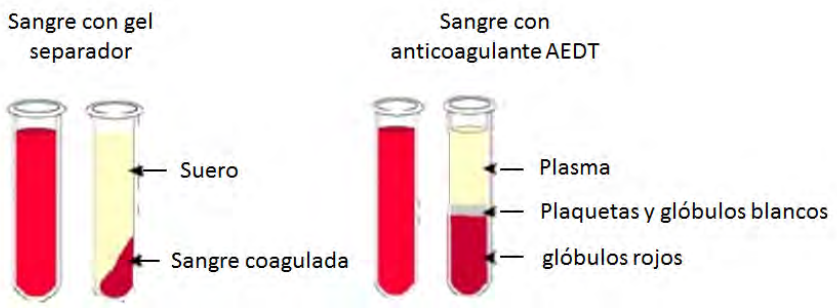


Figura 21: Plasma y suero.

La mayoría de los tóxicos van disueltos en el plasma o unidos a proteínas, por lo que la sangre total y el plasma son las muestras más representativas para el análisis de tóxicos. Pero el plasma resulta más cómodo, puesto que posee menos interferencias y pigmentos que la sangre, lo que evita la formación de emulsiones, más frecuentes en la sangre total. [29]

El volumen de muestra que puede obtenerse es de 10 a 20 mL en individuos vivos o muertos si la sangre es periférica, pero esta cantidad puede aumentar si la sangre procede del corazón. En sangre se puede detectar el consumo reciente de fármacos, pudiendo relacionar la concentración obtenida con los efectos farmacológicos

que presentan. Hay un gran número de datos en la bibliografía por lo que es relativamente fácil la interpretación de los resultados y además es una muestra que no se puede adulterar, pues el paciente no puede acceder a la misma tras la extracción. Como desventajas está la necesidad de contar con personal médico que realice la extracción, es una recogida invasiva, es necesaria la adición de conservantes, y el tiempo de detección de los tóxicos es corto. [3,10]

1.6.2. Orina.

La orina es un fluido amarillo o amarillo verdoso que se produce en los riñones, está constituida fundamentalmente por agua (98%), además de sales, urea, creatinina y otros productos metabólicos. La unidad funcional de los riñones es la nefrona (Figura 22); cada riñón posee aproximadamente un millón de nefronas, y en ellas se filtra la sangre, quedando limpia de residuos y formándose así la orina. Los riñones son los encargados de la excreción y eliminación de numerosas drogas y metabolitos. [10, 27]

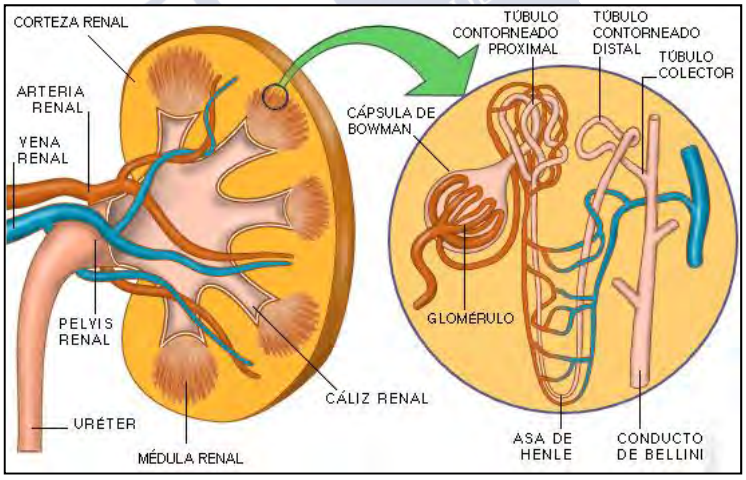


Figura 22: Nefrona. Con permiso del Ministerio de Educación. Proyecto Biosfera http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/profesor/

La orina es una muestra muy útil para el screening de tóxicos, puede obtenerse en grandes cantidades y contiene concentraciones elevadas de drogas, hasta 100 veces mayores que las de sangre. [27, 29, 30]

La orina es elegida para el análisis toxicológico puesto que su obtención es fácil y las sustancias y sus metabolitos pueden detectarse en muchos casos varios días o semanas después de su consumo. La orina no necesita la adición de conservantes y es una muestra fácil de manipular, está exenta de proteínas y al poseer pocas interferencias no necesita métodos complejos de pretratamiento.

Sin embargo, esta muestra también presenta desventajas porque a veces los metabolitos son comunes para varias drogas (p. ej. benzodiazepinas) lo que dificulta la identificación de la droga consumida si no es posible analizar otra muestra biológica. Además, si la muerte se produce rápidamente, puede que el tóxico todavía no se encuentre en ella, por lo que se podrían obtener resultados falsos negativos. También es importante destacar lo fácil que resulta adulterar la orina, por lo que sería necesario realizar una recogida en presencia de una persona para evitar su adulteración. [3, 28-30]

1.6.3. Saliva.

La saliva o más apropiadamente fluido oral es producida en la cavidad oral por tres glándulas (parótidas, submaxilares y sublinguales) (Figura 23). En condiciones normales se producen entre 0,5 y 1,5 L de saliva al día en cantidades de 0,6 mL/min. Está compuesta por un 90% de agua y otros constituyentes como enzimas digestivas, moco y sales minerales.

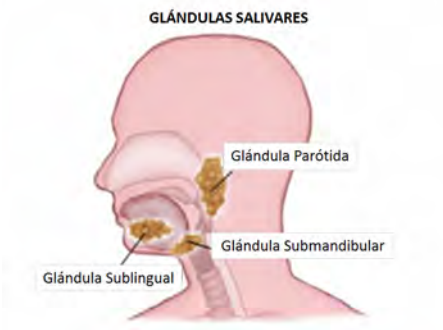


Figura 23: Glándulas salivares.

La recogida de la saliva se lleva a cabo con un dispositivo adecuado (Salivette®) (Figura 24). Se extrae el algodón, que se introduce en la boca durante unos minutos para que se empape de fluido oral, se pone de nuevo en la parte superior del dispositivo y se centrifuga, obteniéndose la muestra en la parte inferior. La recogida es un proceso no invasivo.

Figura 24: Recogida de saliva. Con permiso de Catálogo 2019-20 SARSTEDT AG & Co. KG Sarstedtstraße 1 51588 Nümbrecht Alemania.

En el fluido oral podemos encontrar las drogas sin modificar y relacionar su concentración con la obtenida en muestras plasmáticas. Esto, junto con su fácil preparación y la posibilidad de detectar numerosas drogas, hace que sea una muestra idónea en el análisis toxicológico.

Las desventajas de esta muestra son que está influenciada por el pH y el contenido de la cavidad bucal, que hace posible su contaminación, además de la poca cantidad obtenida y su limitación a individuos vivos. [3, 27, 30]

1.6.4. Comparación y elección de muestras.

Otras muestras que pueden usarse en la investigación toxicológica son: pelo, bilis, contenido gástrico o tejidos. El pelo presenta ventajas como la detección de drogas tras semanas o meses de consumo, la

posibilidad de acceder a él de forma fácil y en procesos de descomposición. Sin embargo, el proceso de preparación de la muestra es complejo, puesto que esta matriz es sólida y es necesaria la extracción de las drogas hacia un disolvente. El contenido gástrico es útil cuando el consumo es muy reciente o la muerte se produce de forma rápida tras la ingesta de la droga o drogas, puesto que se pueden encontrar trozos de las pastillas ingeridas. Los tejidos son muestras alternativas que permiten obtener buenos resultados en algunos casos y para determinadas drogas (Tabla 10, Figura 25).

La elección de una muestra se hace en función del tipo de análisis (determinación cuantitativa, screening o confirmación, consumo reciente o habitual), del tipo de droga a analizar, de la disponibilidad de la muestra (individuo vivo o muerto, cadáver reciente o putrefacto) o de la recogida de la misma (presencia de medios especializados en la extracción). [1, 27-30]

Tabla 10: Comparación de las muestras biológicas usadas en Toxicología.

Muestra	Cantidad	Obtención	Ventajas	Desventajas
Sangre	10-20 mL	Antemortem y postmortem	-Determinación de uso reciente (24-48h) -Relación con los efectos. -No adulterable. -Datos de referencia.	-Recogida invasiva. -Personal médico. -Tiempos cortos de detección.
Orina	50 mL	Antemortem y postmortem	-Fácil recogida. -Gran volumen. -Concentraciones elevadas. -No necesita conservantes. -Determinación de uso de días a semanas.	-Niveles bajos de droga consumida. -Fácil manipulación. -No siempre está disponible.

Humor Vítreo	2 mL/ ojo	Postmortem	-Determinación de uso reciente (horas, días). -Resistente a putrefacción. -Pocas interferencias.	-Postmortem. -Poco volumen. -Pocos datos de referencia.
Saliva	1 a 5 mL	Antemortem	-Determinación de uso reciente. -Fácil recogida y preparación. -Drogas sin modificar. -Relación con el plasma.	-Antemortem. -Poco volumen. -Posible contaminación. -Recogida influida por el pH.
Pelo	Depende de la longitud.	Antemortem y postmortem	-Historial de abuso. -Fácil recogida. -Baja posibilidad de manipulación. -Útil en estados de descomposición avanzada.	-No valido para consumo reciente. -Contaminación del medio. -Pocos datos de referencia. -Necesidad de técnicas muy sensibles.
Bilis	50 mL	Postmortem	-Fácil detección de algunas drogas. -Útil para drogas conjugadas.	-Matriz compleja. -Interferencias. -Pretratamiento necesario.
Contenido gástrico	Contenido en estómago	Antemortem y postmortem	-Detección en tiempo corto post-ingesta -Gran cantidad de droga (ingestión). -Fragmentos de pastillas.	-No sirve si la droga fue inhalada -Matriz compleja, no homogénea. -Pretratamiento necesario.

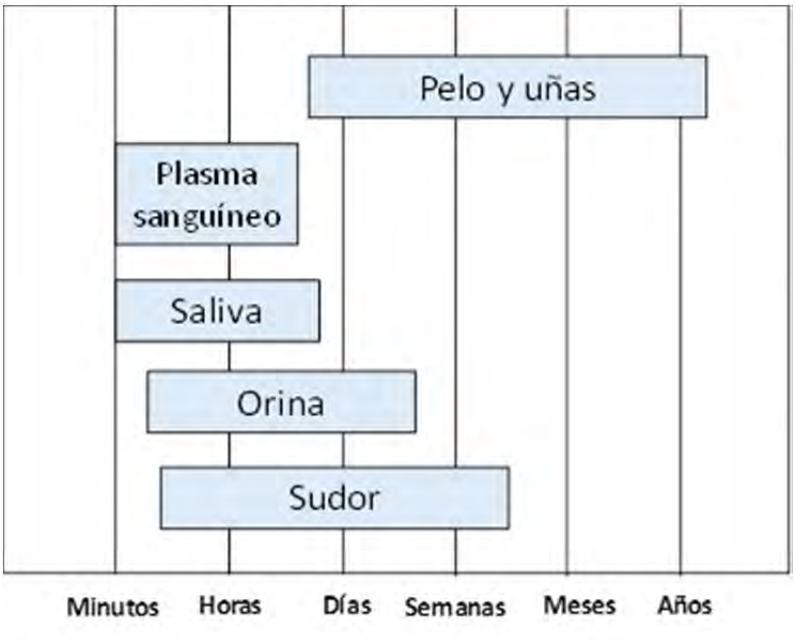


Figura 25: Períodos de detección de drogas en distintas muestras biológicas.

1.7. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN.

En el análisis de drogas en muestras biológicas es muy importante la etapa de preparación de muestra porque se trata de matrices complejas, que contienen interferencias que podrían afectar a la determinación de la droga o a los equipos de detección.

Las técnicas de extracción más ampliamente usadas son la extracción líquido líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE), pero recientemente se han descrito nuevos procedimientos que minimizan el consumo de muestra, disolventes y tiempo. De esta forma, se pueden disminuir los costes del proceso y solucionar los problemas derivados de las pequeñas cantidades de las muestras biológicas recibidas en el laboratorio de Toxicología para su análisis. Estas técnicas nacen de la miniaturización de la LLE y la SPE.

La LLE se basa en la transferencia de los analitos de la fase acuosa a la fase orgánica y, aunque es un método ampliamente utilizado, tiene las siguientes limitaciones: consumo de grandes volúmenes de disolventes orgánicos, caros y tóxicos, producción de desperdicios peligrosos, formación de emulsiones, procedimientos laboriosos y bajos factores de enriquecimiento. La SPE es otra técnica ampliamente usada que se basa en la extracción de los analitos con ayuda de un soporte sólido; el proceso consta de cuatro etapas: 1) acondicionamiento de la fase sólida, 2) carga de la muestra, 3) lavado y secado de la fase sólida, y 4) elución de los analitos con un disolvente adecuado. La SPE consigue mejores resultados frente a la LLE, en relación con la recuperación, selectividad, sensibilidad y limpieza de los extractos obtenidos.

Con el fin de mejorar estas técnicas tradicionales, se han desarrollado técnicas de microextracción que requieren menos cantidad de disolventes, tiempo, trabajo y coste y que son más respetuosas con el medio ambiente. La Microextracción en Fase Sólida (SPME), desarrollada por Pawliszyn en 1990, revolucionó la metodología de preparación de muestra, y en este mismo año también surgió la Microextracción en Fase Líquida (LPME). En 2004, Abdel Rehim [31] introdujo la Microextracción en Sorbentes Empaquetados (MEPS), y en 2006, Rezaee y col. [32] introdujeron la

Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME). Ambas técnicas minimizan el consumo de disolventes y el coste de la extracción. [33-36]

1.7.1. Microextracción líquido líquido dispersiva (DLLME).

La microextracción líquido-líquido dispersiva (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME) está basada en un sistema ternario de componentes, formado por la muestra acuosa, un disolvente extractante y un disolvente dispersante [32]. La mezcla del disolvente extractante y dispersante se inyecta rápidamente en la muestra acuosa, formándose como resultado una solución turbia, que consiste en minúsculas gotas de disolvente extractante que se dispersan a través de la fase acuosa, aumentando la superficie de contacto y mejorando la extracción, pues disminuye el tiempo y aumenta la recuperación de las sustancias en estudio. Finalmente, se centrifuga la muestra para que el disolvente extractante se sitúe en el fondo del tubo (Figura 26).

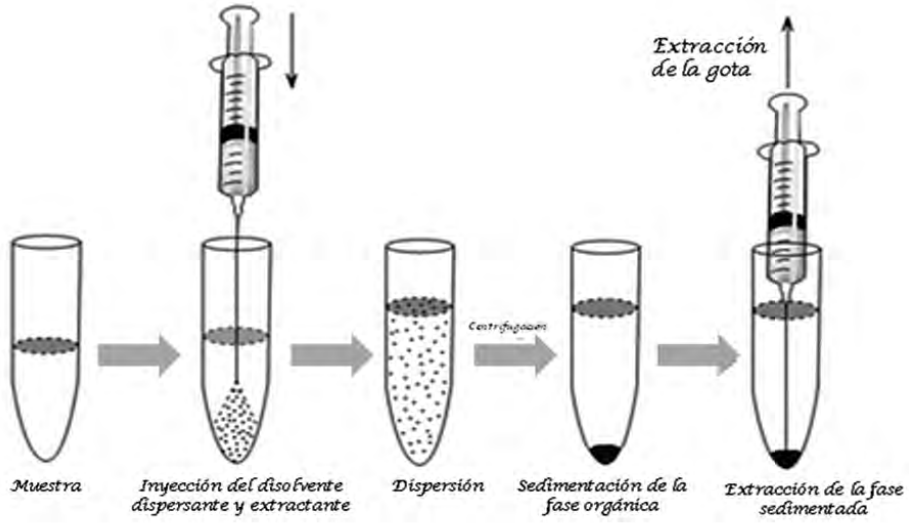


Figura 26: Procedimiento de la DLLME. Con permiso de Agnieszka Zgoła-Grze kowiak, Tomasz Grze kowiak. Trends in Analytical Chemistry, 2011; 30: 1382-1399

En la DLLME tradicional, el disolvente extractante es más denso que la muestra acuosa y es inmiscible en ella; además debe presentar una alta capacidad para extraer los analitos de la muestra. Los extractantes más usados son el cloroformo, diclorometano, tetracloruro de carbono, dicloroetano y clorobenceno. El disolvente dispersante debe ser miscible en la muestra y en el disolvente extractante para favorecer su dispersión en la muestra acuosa y así mejorar la extracción de los analitos. Los dispersantes más usados son acetonitrilo, acetona, metanol y etanol. [33-35, 37-40]

En la DLLME, la adición de sal puede favorecer la obtención de mejores resultados en la extracción; sin embargo, como disminuye la solubilidad del extractante, la fase sedimentada puede crecer y el factor de enriquecimiento decrece; por esta razón es importante optimizar la cantidad de sal añadida para maximizar el porcentaje de recuperación obtenido. El tiempo de extracción se define como el intervalo entre la inyección de la mezcla del dispersante y extractante sobre la muestra acuosa y la centrifugación. Los cortos tiempos que se necesitan suponen una de las mayores ventajas de esta técnica.

La primera aplicación de la DLLME fue desarrollada por Rezaee [32] para la extracción de hidrocarburos policíclicos aromáticos en muestras de agua, demostrando la aplicabilidad del método para la determinación de los analitos en muestras acuosas. En los años siguientes, la DLLME se optimizó generalmente para matrices simples, siendo las muestras acuosas las más estudiadas. Según pasan los años, la técnica se enfoca a matrices más complejas como vino, zumos, miel, leche, aguas residuales y muestras farmacéuticas y biológicas. La DLLME ha sido ampliamente utilizada en la determinación de numerosas drogas y venenos en muestras forenses [31, 33, 36, 38, 40]

Para mejorar la DLLME se pueden introducir varias modificaciones de la técnica. El uso de los ultrasonidos (US) para favorecer la dispersión del extractante en la fase acuosa da lugar a la US-DLLME. En 2009, Xu y col. [41] propusieron una modificación de la DLLME, basada en la solidificación de la gota orgánica flotante SFO-DLLME (Solid Floating Organic Drop-DLLME), la cual usa

disolventes con baja densidad y puntos de fusión por debajo de la temperatura ambiente, como el 1-undecanol, el 1-dodecanol o el hexadecanol. Este procedimiento incluye la inyección rápida de la mezcla dispersante/extractante en la muestra, seguida de la centrifugación; como consecuencia de la baja densidad del disolvente orgánico, la gota se situará en la parte superior del tubo por lo que la muestra se debe someter a un baño de hielo para facilitar la recogida de la gota en estado sólido. En los últimos años y como consecuencia del desarrollo de la química verde, se modificó la DLLME introduciendo como extractantes los líquidos iónicos, que presentan alta estabilidad térmica, baja presión de vapor y viscosidad/solubilidad variable con la temperatura; de esta forma aparece la DLLME con Líquidos Iónicos (IL-DLLME). [33, 35, 38, 40]

1.7.2. Microextracción con sorbentes empaquetados (MEPS).

La Microextracción con sorbentes empaquetados (MEPS) es una miniaturización de la tradicional SPE. Fue introducida en 2004 por Abdel-Rehim [31], y permite trabajar con volúmenes de muestra de entre 10 y 250 µL. Los sorbentes usados en MEPS son los mismos que usa la tradicional SPE pero en cantidades inferiores (1-4 mg) e integrados en una jeringa de líquidos (100-250 µL). En MEPS, el uso de disolventes se reduce en comparación con la SPE y además el adsorbente se puede usar hasta 100 veces.

La reducción del volumen de muestra necesario hace que ésta sea una técnica muy útil en Toxicología, puesto que en muchas ocasiones las muestras son escasas y los análisis requeridos son numerosos. El proceso de extracción es similar al de la tradicional SPE y se divide en cuatro etapas: acondicionamiento de la fase estacionaria, inyección de la muestra, lavado de la fase y elución de los analitos (Figura 27). Sin embargo, se introduce una nueva etapa que es el lavado final de la fase para su reutilización. [31, 38, 42-44]

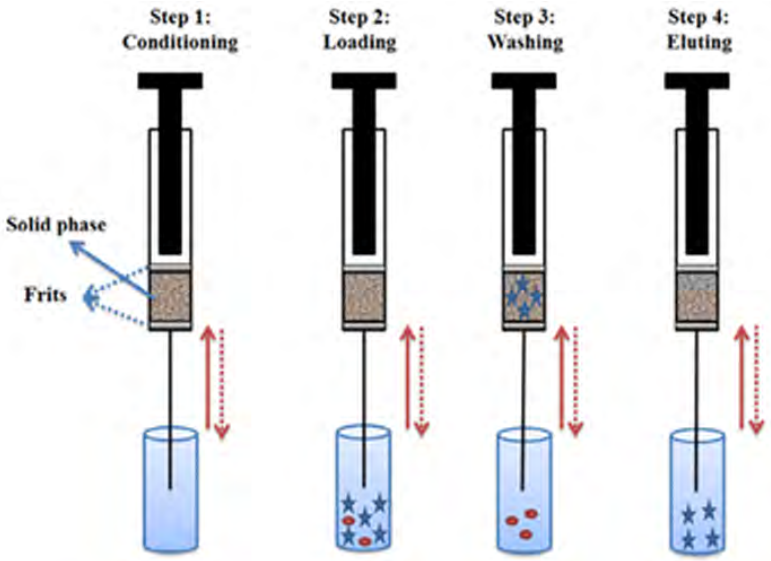


Figura 27: Esquema de MEPS. Con permiso de L. Yang, R. Said, M. Abdel-Rehim. J. Chromatogr. B, 2017; 1043: 33–43.

La puesta a punto de la MEPS debe tener en cuenta diversos factores que afectan al proceso como son: la fase elegida, la muestra, el lavado, el disolvente de elución y el lavado final de la fase. [42, 44]

Se pueden encontrar numerosas fases usadas en MEPS, incluyendo adsorbentes basados en sílice, como SIL (sílice sin modificar), C2 (etil), C8 (octil), C18 (octadecil); modo mixto C8 e intercambio catiónico (SCX) o modo mixto M1 (80% C8 y 20% SCX), poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB) y carbono grafitico poroso, además de adsorbentes no comerciales como los polímeros de impronta molecular (MIPs), etc., que permiten usar MEPS para la extracción selectiva de diferentes analitos[45]. Para la extracción de drogas en muestras biológicas son la C8 y la C18 las dos fases más usadas (Tabla 12).

La carga de la muestra en la fase es un paso importante en MEPS, por lo que se debe hacer lentamente (10-20 µL/seg) y en las condiciones necesarias para que los analitos queden retenidos en la fase. El pH es un factor importante en la retención y elución de los

analitos que afecta a la obtención de altas recuperaciones de los mismos. Es necesario eliminar macropartículas, que puedan obturar la fase, mediante centrifugación de la muestra, e incluso diluirla si ésta es muy viscosa. Otro factor importante es el número de ciclos de carga (strokes) pues esta acción puede incrementar la recuperación de los analitos. [42, 43, 45]

La etapa de lavado, que sirve para eliminar interferencias no deseadas y débilmente retenidas en la fase, es importante para mejorar la recuperación de los analitos y para eliminar futuras interferencias en los equipos de detección que puedan modificar la señal. El disolvente o mezcla de disolventes elegidos, así como el pH de la mezcla son factores importantes a la hora de elegir la disolución de lavado adecuada para cada caso. [43]

La etapa de secado es una etapa recomendada pero no necesaria. [45]

La elución de los analitos debe hacerse con un pequeño volumen del disolvente más adecuado para su recuperación total a partir del sorbente. Debe ser un disolvente orgánico puro o mezclado con disoluciones ácidas o básicas, que sea volátil o soluble en la fase móvil de la cromatografía líquida (LC).

Finalmente, debe introducirse una etapa de lavado posterior al proceso de extracción, que permita reutilizar la fase unas 100 veces dependiendo de la matriz de la muestra. En esta etapa se recomienda hacer un primer lavado con un disolvente orgánico, modificado con un ácido o base dependiendo de la naturaleza de los analitos, y un segundo lavado con agua pura o una disolución acuosa. Se recomienda también repetir cada paso unas cuatro veces. [42]

1.7.3 Revisión bibliográfica

Las tablas 11 y 12 muestran aplicaciones de estas dos técnicas de extracción (DLLME y MEPS) para el estudio cromatográfico de drogas en Toxicología clínica y forense.

Tabla 11: Revisión bibliográfica de la DLLME aplicada a la extracción de drogas a partir de muestras biológicas.

Droga	Muestra (mL)	Dispersante (mL)	Extractante (µL)	Separación	Detección	LOD/LOQ (ng/mL)	Referencia
7-amino-flunitrazepam	Orina (5)	IPA (0,5)	DCM (250)	LC	ESI-MS	0,025 -	[46] Melwanki, 2009
Antidepresivos (ATD)	Orina (5)	ACN (0,5)	CCl_4 (20)	HPLC	UV	3-8 0,5-25	[47] Xiong, 2009
Fentanilo	Orina (5) Plasma (1,25)	MeOH (2)	Cloroformo (162)	HPLC	UV	0,4-1,9 1,1-5,5	[48] Saraji, 2011
Opiáceos	Orina (2)	Acetona (1)	Cloroformo (88)	HPLC	UV	0,2-10 -	[49] Shamsipur, 2011
ATD	Orina (0,3)	MeOH (0,15)	CCl_4 (10)	GC	MS	0,5-2 2-5	[50] Ito, 2011
Anfetaminas	Orina (5)	SDS (0,0565)	1-undecanol (31)	HPLC	UV	2-3 -	[51] Tehrani, 2012

Droga	Muestra (mL)	Dispersante (mL)	Extractante (µL)	Separación	Detección	LOD/LOQ (ng/mL)	Referencia
Benzodiazepinas (BZD)	Orina (5)	EtOH (1)	DCM (102)	HPLC	UV	0,3-0,7 -	[52] Vardini, 2012
Metadona	Orina, plasma, saliva, sudor (0,5)	MeOH (2,5)	Cloroformo (250)	HPLC	UV	4,90-24,85 16,32-82,75	[53] Ranjbari, 2012
BZD	Plasma (0,5)	MeOH (2)	Cloroformo (250)	HPLC / UPLC	PDA	1,7-5,2 4,3-13,2	[54] Fernández, 2013
Drogas de abuso	Orina (4)	IPA (1,4)	DCM (600)	CE CE	UV ESI-TOF-MS	0,1-10 -	[55] Kohler, 2013
Opiáceos	Plasma (1)	Acetona (0,47)	1-undecanol (30)	HPLC	UV	0,5-5 -	[56] Ahmadi-Jouibari, 2013
Clordiacepóxido	Orina (5) Plasma	MeOH (1,8)	Cloroformo (210)	HPLC	UV	1,8-2,7 -	[57] Khodadoust, 2013
BZD	Orina (0,5)	Acetona (1,6)	Cloroformo (160)	UPLC	PDA	0,6-6,2 1,8-7,4	[58] Fernández, 2014

Droga	Muestra (mL)	Dispersante (mL)	Extractante (µL)	Separación	Detección	LOD/LOQ (ng/mL)	Referencia
Drogas psiquiátricas	Orina (1)	ACN (0,27)	CCl_4 (30)	CE	UV	0,03-0,75 1-2,5	[59] Dziomba, 2014
Anfetaminas	Orina (10) Plasma (10)	ACN (1,5)	CS_2 (35)	GC	MS	0,1-0,3/ 0,2-0,7 -	[60] Mashayekhi, 2014
Anfetaminas	Orina (2)	ACN (0,3)	1-undecanol (30)	HPLC	UV	2-8 -	[61] Ahmadi-Jouibari, 2014
BZD	Orina (12)	Acetona(2)	Cloroformo (40)	GC	FID	0,1-0,2 -	[62] Ghobadhi, 2014
Drogas de abuso	Plasma (0,5)	ACN (3,2)	Cloroformo (220)	HPLC	PDA	13,9-28,5 46,2-94,9	[63] Fernández, 2015
Drogas de abuso, BZD y psicotrópicos	Sangre (0,5)	MeOH (0,25)	Cloroformo (100)	UHPLC	MS/MS	0,05-2 0,2-10	[64] Fisichella, 2015
Fentanilo	Orina (0,8)	2-propanol (0,1)	Clorobenceno (30+20)	GC	MS	1,0 -	[65] Gardner, 2015

Droga	Muestra (mL)	Dispersante (mL)	Extractante (µL)	Separación	Detección	LOD/LOQ (ng/mL)	Referencia
Drogas de abuso	Orina (1) Sangre (1)	-	Tolueno (100)	GC	MS	0,5-4/1-2,5 3-6/4,5-15	[66] Meng, 2015
Nuevas Sustancias Psicoactivas (NPS)	Sangre (0,5)	MeOH (0,25)	Cloroformo (100)	UHPLC	MSMS	0,2-2 -	[67] Odoardi, 2015
ATD	Plasma (0,5)	ACN (2,5)	Cloroformo (200)	UPLC	PDA	4-5 12-17	[68] Fernández, 2016
BZD y ATD	Suero (10) Orina (10)	EtOH (1)	1-undecanol (30)	HPLC	UV-VWD	0,4-0,8 1,2-2,7	[69] Farsimadan, 2016
BZD y Z-drugs	Sangre (1)	-	BMIm PF_6 (60)	LC	MS/MS	0,003-4,74 2-50	[70] De Boeck, 2017
Drogas de abuso	Sangre (0,2)	MeOH (1,3)	DCM (200)	GC	MS	10 40	[71] Lin, 2017
BZD	Orina (1)	-	Etil acetato (168)	GC	MS	1-3 3,5-10	[72] Meng, 2017

Tabla 12: Revisión bibliográfica de MEPS aplicada a la extracción de drogas a partir de muestras biológicas.

Droga	**Muestra (mL ó mg)**	**Fase**	**Strokes**	**Eluyente (µL)**	**Separación**	**Detector**	**LOD/LOQ (ng/mL)**	**Ref.**
Cocaína y metabolitos	Orina	C8	10x50	Metileno: cloruro: 2-propanol: NH_4OH (79,5:20:0,5) (100)	-	DART – TOF	1-90 10-500	[73] Jagerdeo, 2009
Anfetaminas	Pelo (1-5)	C18	15x80	MeOH (50)	GC	MS	- 0,2	[74] Miyaguchi, 2009
Buprenorfina Metadona Naloxona	Plasma (100)	C8	15x100	ACN (2x250)	HPLC	CD	0,04-0,9 0,13-0,3	[75] Somaini, 2011
Metadona	Sangre (50) Plasma (50)	C18	15x250 10x160	ACN (2x250)	HPLC	CD	1,2 4,0	[76] Sarazino, 2012
Codeína Morfina	Orina (50)	Poliestireno	1x50	MeOH(50)	Inyección directa	MS	2-5 -	[77] Candish, 2012
Piperazinas	Orina (100)	C18	8x225	MeOH (50)	HPLC	DAD	- 500	[78] Moreno, 2012

Droga	Muestra (mL ó mg)	Fase	Strokes	Eluyente (µL)	Separación	Detector	LOD/LOQ (ng/mL)	Ref.
Piperazinas	Orina (100)	M1	8x225	5% amonio en MeOH (50)	HPLC	DAD	- 100	[79] Moreno, 2012
ATD	Suero (500)	M1	5x50	MeOH: H_2O:25% NH_3 (95:4:1) (4x100)	HPLC	DAD	0,02-0,05 0,08-0,17	[80] Wietecha-Posluszny, 2012
Cannabinoides	Saliva (125)	C18	5x	50mM NH_4OH MeOH (2x25)	LC	MS-MS	0,008-0,012 0,02-0,4	[81] Sergi, 2013
BZD	Plasma (200)	Monolítica	4x100	MeOH: ACN (50:50)	UHPLC	PDA	- 0,01-5	[82] De Souza, 2015
Drogas de abuso	Plasma (300)	M1	10x100	DCM: IPA: NH_4OH (78:20:2) (200)	UPLC	PDA	5-25 10-50	[83] Fernández, 2017
Cannabinoides	Plasma (250)	M1	26x250	10% NH_4OH MeOH (6x100)	GC	MS	- 0,1	[84] Rosado, 2017
Drogas de abuso	Saliva (300)	M1	6x100	DCM: IPA: NH_4OH (78:20:2)	UPLC	MS-MS	- 0,5-10	[85] Ares, 2017

1.8. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.

La cromatografía de líquidos es una técnica usada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacción entre las substancias y la columna cromatográfica.

En una primera etapa, Tswet realizó sus trabajos originales usando la cromatografía de líquidos con columnas de vidrio de diámetros de 1 a 5 cm y longitudes de 50 a 500 cm. Para asegurar caudales razonables, el diámetro de las partículas de la fase estacionaria sólida era de 150 a 200 μm pero incluso así, los caudales eran solo de unas décimas de mililitro por minuto, dando lugar a tiempos de separación de varias horas. Sin embargo, los intentos para acelerar el procedimiento clásico mediante la aplicación de vacío o por bombeo no resultaron efectivos, puesto que el aumento de caudal originaba un aumento de la altura de plato, por encima del mínimo característico y el resultado era una menor eficacia.

Se observó que se podían conseguir grandes aumentos en la eficacia de la columna, disminuyendo el tamaño de las partículas de los rellenos. Sin embargo, no fue hasta finales de los años sesenta cuando se desarrolló la tecnología adecuada para producir y usar rellenos de tamaño de partícula de 3 a 10 μm. Esta tecnología requiere una instrumentación sofisticada para poder trabajar a altas presiones, lo que contrasta con las simples columnas de vidrio de la clásica cromatografía de líquidos, cuyo caudal se debe a la gravedad. Para distinguir estos procedimientos más nuevos de los métodos básicos, se usa la denominación de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). [86]

1.8.1. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es la técnica analítica de separación más usada, debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de muestras no volátiles o termovolátiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a substancias que son de gran interés en la industria, la ciencia y la sociedad en general. [86].

Un cromatógrafo de líquidos de alta eficacia (Figura 28) consta de:

a) Recipientes para la fase móvil y sistema para el tratamiento de disolventes.
b) Bomba.
c) Inyector.
d) Columna cromatográfica.
e) Detector.

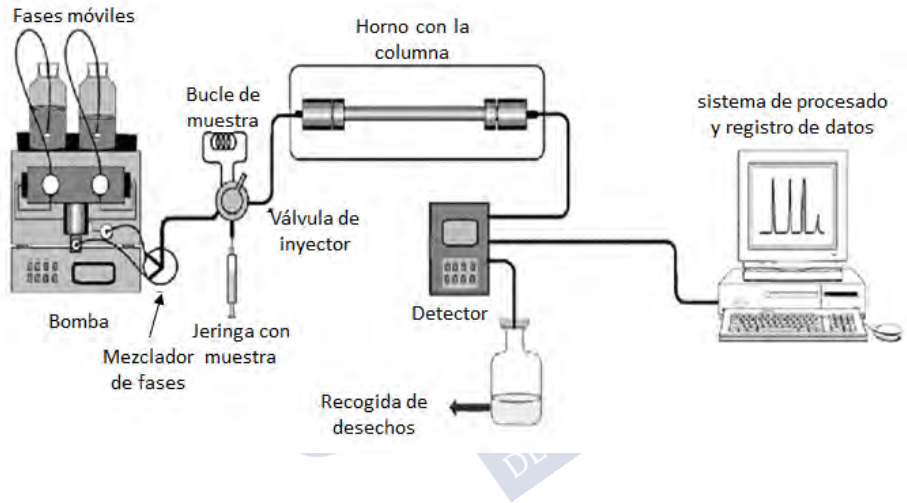


Figura 28: Esquema de un equipo HPLC

a) Recipientes para la fase móvil y sistema para tratamiento de disolventes.

Los equipos modernos de HPLC normalmente están dotados con recipientes de vidrio o acero inoxidable para los disolventes y un sistema para eliminar gases disueltos, que pueden formar burbujas en la columna, provocando ensanchamientos de banda y errores en el funcionamiento del detector. Un desgasificador puede consistir en un sistema de bombeo por vacio, un sistema de destilación, dispositivos para calentar y agitar los disolventes o sistemas de purga que arrastran

los gases disueltos mediante finas burbujas de gas inerte de baja solubilidad. Con frecuencia estos sistemas también presentan un dispositivo para la filtración de polvo y partículas sólidas en suspensión y así evitar daños en la bomba, el sistema de inyección y/o la columna. No es necesario que los sistemas de desgasificación y filtrado se incluyan en el cromatógrafo, pues el tratamiento de los disolventes se puede hacer previamente.

En cromatografía líquida las separaciones se pueden llevar a cabo usando un solo disolvente o mezcla de disolventes (elución isocrática) o usando varios disolventes con una polaridad significativamente distinta que se mezclan en distintas proporciones a lo largo del tiempo (elución en gradiente). La elución en gradiente incrementa notablemente la eficacia de la separación.

b) Bomba.

Los requisitos necesarios para un sistema HPLC son rigurosos e incluyen: la generación de altas presiones, por encima de 6000 psi, un flujo constante en el tiempo y reproducible día a día, un flujo libre de pulsaciones, permitir la variación de flujo en un intervalo práctico de trabajo, un intervalo de caudales de 0,1 a 10 mL/min, ser químicamente inerte, permitir cambios de disolvente y operaciones de mantenimiento de modo simple y rápido, operar sin excesivo ruido o vibración, y disponer de elementos de seguridad. Existen tres tipos de bombas, cada una con sus ventajas y desventajas: bombas recíprocas, bombas de jeringa o desplazamiento y bombas neumáticas o de presión constante. [86, 87]

c) Inyector.

A menudo, el factor limitante en la precisión de las medidas es la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra en la columna. El sistema de inyección debe ser capaz de trabajar a presiones elevadas y de inyectar la muestra en cantidades reproducibles, como una banda lo más estrecha posible. El problema se acentúa por el ensanchamiento de banda que se asocia con la sobrecarga de la columna. Por ello, los volúmenes usados deben ser muy pequeños, de unos pocos microlitros. Además, la muestra se debe

introducir sin despresurizar el sistema; de hecho la inyección de la muestra se realizaba con jeringa a través de un septum que cierra herméticamente. La ventaja de esta técnica es la sencillez, pero desafortunadamente la reproducibilidad de la inyección con jeringa no es buena. [86, 87]

En cromatografía de líquidos, el dispositivo más usado para introducir la muestra utiliza una válvula rotatoria que consta de seis canales con dos posiciones de trabajo (carga e inyección). En la posición de carga, se introduce la muestra mediante una jeringa, que llena un bucle o loop. Al mismo tiempo la fase móvil circula por otro circuito independiente. En la posición de carga, la fase móvil entra en el bucle y arrastra la muestra hacia la columna. Se inyecta un volumen reproducible de muestra y existen bucles intercambiables que permiten la elección de distintos volúmenes de muestra.

d) Columna cromatográfica.

Las columnas para cromatografía de líquidos se construyen con tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme, aunque en algunas ocasiones se usa vidrio o material polimérico. La mayoría de las columnas tienen una longitud entre 10 y 30 cm, con un diámetro interno de 4 a 10 mm y los tamaños de partícula de los rellenos más comunes están entre 5 y 10 µm. Una de las columnas más utilizadas es la de 25 cm, 4,6 mm de diámetro interno y rellena de partículas de 5 µm.

En muchas ocasiones, para alargar la vida de las columnas se coloca delante una precolumna que elimina la materia en suspensión, los contaminantes de los disolventes y componentes de la muestra que se unen irreversiblemente a la fase estacionaria. Además, también sirven para saturar la fase móvil con la fase estacionaria y así minimizar las pérdidas de fase en la columna, por lo que su relleno debe ser semejante al de la columna analítica, aunque el tamaño de partícula suele ser mayor para minimizar la caída de presión. [86, 87]

La mayoría de los instrumentos comerciales llevan actualmente sistemas de calefacción que controlan la temperatura de la columna.

Además, se debe tener en cuenta la temperatura máxima que soporta el relleno de la columna cromatográfica.

e) Detector.

Un detector ideal para cromatografía de líquidos debería poseer las siguientes características: adecuada sensibilidad, estabilidad y reproducibilidad, respuesta lineal para los solutos, tiempo corto de respuesta, alta fiabilidad y manejo sencillo, respuesta similar para todos los solutos, no destruir la muestra y tener un volumen interno mínimo con el fin de reducir el ensanchamiento de banda. Los detectores en cromatografía líquida miden fluorescencia, índice de refracción, conductividad, dispersión de la luz, absorbancia o espectrometría de masas. Los dos últimos son los más usados en la actualidad (Tabla 13).

1.8.2. Cromatografía Líquida de Ultra Eficacia (UPLC).

UPLC es una técnica analítica emergente para llevar a cabo las separaciones rápidas y de alta eficiencia con mayores presiones de trabajo que las de HPLC. Aunque a veces es difícil definir el punto exacto donde termina la HPLC y comienza la UPLC, el uso de presiones más elevadas mejora el rendimiento cromatográfico hasta conseguir la separación de un número mayor de compuestos en un período corto de tiempo. Muchos de los refinamientos que se producen en el campo de la cromatografía de líquidos están relacionados con el desarrollo de pequeñas columnas rellenas con materiales que tienen mejores propiedades de transferencia de masa y la consiguiente necesidad del uso de presiones muy altas para llevar a cabo las separaciones cromatográficas.

Las equipos de UPLC son similares a los de HPLC, solo que las características de los mismos deben estar adaptadas a presiones de trabajo más altas. La diferencia más importante entre los componentes de los cromatógrafos son las columnas. En UPLC se usan columnas más estrechas que en HPLC convencional; estas columnas son empaquetadas con partículas de 2,5 μm o más pequeñas que pueden ser no porosas, porosas superficialmente o totalmente porosas. Mediante su uso, una separación puede realizarse a velocidades más

altas, con poca perdida de resolución. Las partículas totalmente porosas se usan con mayor frecuencia para producir los tamaños más convencionales de 2,1 a 3 mm de diámetro interno, ya que proporcionan un mejor equilibrio entre una alta eficacia y una alta capacidad (gran superficie de área por unidad de volumen) [88].

1.8.3. Detector de array de diodos (DAD).

Es el más habitual en los laboratorios analíticos y su sensibilidad es buena. La mayoría de las moléculas orgánicas absorben en la región UV/Visible. Existe una gran variedad de instrumentos, desde los de longitud de onda fija hasta los sistemas de red de diodos (DAD). Los primeros son útiles para análisis de rutina, en los que las sustancias a separar son conocidas, por lo que interesa exclusivamente el dato cuantitativo. Los segundos permiten el registro a tiempo real del espectro de los compuestos eluídos y proporcionan información sobre la pureza de los compuestos, pasando por sistemas intermedios de longitud de onda programable, más versátiles y más automatizados.

Los sistemas con red de diodos (Figura 29) son buenos detectores a causa de su rapidez. También proporcionan una gran reproducibilidad en las medidas porque el sistema óptico es fijo y estable. El poder disponer de los valores de absorción a distintas longitudes de onda resulta más eficaz para algunas aplicaciones, como en el sistema de multicomponentes. [87, 88]

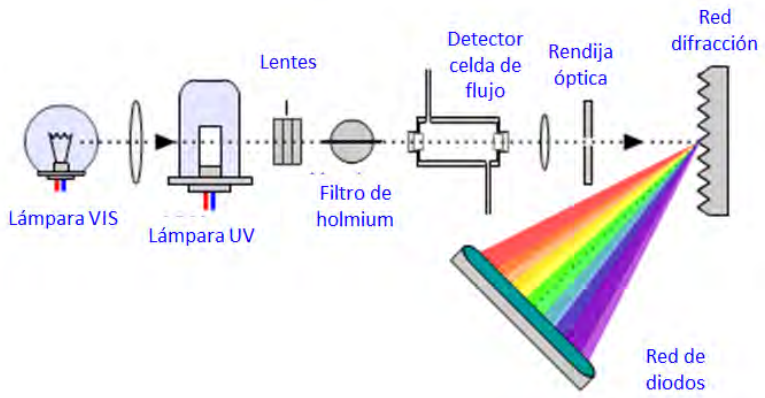


Figura 29: Detector de array de diodos (DAD).

1.8.4. Detector de Espectrometría de Masas (MS/MS).

La espectrometría de masas es una técnica analítica que proporciona información cualitativa y cuantitativa de las moléculas analizadas, previamente convertidas en iones. Los analitos de interés son inicialmente ionizados; estos iones atraviesan el analizador de masas hasta que alcanzan las diferentes partes del detector, de acuerdo con su relación masa/carga (m/z). Para el análisis de los compuestos mediante espectrometría de masas, se llevan a cabo tres pasos: ionización de la muestra, análisis de la muestra ionizada y detección de los iones formados (Figura 30).

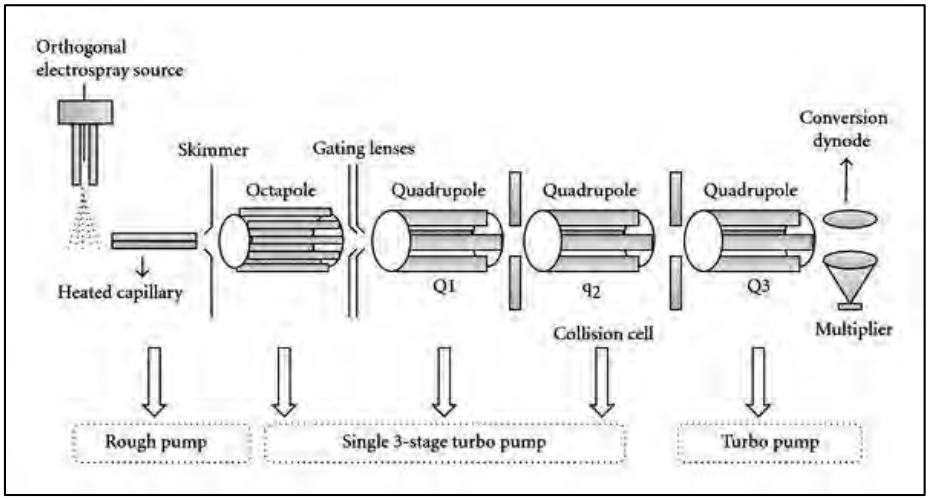


Figura 30: Componentes de un Espectrómetro de Masas. Con permiso de Thermo-Finnigan

Fuente de ionización: Con muestras líquidas, se realiza la ionización por electrospray (ESI). El analito, una vez introducido en la fuente, pasa a través de un tubo capilar de acero inoxidable o cuarzo, al cual se le aplica una diferencia de potencial en presencia de un flujo de gas nitrógeno. Tiene lugar la nebulización de las gotas cargadas en el capilar, provocando la formación de iones.

Analizador de Masas triple cuadrupolo: Este analizador es el más empleado; consiste en dos analizadores de masas (Q1, Q3) separados por una celda de colisión (Q2). En el primer cuadrupolo se selecciona el ión analito de interés por su masa (ión precursor o "parent ion"). En el segundo cuadrupolo este ión se pone en contacto con un gas de colisión (argón) para producir la fragmentación del "parent ion". Los iones formados o iones hijos ("daughter ion") están relacionados con el ión precursor y son escaneados en el tercer cuadrupolo.

Se pueden usar distintas maneras de análisis; el método usado en este trabajo es la Monitorización de Reacción Múltiple (MRM), en la cual los iones precursores con una m/z única pasan a la celda de colisión. Los fragmentos iónicos se generan mediante la colisión con moléculas de nitrógeno. Q3 se configura para una m/z única de fragmento iónico específico. Este método es muy sensible y se utiliza para realizar cuantificaciones. [86-90]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.8.5 Revisión bibliográfica.

La tabla 13 muestra una lista de aplicaciones de la cromatografía líquida en Toxicología clínica y forense.

Tabla 13: Revisión bibliográfica de las técnicas cromatográficas usados para el análisis de drogas en muestras biológicas.

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
Opiáceos/ Orina	Inmunoensayo	High Purity C8 (150 x 3 mm)	A: 4mM acetato amónico pH:6,8, 5% MeOH B: 1% propan-2-ol 0,05% ac. fórmico MeOH Gradiente 0,8 mL/min 35ºC	MS/MS	[91] Fox, 2009
BZD/ Suero	SPE	Unison UK-C18 (150 x 2 mm, 3 µm)	A: 10mM formiato amónico 0,1% ác. fórmico B: 0,1% ác. fórmico MeOH Gradiente 0,25 mL/min 40ºC	MS/MS	[92] Nakamura, 2009
Drogas/ Saliva	SPE	HSS T3 C18 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	A: 2mM acetato amónico pH:6,2 B: MeOH Gradiente 0,4 mL/min 35ºC	MS/MS	[93] Badawi, 2009

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
Morfina/ Sangre	SPE	Synergy Polar (150 x 2 mm)	A: formiato amónico / ac. fórmico pH 2,7 B: ACN/formiato amónico / ac. fórmico pH:3,8 (96:4) 0,6 mL/min	MS/MS	[94] Taylor, 2009.
Opiáceos/ Sangre, orina	LLE	Gemini C18 (100 x 2 mm, 3 µm)	A: ACN B: Ácido fórmico C: Acetato amónico Gradiente 0,15 mL/min 35ºC	MS/MS	[95] Gergov, 2009.
Coca y metabolites/ Orina	SPE	XDB C8 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm)	A: formiato amónico pH:2,7 B: MeOH: ACN (50:50) Gradiente 0,27 mL/min 38ºC	MS/MS	[96] Langman, 2009
MOR, COD, 6-MAM, BEG/ Orina	SPE	Zorbax XDB-C18 (4,6 x 50 mm, 1,8 µm) Zorbax XDB-C18 (4,6 x 50 mm, 3,5 µm)	A: 5mM formiato amónico B: 0,1% ac. fórmico Gradiente 0,8 mL/min 50ºC A: ACN B: 0,1% ac. fórmico Gradiente 0,6 mL/min 35ºC	MS/MS	[97] Stout, 2009

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
BZD/ Plasma	SPE	Xbridge Shield (100mm × 2,1mm, 3,5 µm)	A: 20mM acetato pH:5 B: ACN (67:33) 0,2 mL/min	MS/MS	[98] Marchi, 2009
Opi, coca, BEG/ Orina	SPE	BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	A: Bicarbonato amónico pH:10,2 B: MeOH Gradiente 0,4 mL/min 60ºC	MS/MS	[99] Berg, 2009
BZD, Z-drugs/ Plasma	SPE	Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	A: 0,05% ac. fórmico / H_2O B: 0,05% ac. fórmico / ACN Gradiente 0,4 mL/min	MS	[100] Ishida, 2009
BZD/ Orina	DLLME	Shield RP18 (50 x 2,1 mm, 3,5 µm)	A: ACN B: H_2O (20:80) 0,2 mL/min	ESI-MS	[46] Melwanki, 2009
BZD/ Plasma	SPE	Supelcosil® LC-18DB (250 × 4,6mm, 5 µm)	A: 5mM KH_2PO_4 pH:6 B: MeOH C: Dietil éter (55:40:5) 0,8 mL/min 35ºC	UV	[101] Bastos Borges, 2009

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
Diazepam/ Plasma, cerebro	SPE	Zorbax Eclipse C18 (150 × 4,6mm, 5 µm)	A: ACN B: 30mM tampón fosfato pH:2,5 / 0,3% trietilamina (38:62) 1 mL/min	UV	[102] Mercolini, 2009
Drogas de abuso/ Sangre	SPE	Varian Pursuit 3 C18 (100 x 3 mm, 3 µm)	A: MeOH B: formiato amónico Gradiente 0,3 mL/min 35ºC	MS/MS	[103] Bjørk, 2010
BZD/ Plasma	MAE	Xterra® RP8 (250 × 4,6 mm, 5 µm)	A: ACN B: 20mM tampón fosfato pH 7,5 Gradiente 0,8 mL/min	DAD	[104] Fernández, 2010
Drogas/ Saliva	Precipitación de proteínas	Synergi Polar RP80A (75 × 2 mm, 4 µm)	A: 0,1% ac. fórmico / H_2O B: 0,1% ac. fórmico / ACN Gradiente 0,2 mL/min	MS/MS	[105] Concheiro, 2010
BZD/ Plasma	SPE	Xterra® RP8 (250 × 4,6 mm, 5 µm)	A: ACN B: 20mM tampón fosfato pH 7,5 Gradiente 0,8 mL/min	DAD	[106] Fernández, 2010

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
Drogas de abuso/ Orina	SPE	XDB C18 (50 × 4,6 mm, 1,8 µm)	A: 0,5% ac. fórmico B: ACN Gradiente 0,9 mL/min 55ºC	MS/MS	[107] Chiuminatto, 2010.
Drogas de abuso/ Saliva	MSPE	Gemini C18 (10 × 2,1 mm, 3 µm)	A: 5mM ac. fórmico / ACN B: 5mM ac. fórmico / H_2O Gradiente 0,2 mL/min	MS/MS	[108] Sergi, 2010
BZD/ Sangre	LLE	BEH C18 (100 × 2,1 mm, 1,7 µm)	A: 0,1% amonio / H_2O B: 0,1% amonio / MeOH Gradiente 0,4 mL/min 65ºC	MS/MS	[109] Simonsen, 2010
Drogas / Saliva	Dilución	HSS T3 (100 × 2,1 mm, 1,8 µm)	A: ACN B: 10mM acetato amónico / H_2O pH: 6,25 Gradiente 0,5 mL/min 40ºC	MS/MS	[110] Wang, 2010
BZD, Zdrugs/ Plasma	LLE	TF Hypersil GOLD Phenyl (100 × 2,1 mm, 1,9 µm).	A: 10mM amonio / 0,1% ac. fórmico pH: 3,4 B: 0,1% ac. fórmico / ACN Gradiente 0,5 mL/min	MS/MS	[111] Remane, 2011

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
Drogas/ HV	MAE	Xterra® RP8 (250 × 4,6mm, 5 µm)	A: ACN B: 20mM tampón fosfato pH:6,53 0,8 mL/min	DAD	[112] Fernández, 2011
Drogas/ Orina, plasma	µ-SPE	Kinetex C18 (150 x 2,1 mm, 2,1 µm)	A: MeOH / 10% ACN B: 5mM ac. fórmico / H_2O Gradiente 0,2 mL/min	MS/MS	[113] Napoletano, 2011
MDPV/ Suero	SPE	Phenyl hexyl (50 × 3mm, 3 µm)	A: MeOH B: 10mM acetato amónico / 0,1% fórmico Gradiente 0,5 mL/min 40ºC	MS/MS	[114] Kriikku, 2011
BZD, ATD/ Saliva	SPE	Kromasil (250 x 4 mm, 5 µm)	A: 50mM CH_3COONH_4 B: ACN C: MeOH Gradiente 1 mL/min	UV	[115] Uddin, 2011
BZD/ Orina	Precipitación de proteínas	BEH C18 (50 × 2,1 mm, 1,7 µm)	A: 0,2% ac. fórmico / MeOH B: 0,2% ac. fórmico / H_2O Gradiente 0,4 mL/min 40ºC	MS/MS	[116] Ming, 2011

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
Drogas/ Orina	Dilución	Thermo AQUASIL C18 (100 × 2,1 mm, 5 µm)	A: 10mM acetato amónico / H_2O B: 10mM acetato amónico / ACN: MeOH (1:1) Gradiente 0,27 mL/min	MS/MS	[117] De Jager, 2011
Catinonas/ Sangre	LLE	Prodigy Phenyl-3 (150 x 2 mm, 5 µm)	A: 0,1% ac. fórmico / H_2O B: 0,1% ac. fórmico / MeOH Gradiente 0,2 mL/min, 40ºC	ESI-MS/MS	[118] Sorensen, 2011
Opiáceos/ Orina	DLLME	H5-ODS C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: 10mM fosfato sódico monobásico / 0,7mM dodecil sulfato sódico B: ACN (55:45) pH 6,65 1mL/min	UV	[49] Shamsipur, 2011
BZD/ Orina	LLE	Eclipse XDB C18 (50 x 4.6 mm, 1,8 µm)	A: H_2O B: MeOH Gradiente 1mL/min	MS/MS	[119] Salomone, 2011
BZD/ Orina	LLE	Agilent R C18 (150 x 2,1 mm, 3 µm)	A: 2mM acetato amónico B: ACN Gradiente 0,2mL/min	HRMS	[120] Magalhaes, 2012

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
Coca, opiáceos/ Saliva	SPE	Allure PFP Propyl (50 x 2,1 mm, 5 µm)	A: 0,1% ac. fórmico 2mM / acetato amónico 2% ACN / H_2O B: 0,1% ac. fórmico 2mM / acetato amónico 10% ACN / H_2O. Gradiente.	MS-MS	[121] Cone, 2012
Drogas/ Sangre	SPE	ACQUITY BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	A: 0,1% ac. fórmico B: ACN Gradiente 0,6 mL/min 35ºC	TOF-MS	[122] Dupont Birkler, 2012
Drogas/ Saliva	LLE	Luna C18 (150 x 2 mm, 5 µm)	A: 5mM formiato amónico B: 5mM formiato amónico / MeOH 20%ACN Gradiente 0,2 mL/min 40ºC	MS/MS	[123] Zancanaro, 2012
BZD/ Suero	Dilución	Kromosil C8 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	130mM SDS 2,4% pentanol / 1mM tampón fosfato / 0,1% trietilamina pH:7 1 mL/min 25ºC	UV	[124] Hoonka, 2012

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
BZD/ Plasma	SPME	Shield RP18 (50 x 2,1 mm, 5 µm)	A: 0,1% ac. acético ACN/H_2O (10:90) B: 0,1% ac. acético ACN/H_2O (90:10) Gradiente 0,5 mL/min	MS/MS	[125] Mirnaghi, 2012
BZD/ Orina, sangre	SPE	Acquity C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	A: 10mM bicarbonato amónico pH:9 B: MeOH Gradiente 0,5 mL/min 40ºC	MS/MS	[126] Verplaetse, 2012
Diacepam/ Orina	SPE	Xterra® MS C18 (150 x 2,1 mm, 3,5 µm)	A: 2mM formiato amónico / 0,05% ac. fórmico B: 2mM formiato amónico / 0,05% ac. fórmico / ACN Gradiente 0,2 mL/min 45ºC	MS/MS	[127] Wang, 2012
BZD/ Sangre	SSLLE	ACQUITY BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	A: ACN B: 5mM acetato amónico pH:5 Gradiente 0,6 mL/min 65ºC	MS/MS	[128] Sauve, 2012
BZD/ Orina	Inyección directa	Xterra® MS C8 (250 x 2,1 mm, 5 µm)	A: 0,05% ac. fórmico B: ACN Gradiente de flujo	MS	[129] Karampela, 2012

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
BZD/ Orina	DLLME	ODS2 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: H_2O B: ACN (55:45) 1 mL/min	UV	[52] Vardini, 2012
Metadona/ Orina, plasma, saliva.	DLLME	C18 (250 x 4,6 mm, 10 µm)	A: 0,1% TFA / MeOH B: H_2O (60:40)	UV	[53] Ranjbari, 2012
BZD / Plasma	CPE	Nucleosil C8 (125 × 4,6mm, 5 µm)	A: 2mM ac. ortofosfórico B: ACN Gradiente 1 mL/min	DAD	[130] Madej, 2013
Drogas/ Orina	Incubación	Thermo Fisher Hypersil Gold (50 x 2,1 mm, 5 µm)	A: 0,1% ac. fórmico 10mM / bicarbonato pH:9 B: 0,1% ac. fórmico / ACN / 10mM acetato amónico pH:6 Gradiente de flujo	MS/MS	[131] Schaefer, 2013
Drogas de diseño/ Suero	SPE	Eclipse Plus C18 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm)	A: 2mM formiato amónico / 0,1% ac. fórmico / H_2O B: 0,1% ac. fórmico / ACN: H_2O (90:10) Gradiente 0,5 mL/min 40ºC	MS/MS	[132] Swortwood, 2013

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
Drogas/ Sangre	SPE	Acquity CSH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	A: 0,1% amoniaco (25%) / H_2O B: 0,1% amoniaco (25%) / MeOH Gradiente 0,4 mL/min 50ºC	MS/MS	[133] Bjørk, 2013
Catinonas/ Orina	SPE	Accucore C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 µm)	A: 0,1% ac. fórmico / H_2O B: 0,1% ac. fórmico / ACN Gradiente 0,4 mL/min 35ºC	MS/MS	[134] Concheiro, 2013
BZD/ Plasma	DLLME	XbridgeTM Shield RP18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) ACQUITY BEH Shield RP18 (100 x 2,1mm, 1,7 µm) ACQUITY BEH C18 (100 x 2,1mm, 1,7 µm)	A: ACN B: 1 mM tampón fosfato pH 6 Gradiente 0,8 mL/min Tª ambiente 0,4 mL/min 40ºC, 0,3 mL/min 30ºC	PDA	[54] Fernández, 2013
Drogas/ Sangre	QuEChERS	ODS (50 x 1,5 mm, 5 µm)	A: 10mM acetato amónico / MeOH (95/5) B: 10mM acetato amónico / MeOH (5/95) Gradiente 0,2 mL/min	MS	[135] Matsuta, 2013

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
Drogas/ Sangre, orina	SPE	Eclipse Plus C18 (100 x 3 mm, 1,8 µm)	A: MeOH B: 5mM formiato amónico 0,6 mL/min 50ºC	TOF-MS	[136] Guale, 2013
Catinonas/ Saliva	SPE	Acquity BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	A: 0,1% ac. fórmico H_2O/ACN (5/95) B: 0,1% ac. fórmico ACN Gradiente	MS/MS	[137] Amaratunga, 2013
Drogas/ HV	SPE	Xterra RP18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: ACN B: 20mM tampón fosfato pH: 6,5 Gradiente 0,8 mL/min	PDA	[138] Fernández, 2013
Catinonas/ Orina	SPE	Kinetex PFP (100 x 3 mm, 2,6 µm)	A: ACN B: 50mM Trifluoroacetato amónico (33:67) 0,35 mL/min	DAD	[139] Mayer, 2013
Drogas/ Saliva	Incubación	C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	A: 5mM ac. fórmico / H_2O B: 5mM ac. fórmico / ACN Gradiente 0,6 mL/min 50ºC	MS/MS	[149] Di Corcia, 2013

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
Drogas/ Orina	Incubación	Poroshell 120EC-C18 (100 × 2,1 mm, 2,7 µm)	A: 0,1% ac. fórmico / H_2O B: 0,1% ac. fórmico / MeOH Gradiente 0,32 mL/min 40ºC	MS/MS	[139] Lin, 2013
Opiáceos/ Plasma	DLLME	H5-ODSC18 (25cm × 4,6mm, 5 µm)	A: 60% 10mM fosfato sódico / 0,70mM dodecilsulfato sódico B: 40% ACN	UV	[56] Ahmadi-Jouibari, 2013
BZD y zolpidem/ Saliva	LLE	Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	A: 2mM formiato amónico / 0,2% ac. fórmico / H_2O B: 2mM formiato amónico-0,2% ac. fórmico / ACN Gradiente 1 mL/min 40ºC	MS/MS	[142] Jang, 2013
Opiáceos, coca y metabolitos/ Sangre	SPE	Acquity BEH Phenyl (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	A: 0,1% ac. fórmico / H_2O B: 0,1% ac. fórmico / MeOH Gradiente 1 mL/min 35ºC	MS/MS	[143] Ramírez Fernández, 2013
BZD y Z-drugs/ Sangre, suero, plasma	LLE	SunFire C18 (150 x 2,1 mm, 3,5 µm)	A: 10mM formiato amónico / 0,1% ac. fórmico B: 0,1% ac. fórmico / ACN Gradiente 0,5 mL/min 30ºC	MS/MS	[144] Montenarh, 2014

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
MDPV/ Plasma	Incubación / Precipitación de proteínas	Synergy Polar RP (100 x 2 mm, 2,5 µm)	A: 0,1% ac. fórmico / H_2O B: 0,1% ac. fórmico / ACN Gradiente 0,4 mL/min 40ºC	MS	[145] Anizan, 2014
BZD/ Orina,	D-µSPE	ODS-H C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: 5mM Dihidrógeno fosfato potásico pH:6 B: MeOH (38:62) 1mL/min	UV	[146] Asgharinezhad, 2014
BZD/ Orina	DLLME	Shield RP18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	A: 1mM tampón fosfato pH6 B: ACN Gradiente 0,4 mL/min 30ºC	PDA	[66] Fernández, 2014
Opiáceos/ Orina	Dilución	Acquity HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	A: 0,1% ac. fórmico B: MeOH Gradiente 0,2 mL/min 60ºC	MS/MS	[147] Anderson, 2014
Drogas, BZD/ Sangre	QuEChERS	Kinetex C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 µm) Aeris PEPTIDE XB-C18 (150 x 2,1 mm, 3,6 µm)	A: 0,1% ac. fórmico / H_2O B: ACN/MeOH (1/1) Gradiente 0,4 mL/min A: H_2O B: 0,1% ac. fórmico / MeOH Gradiente 0,3 mL/min	MS/MS	[148] Anzillotti, 2014

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
MDPV, BZD/ Orina, Sangre	LLE (BZD) SPE (MDPV)	Atlantis T3 (150 x 2,1 mm)	A: 10mM formiato amónico / 0,1% ac. fórmico B: 0,1% ac. fórmico / ACN Gradiente 0,3 mL/min	HRMS	[149] Bertol, 2014
Drogas/ Sangre	SPE	Luna SCX (150 x 2 mm, 5 µm)	A: 100mM formiato amónico / 0,1% ac. fórmico B: 0,1% ac. acético / ACN Gradiente 0,5 mL/min	MS/MS	[150] Steuer, 2014
Catinonas/ Saliva	SPE	Atlantis T3 (50 x 2,1 mm, 3 µm)	A: 0,1% ac. fórmico B: ACN Gradiente 0,3 mL/min 35ºC	MS/MS	[151] De Castro, 2014
Drogas/Orina	Dilución	Acquity HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	A: 0,1% ac. fórmico B: ACN Gradiente 0,6 mL/min 50ºC	MS/MS	[152] Hegstad, 2014
BZD/ Orina, suero	SPDE	Poroshell 120 EC-C18 (100 x 4,6 mm, 2,7 µm)	A:10mM formiato amónico pH:3 B: ACN (70:30) 0,5 mL/min 40ºC	TOF-MS	[153] Saito, 2014

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
BZD/ Sangre	DBS cards	Kinetex RP C18 (50 x 3 mm, 2,6 µm)	A: 2mM formiato amónico 0,2% ac. fórmico H_2O B: 2mM formiato amónico 0,2% ac. fórmico ACN Gradiente 0,4 mL/min 40ºC	MS/MS	[154] Lee, 2015
BZD, zolpidem/ Orina	Inyección directa	Zorbax SB-C18 (100 x 2,1 mm, 3,5 µm)	A: 0,2% ac. acético / 2mM trifluoro acetato amónico H_2O B: 0,2% ac. acético / 2mM trifluoro acetato amónico ACN Gradiente 0,25 mL/min	MS/MS	[155] Jeong, 2015.
Drogas/ Plasma	DLLME	Xbridge RP18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: 50mM tampón fosfato pH 6,5 B: ACN Gradiente 0,8 mL/min	PDA	[63] Fernández, 2015
Opiáceos, BZD/ Orina	SPE	Xterra MS C18 (150 x 2,1 mm, 3,5 µm)	A: 0,05% ac. fórmico / H_2O B: ACN C: MeOH Gradiente 0,2 mL/min 40ºC	MS/MS	[156] Xiong, 2015

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
NPS/ Orina	SPE	Accucore C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 µm)	A: 0,1% ac. fórmico / H_2O B: 0,1% ac. fórmico / ACN Gradiente 0,4 mL/min 35ºC	HRMS	[157] Concheiro, 2015
NPS/ Sangre	DLLME	Kinetex C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 µm)	A: 5mM formiato amónico / 0,1% ac. fórmico. B: 0,1% ac. fórmico / MeOH Gradiente 0,4 mL/min 40ºC	MS/MS	[67] Odoardi, 2015
BZD/ Suero, sangre	MAE	Hypersil Gold C18 (50 x 2,1 mm, 1,9 µm)	A: 0,1% ac. fórmico / ACN B: 1mM formiato amónico pH: 3,4, / 0,1% ac. fórmico Gradiente 0,4 mL/min 25ºC	TOF-MS	[158] Wózniakiewicz, 2015
Drogas, BZD/ Sangre	DLLME	Kinetex Biphenol (100 x 2,1 mm, 2,6 µm)	A: 0,1% ac. fórmico / H_2O B: 0,1% ac. fórmico / MeOH 0,4 mL/min	MS/MS	[64] Fisichella, 2015
Drogas/ Plasma	MEPS	Xselect CSH C18 (100 x 2,1 mm, 2,5 µm)	A: 5mM acetato amónico B: ACN Gradiente 0,3 mL/min 40ºC	MS/MS	[82] De Souza, 2015

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
Opiáceos, coca/ Sangre	QuEChERS	Pinacle DB PFPP (50 x 2,1 mm, 1,9 µm)	A: 5mM formiato amónico / 0,1% ac. fórmico B: ACN Gradiente 0,47 mL/min 50ºC	MS/MS	[159] Dulaurent, 2016
BZD/ Orina, plasma	DNUM	Zorbax SB-C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	A: ACN B: 5mM KH_2PO_4 pH:6 (70:30) 1 mL/min	UV	[160] Pebdani, 2016
Catinonas/ Orina, sangre	SPE	Poroshell 120 EC-C18 (5 x 2,1 mm, 2,7 µm)	A: 0,1% ac. fórmico / H_2O B: ACN Gradiente 0,4 mL/min 35ºC	QTOF-MS	[161] Glicksberg, 2016
Catinona/ Orina, plasma, saliva	VAMS	Zorbax C18 (50 x 2,1 mm, 3,5 µm)	A: 0,1% ac. fórmico / ACN B: 0,1% ac. fórmico /H_2O Gradiente 0,3 mL/min	MS/MS	[162] Mercolini, 2016
BZD, NPS/ Orina	LLE	ACE5 C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm)	A: 0,1% ac. fórmico /5% ACN B: 0,1% ac.fórmico / 95%ACN Gradiente 0,5 mL/min	MS/MS	[163] Lee, 2016
BZD/ Plasma	SPE	Sumipax ODS D-Swifer (30 × 3 mm, 2 µm)	A: 10mM acetato amónico pH: 6,76 B: ACN Gradiente 0,7 mL/min 40ºC	MS/MS	[164] Lee, 2016

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
ATD, BZD/ Suero, orina	DLLME	C18 (150 x 4,5 mm, 5 µm)	A: ACN B: 60mM tampón fosfato pH: 5,5 (1:1) 1 mL/min	UV-VWD	[69] Farsimadan, 2016
BZD/ Suero	LLE	RP -18 (70 x 4,6 mm, 5 µm)	A: formiato amónico pH:8,6 B: ACN Gradiente 1 mL/min 25ºC	DAD	[165] Vosough, 2016
Catinonas/ Saliva	SPE	Kinetex C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	A: 0,1% ac. fórmico / H_2O B: 0,1% ac. fórmico / ACN Gradiente 0,4 mL/min 35ºC	MS/MS	[166] Miller, 2017
BZD, Z-drugs/ Sangre	DLLME	Kinetex® Biphenol (100 x 2,1 mm, 2,6 µm)	A: tampón pH 8 B: MeOH Gradiente 0,5 mL/min 45ºC	MS/MS	[70] De Boeck, 2017
Drogas/ Plasma	MEPS	BEH Shield RP18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	A: ACN B: 0,1% ac. fórmico / H_2O Gradiente 0,4 mL/min 55ºC	PDA	[83] Fernández, 2017

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
BZD/ Orina	Hidrólisis, Incubación	Shim-pack XRODS (50 x 3 mm, 2,2 µm)	A: 2mM formiato amónico / 0,1% ac. fórmico H_2O B: 2mM formiato amónico / 0,1% ac. fórmico 1% isopropil ACN Gradiente 0,8 mL/min 40ºC	MS/MS	[167] Dunlop, 2017
Cocaína/ Sangre	SPE	Atlantis T3 100A (150 x 2,1 mm, 3 µm)	A: 0,1% ac. fórmico / H_2O B: fase A / ACN (10:90) Gradiente 0,2 mL/min	MS-MS	[168] Chen, 2017
Cocaína/ Fluido oral, plasma, orina	-Dilución (FO) -Precipitación de proteínas (plasma, orina)	Kinetex HILIC (150 x 4,6 mm, 2,6 µm)	A: ACN B: 13mM formiato amónico pH: 6 C: MeOH (55:35:10) 0,8 mL/min 30ºC	MS	[169] Fiorentin, 2017
NPS/ Sangre	µ-SPE	Kinetex C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 µm)	A: 5mM ac. fórmico / ACN B: 5mM ac. fórmico / H_2O Gradiente 0,3 mL/min	MS-MS	[170] Montesano, 2017
NPS/ Saliva	MEPS	BEH Shield RP18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	A: 0,1% ac. fórmico / H_2O B: 0,1% ac. fórmico / ACN 0,4 mL/min	MS-MS	[85] Ares, 2017

Droga /Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil	Detector	Referencia
Opiáceos/ Plasma	LLE	Phenyl-hexyl (100 x 2,1 mm, 2,6 µm)	A: 2mM formiato amónico pH: 3,4 0,1% ac. fórmico B: MeOH: ACN (50:50) 0,1% ac. fórmico Gradiente 0,5 mL/min	HRMS	[171] Caspar, 2018

1.9. DISEÑOS EXPERIMENTALES.

1.9.1. Introducción.

Un papel importante del diseño experimental en la química analítica aplicada al campo industrial, alimentario, medioambiental o toxicológico se refiere a las optimizaciones del método, donde el objetivo principal es descubrir las condiciones experimentales que producen el mejor rendimiento analítico posible. [172] Se pueden considerar dos etapas en la optimización del método:

(1) un paso de selección, donde se estudian muchos factores para identificar aquellos con los efectos significativos en las variables críticas

(2) la optimización, donde los factores se examinan más a fondo para determinar las mejores condiciones analíticas.

En el procedimiento clásico (one varied at a time, OVAT) se varía un factor mientras que los otros factores permanecen constantes y no tiene en cuenta las interacciones entre los factores. Además, el número de experimentos es importante cuando el número de factores aumenta, y generalmente el dominio experimental explorado es más pequeño que el examinado con el enfoque multivariado. [173]

El diseño de experimentos consiste en una estrategia multivariable, donde varios factores se estudian simultáneamente en un número predefinido de experimentos, variando los niveles de todos los factores involucrados en el proceso [174]. De este modo se reduce el número de experimentos a realizar, lo que se traduce en un ahorro de tiempo y dinero.

Los aspectos a considerar son los siguientes [175, 176]:

a) Enfoque del problema. El objetivo del estudio debe estar claramente identificado y especificado, así como el tiempo y el costo de la experimentación debe evaluarse.

b) Selección de las variables de respuesta. Una o varias variables que pueden proporcionar la información necesaria en la evaluación del

rendimiento analítico del método son seleccionadas para someterse al procedimiento de optimización.

c) Selección de factores y sus niveles. Todos los factores que pueden afectar el proceso deben ser cuidadosamente detectados y examinados. El dominio experimental debe estar definido para cada factor y también se debe establecer una forma de control y medición. Los factores se pueden dividir en cuantitativos, cualitativos y relacionados con la mezcla.

d) Selección de un diseño experimental. Se debe prestar atención a los temas que se considerarán para la selección del mejor diseño experimental para cada etapa como: el objetivo establecido (tipo de problema e información conocida); el número de factores e interacciones que deben estudiarse; la validez estadística y efectividad de cada diseño; las restricciones de operación, coste y tiempo; y la facilidad de comprensión y complejidad de la implementación de cada diseño.

e) Realización de los experimentos y determinación de las respuestas. Se recomienda tener en cuenta que, en análisis multivariado [173]:

- las observaciones y los errores deben ser variables aleatorias independientes

- cuando el número de experimentos es mayor que los que se puede hacer en un día o en una secuencia de trabajo, los experimentos deben realizarse en bloques (cada bloque corresponde a un día o secuencia de trabajo diferente, y es necesario tener en cuenta el efecto de bloqueo)

- es necesario aplicar cálculos estadísticos para estimar los efectos de los factores en una respuesta. Una estimación siempre está sujeta a error, y es importante que los errores del operador sean pequeños o despreciables, y para evitar que influyan de forma significativa en la respuesta. En algunas situaciones, el error aleatorio se determina como precisión del procedimiento analítico. Habitualmente se determina replicando los puntos centrales y/u otros puntos del diseño, y estimar la varianza. Además, los efectos observados para las interacciones de

tres o más factores a menudo se consideran despreciables. Debido a que los valores de los factores se modifican de manera sistemática, es importante que el orden de los experimentos sea aleatorio. Esto niega cualquier efecto sistemático falso que se manifestaría con el orden no aleatorio en el tiempo de los experimentos y asegura que las estimaciones de la varianza de la repetibilidad reflejen adecuadamente los aspectos aleatorios del proceso. [177]

1.9.2. Diseños de screening o cribado.

Los diseños factorial completo, factorial fraccional y Plackett-Burman, todos ellos con dos niveles para cada factor (k), son los más utilizados en el paso de la selección de factores porque son económicos y eficientes. [178] Cuando el número de niveles de los factores considerados es mayor de 2, el número de experimentos a realizar aumenta considerablemente, aunque existen diseños simétricos que se construyen con factores que tienen el mismo número de niveles pero implica una reducción en el número de experimentos a realizar. Estos diseños simétricos sirven de base a numerosos diseños asimétricos, obtenidos con diferentes algoritmos, que permiten estudiar varios factores con diferentes niveles y en un número razonable de experimentos. [176, 179]

Una vez definido el diseño como una matriz matemática de experiencias se transforma en el plan de experimentación, una traducción al mundo real de las condiciones experimentales definidas por los valores adimensionales de las variables consideradas. A continuación, se realizan las experiencias y se obtiene la matriz de respuestas.

La respuesta obtenida se suele ajustar a un modelo polinómico de primer grado:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + ... + \beta_n X_n + \beta_{11} X_{12} + ... + \beta_{1n} X_1 X_n + ... + \beta_{n1} X_n X_1$$

En esta ecuación, Y es la respuesta, y Xn son los diferentes factores de los que depende la respuesta. Los coeficientes β tienen el siguiente significado:

β_0 es el término constante.

β_n es el efecto lineal o principal del factor n.

β_{1n} es el efecto de la interacción de dos factores.

Los experimentos realizados conducen a la evaluación de los coeficientes del modelo, de modo que se puede determinar la importancia que tiene cada factor, así como las posibles interacciones entre distintos factores.

1.9.3. Diseños de optimización.

Se entiende por optimización del proceso, la búsqueda y localización del conjunto de valores de las variables independientes que producen el mejor resultado posible en un proceso de determinación analítica o, en su caso, un proceso de producción. Estos diseños permiten modelar una superficie de respuesta con modelos polinómicos de segundo orden. Los diseños más utilizados son los diseños factoriales completos en tres niveles, central compuesto, diseño Box–Behnken, D-óptimo y Doehlert. [173, 176]

Para llevar a cabo la optimización mediante un diseño experimental, se pueden considerar algunos de los siguientes aspectos, dependiendo de la información disponible y la requerida. [177]

- *Experiencias preliminares:* Al realizar experiencias preliminares, se obtiene información sobre el trabajo experimental para facilitar el trabajo posterior.
- *Screening de factores:* Consiste en la determinación de los factores que afectan al sistema.
- *Estudio cuantitativo de factores:* Una vez que se conocen los factores influyentes, se estudian para obtener mayor información, como por ejemplo la interacción entre ellos y el peso de cada uno.
- *Optimización de respuestas:* Se trata del estudio de las respuestas experimentales, con el fin de predecir en cualquier punto del campo experimental de interés el valor de la respuesta, sin necesidad de efectuar la experiencia.

  El objetivo fundamental es encontrar las condiciones que proporcionan la mejor respuesta.

El diseño central compuesto está formado por puntos de diseño factorial o factorial fraccional de dos niveles (–1 y +1), puntos axiales o de "estrella" y puntos centrales con todos los factores establecidos en 0. Los factores axiales se establecen en 0, excepto un factor con el valor ± α. En función de la ubicación de puntos α, el espacio del diseño puede ser cúbico o esférico. Para construir el modelo matemático con una estimación eficiente se requiere un polinomio de segundo grado que incluye los términos cuadráticos para cada factor, según la siguiente ecuación:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^{n} b_i x_i + \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{n} b_{ij} x_i x_j$$

donde x_i es el valor codificado de los factores estudiados e y es la función de respuesta obtenida para cada analito. Los valores b son los coeficientes del polinomio estimado: b_0 es la ordenada en el origen, b_i representan el efecto principal de cada variable, los coeficientes b_{ij} en los términos cuadráticos son responsables de los efectos de curvatura, y b_{ij} ($i \neq j$) son los coeficientes que describen los efectos de interacción entre factores. Los valores de respuesta obtenidos se utilizaron para estimar los valores de los coeficientes del modelo, a través de una regresión lineal múltiple mediante el método de mínimos cuadrados. La validación del modelo se lleva a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA). [176, 180]

El diseño de Doehlert ofrece una distribución uniforme de puntos en el espacio esférico de respuesta experimental, en el centro y en la superficie. La distribución de puntos describe una figura geométrica (en el caso de dos variables se produce un hexágono) en la que se asignan cinco niveles a la primera variable y tres a la segunda variable. El número de determinaciones experimentales (N) se calcula a partir de la expresión $N = k^2 + k + 1$, donde k es el número de factores estudiados. La principal ventaja de este diseño con respecto a otros métodos de amplia aplicación como el diseño central compuesto es la posibilidad de estudiar factores con diferentes niveles. [176] El modelo matemático es similar al descrito anteriormente para un diseño central compuesto.

1.10. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS.

La validación de los métodos analíticos es necesaria para demostrar que el análisis cuantitativo de los analitos es fiable dentro de unos márgenes de error determinados. Para asegurar la fiabilidad de un método y así realizar su validación se deben determinar parámetros tales como: linealidad, sensibilidad, selectividad, límites de detección y cuantificación, precisión y recuperación. [181-186]

1.10.1. Linealidad y Efecto Matriz.

La linealidad es la capacidad del método para obtener respuestas lineales proporcionales a la concentración del analito. El modelo de calibración debe prepararse para cada analito en la misma matriz que las muestras de estudio mediante la adición de cantidades conocidas a la matriz de muestra blanco. El número de estándares usado para la preparación de la curva de calibrado viene determinado por los valores del rango analítico y la naturaleza de la relación analito/respuesta. La curva de calibración deberá contener una muestra blanco (matriz procesada sin analitos y sin estándar interno), una muestra cero (matriz procesada con estándar interno) y entre seis y ocho muestras de adición que cubran todo el rango e incluyan el LLOQ. Cada nivel de calibración debe hacerse por triplicado.

El efecto matriz (EM) se define como el efecto que tienen otros componentes de la matriz, diferentes al analito, sobre la cuantificación del analito: supresión o aumento de la señal instrumental, elevada línea de base, impacto en la retención, etc. Para la determinación del efecto matriz existen varias posibilidades [186]:

$$\%EM = \frac{Señal\ del\ analito\ post\ extracción - Señal\ del\ analito\ FM}{Señal\ del\ analito\ FM} \times 100$$

Los valores del efecto matriz próximos al 0% indican que no hay efecto matriz, y valores superiores al 10% indican que la matriz produce un efecto sobre la señal del analito en la muestra.

$$\%EM = \frac{Señal\ del\ analito\ post\ extracción}{Señal\ del\ analito\ FM} \times 100$$

En este caso, los valores próximos al 100% indican que no hay efecto matriz, valores inferiores al 100% indican la supresión de la señal por los componentes de la muestra, y valores que superan el 100% indican que la matriz produce un aumento de la señal del analito. En ambos casos, la presencia de efecto matriz lleva a realizar la validación de la muestra en la matriz problema. [182-186]

1.10.2. Sensibilidad.

La sensibilidad, al igual que la linealidad, se asocia con la calibración. Se define como el cambio en la respuesta del instrumento dividida entre el correspondiente cambio en el estimulo. La sensibilidad no es un parámetro esencial en la validación del método, sin embargo, es importante en la optimización del método y la monitorización rutinaria del instrumento. La medida de la sensibilidad de cada analito se obtiene de la pendiente de la recta de calibrado, los analitos con mayor pendiente presenta mayor sensibilidad. [186]

1.10.3. Selectividad.

Es la habilidad del método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en presencia de otros componentes de la muestra. Para determinar la selectividad se deben analizar individualmente al menos seis muestras de la matriz blanco apropiada, para poder determinar las interferencias.

Las sustancias potencialmente interferentes en la matriz biológica incluyen componentes endógenos de la matriz, metabolitos, productos de descomposición y contaminación por otros medicamentos. [182-186]

1.10.4. Límites de Detección y Cuantificación.

El *límite de detección* (LOD) se corresponde con la menor concentración de analito que se puede detectar e identificar con el método pero que no es necesaria su cuantificación exacta; también se define como la cantidad mínima de analito que se puede diferenciar de la señal del ruido. Debe determinarse en una matriz igual a la matriz de la muestra. La relación señal/ruido (S/N) se usa para determinar el LOD cuando el método presenta ruido de base. El LOD se determina estableciendo la concentración mínima a la que S/N es superior a 3.

La relación S/N puede variar entre días e incluso dentro de un día, por lo tanto, se deben realizar muchas mediciones para la determinación fiable del LOD.

También se puede calcular el LOD utilizando varias disoluciones con diferentes concentraciones próximas al LOD. El límite de detección es la concentración más baja que puede ser detectada sin error.

El *límite de cuantificación* (LOQ) se corresponde con la menor concentración de analito que se puede determinar con fiabilidad y repetibilidad aceptables. El LOQ se determina estableciendo la concentración mínima a la que S/N es superior a 10. La precisión de los resultados en el LOQ debe ser al menos del 20%. En caso de que el resultado de una medición esté entre el LOD y el LOQ puede informarse que el analito ha sido detectado en la muestra, pero está por debajo del LOQ. [184-186]

1.10.5. Precisión.

La precisión representa la proximidad de los datos obtenidos con respecto al valor real. La precisión se relaciona con el error aleatorio de un sistema de medición. En general, se mencionan dos tipos de precisión: la repetibilidad (evaluada como precisión intradía) y la precisión intermedia (evaluada como precisión interdía). En la actualidad, muchas guías de validación consideran el término reproducibilidad asociado a la precisión interlaboratorios [187].

La *repetibilidad* se obtiene analizando repetidamente en un mismo día, de forma independiente, varias submuestras preparadas a partir de una muestra homogénea en el laboratorio, por un operador, utilizando una configuración experimental y un conjunto de reactivos. Para su medida, cada nivel debe analizarse un mínimo de cinco veces y en un mínimo de tres niveles de concentración que abarquen todo el rango de concentraciones. El valor del coeficiente de variación (%CV) o desviación estándar relativa (%RSD) debe ser inferior al 15% (20% en el LOQ) para que el método pueda considerarse preciso.

La *precisión intermedia* se obtiene analizando repetidamente en varios días, de forma independiente, submuestras preparadas a partir de una muestra homogénea en el laboratorio, por un operador, utilizando una configuración experimental y un conjunto de reactivos.

Para su medida, cada nivel debe analizarse un mínimo de dos días y en un mínimo de tres niveles de concentración que abarquen todo el rango de concentraciones. El valor del %CV debe ser inferior al 15% (20% en el LOQ) para que el método pueda considerarse preciso. [181, 185]

1.10.6. Recuperación.

La recuperación se refiere a la eficiencia de la extracción en un método analítico, dentro de los límites de la variabilidad. Se puede calcular como el porcentaje de la señal de analito en una disolución, comparada con una disolución estándar con el mismo nivel de concentración. La recuperación debe calcularse como mínimo a tres niveles de concentración que abarquen todo el rango estudiado. Los valores de recuperación deben encontrarse próximos al 100%, considerándose valores aceptables los que se encuentran entre 70 y 120%. [182, 184-187]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.11. BIBLIOGRAFÍA.

[1] Levine B "Principles of forensic toxicology" 4ª ed, AA CC Press, USA, 2013.

[2] Rang HP, Dale MM, Ritter JM "Farmacología" 4ª ed, Ed. Harcourt, 2000.

[3] Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Watts J (Eds), "Clarke´s analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material" 4ª ed, Pharmaceutical Press, London, 2011.

[4] Cabrera Bonet R; Mencías Rodríguez E; Cabrera Forneiro J, "Toxicología de los psicofármacos" Ed. Mosby Year Book, Madrid, 1993.

[5] MacGregor Whyte I, Benzodiazepines In: Dart RG, "Medical Toxicology" 5ªed, Ed. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia (USA), 2004.

[6] Baselt RC (Ed), "disposition of toxic drugs and chemicals in man" 10ª ed, Biomedical Publications, California (USA), 2014.

[7] "Informe mundial sobre las drogas" UNODC Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito, 2016.

[8] Observatorio europeo sobre drogas y toxicomanías "Informe europeo sobre drogas. tendencias y novedades" Luxemburgo: Oficina de publicaciones de la Unión Europea, 2017.

[9] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, AEMPS "Informe de utilización de medicamentos U/HAY/V1/17012014" Ministerio de Sanidad, 2014.

[10] Karch SB "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of abused drugs" CRC Press, Boca Ratón, Florida (USA), 2008.

[11] Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P, "Cocaína: aspectos farmacológicos". Monografía cocaína: adicción, 2001; Vol 13: 23-37.

[12] Davies S, Johnson A, Holt D. "Forensic toxicology drug use and misuse" The Royal Society of Chemistry, Cambridge UK, 2016.

[13] Observatorio Europeo sobre drogas y toxicomanía “Informe europeo sobre drogas. Tendencias y novedades” Luxemburgo: Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, 2019.

[14] Molina, DK. “Handbook of forensic toxicology for medical examiners” Taylor and Francis, USA, 2010.

[15] Rook EJ, Huitema ADR, Van den Brink W, Van Ree JM, Beijnen JH, “Pharmacokinetics and pharmacokinetic variability of heroin and its metabolites: review of the literature” Current Clinical Pharmacology, 2006; 1: 109-118.

[16] Sandilands EA, Baterman N, “Opioids” Medicine, 2016; 44: 187-189.

[17] Steven B, Karch MD, “Drug abuse handbook” CRC Press (USA), 1998.

[18] Baumann MH. A wash in a sea of 'bath salts': implications for biomedical research and public health. Addiction, 2014; 109: 1577-1579.

[19] Valente JM, Guedes de Pinos P, Bastos ML, Carvalho F, Carvalho M. “Khat and synthetic cathinones: a review” Arch. Toxicol. 2014; 88: 15-45.

[20] 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.

[21] Espert Tortajada R, Pérez San Miguel J, Gadea Doménech M, Oltra-Cucarella J, Aliño Costa, M. Drogas emergentes: catinonas sintéticas (“sales de baño”). Revista Española de Drogodependencia 2015; 40(2): 56-71.

[22] “Drogas emergentes. Informe de la comisión clínica” Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Gobierno de España. 2011.

[23] 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.

[24] Renner UD, Oertel R, Kirch W, “Pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical use of scopolamine” Ther. Drug Monit., 2005; 27: 655-665.

[25] Lemaire-Hurtel AS, Alvarez JC, “Drugs involved in drug-facilitated crime-pharmacological aspects” in *Toxicological aspects of drug-facilitated crimes*, 2014.

[26] Prusakov PA, “Belladonna alkaloids” in Encyclopedia of Toxicology 3ª ed., 2014.

[27] Kabir A, Holness H, Furton KG, Almirall JR, “Legal and forensic samples” In Pawliszyn J, Bayona JM (Eds) “Comprehensive sampling and sample preparation”. Elsevier, Academic Press, Oxford, UK, 2012; 441-465.

[28] Repetto M. “Toxicología fundamental” 2ª ed. Ed. Científico Médica, Barcelona, 1988.

[29] Martínez AP, Hernández Jerez AF. “Investigación toxicológica”, en Villanueva Cañadas E, “Medicina legal y toxicología” 6ª ed., Ed. Masson, Barcelona 2004.

[30] Flanagan RA, Taylor A, Watson JD, Whelpton R. “Fundamentals of analytical toxicology” John Wiley & Sons Ltd. England, 2007.

[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] Rezaee M, Assadi Y, Reza Milani Hosseini 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.

[33] Jain R, Singh R. “Applications of dispersive liquid-liquid microextraction in forensic toxicology” Trends Anal. Chem. 2016; 75: 227-237

[34] Rezaee M, Yamini Y, Faraji M. “Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction” J. Chromatogr. A 2010; 1217: 2342-2357

[35] Saraji M, Khalili Boroujent M. “Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction” Anal. Bioanal. Chem. 2014; 406: 2027-2066

[36] Samanidou V, Kovastsi L, Fragou D, Rentifis K. “Novel strategies for sample preparation in forensic toxicology. Review” Bioanal. 2011; 3: 2019-2046.

[37] Cruz Vera M. “Dispersive liquid-liquid microextraction” Meyers RA. “Encyclopedia of analytical chemistry, applications, theory and instrumentation” 1ªed. Ed. Wiley, USA, 2011.

[38] Ocaña-González JA, Fernández-Torres R, Bello-López M, Ramos Payán M. “New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review”. Anal. Chim. Acta 2016; 905: 8-23.

[39] Kokosa JM. “Advances in solvent-microextraction techniques” Trends Anal. Chem. Elsevier, 2013.

[40] Herrera-Herrera AV, Asensio-Ramos M, Hernández-Borgés J, Rodríguez-Delgado MA. “Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes” Trends Anal. Chem. 2010; 29(7): 728-751.

[41] Xu H, Ding Z, Lv L, Song D, Feng YQ. “A novel dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples” Anal. Chim. Acta 2009; 636: 28–33.

[42] Abdel-Rehim M. “Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial” Anal. Chim. Acta 2011; 701: 119-128.

[43] Abdel-Rehim M. “Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis” J. Chromatogr. A 2010; 1217: 2569-2580.

[44] Mahdi Moein M, Abdel-Rehim A, Abdel-Rehim M. “Microextraction by packed sorbent (MEPS)” Trends Anal. Chem. 2015; 67: 34-44.

[45] 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.

[46] Melwanki MB, Chen W-S, Bai H-Y, Lin T-Y, Fuh M-R. “Determination of 7-aminoflunitrazepam in urine by dispersive liquid–liquid microextraction with liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry” Talanta 2009; 78: 618-622.

[47] Xiong C, Ruan J, Cai Y, Tang Y. “Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography” J. Pharm. Biomed. Anal. 2009; 49: 572-578.

[48] Saraji M, Borojeni MK, Akbar A, Bidgoli H. “Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and hollow fiber liquid-liquid microextraction for the determination of fentanyl, alfentanyl, and sufentanyl in water and biological fluids by high-performance liquid chromatography” Anal. Bioanal. Chem. 2011; 400: 2149-2158.

[49] Shamsipur M, Fattahi N. “Extraction and determination of opium alkaloids in urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography” J. Chromatogr. B 2011; 879: 2978-2983.

[50] Ito R, Ushiro M, Takahashi Y, Saito K, Ookubo T, Iwasaki Y, Nakazawa 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.

[51] Tehrani MS, Givianrad HM, Mahoor N; "Surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for determination of amphetamine and methamphetamine in urine samples" Anal. Methods 2012; 4: 1357-1364.

[52] Vardini TM, Mshayekhi H, Saber-Tehari M. "Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for the determination of alprazolam, oxazepam, and diazepam in human urine samples" J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol. 2012; 35: 988-999.

[53] Ranjbari E, Golbabanezhad-Azizi A-A, Reza Hadjmohammadi M. "Preconcentration of trace amounts of methadone in human urine, plasma, saliva and sweat samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography" Talanta 2012; 94: 116-122.

[54] Fernández P, González C, Pena MT, Carro AM, Lorenzo RA. "A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the determination of seven benzodiazepines in human plasma" Anal. Chim. Acta 2013; 767: 88-96.

[55] Kohler L, Schappler J, Sierro T, Rudaz S. "Dispersive liquid-liquid microextraction combined with capillary electrophoresis and time-of flight mass spectrometry for urine analysis" J. Pharm. Biomed. Anal. 2013; 73: 82-89.

[56] Ahmadi-Jouibari T, Fattahi N, Shamsipur M, Pirsaheb M. "Dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography–ultraviolet detection to determination of opium alkaloids in human plasma" J. Pharm. Biomed. Anal. 2013; 85: 14-20.

[57] Khodadoust S, Ghaedi M. "Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction with central composite design for preconcentration of chlordiazepoxide drug and its determination by HPLC-UV" J. Sep. Sci. 2013; 36 (11): 1734-42.

[58] Fernández P, Regenjo M, Fernández AM, Lorenzo RA, Carro AM. "Optimization of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for ultra performance liquid chromatography determination of benzodiazepines in urine and hospital wastewater" Anal. Methods 2014; 6: 8239-8246.

[59] Dziomba S, Kowalski P, Slominska A, Baczek T. "Field-amplified sample injection coupled with pseudo-isotachophoresis technique for sensitive determination of selected psychiatric drugs in human urine samples after dispersive liquid-liquid microextraction" Anal. Chim. Acta 2014; 811: 88-93.

[60] Mashayekhi HA, Rezaee M, Khalilian F. "Solid-phase extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction for the sensitive determination of ecstasy compounds and amphetamines in biological samples" Bull. Chem. Soc. Ethiop. 2014; 38: 339-348.

[61] Ahmadi-Jouibari T, Fattahi N, Shamsipur M. Rapid extraction and determination of amphetamines in human urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction and solidification of floating organic drop followed by high performance liquid chromatography" J. Pharm. Biomed. Anal. 2014; 94: 145-151.

[62] 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-traces amounts of benzodiazepines" J. Sep. Sci. 2011; 37: 87-294.

[63] Fernández P, Regenjo M, Bermejo AM, Fernández AM, Lorenzo RA, Carro AM. "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.

[64] 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.

[65] Gardner MA, Sampsel S, Jenkins WW, Owens JE, “Analysis of fentanyl in urine by DLLME–GC-MS”. J. Anal. Toxicol. 2015; 39: 118–125.

[66] Meng I, 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 2011; 1989: 46-53.

[67] Odoardi S, Fisichella M, Romolo FS, Strano-Rossi S. “High-throughput screening for new psychoactive substances (NPS) in whole blood by DLLME extraction and UHPLC-MS/MS analysis”. J. Chromatogr. B 2015; 1000: 57-68.

[68] Fernández P, Taboada V, Regenjo M, Morales L, Alvarez I, Carro AM, Lorenzo RA. “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.

[69] Farsimadan S, Goudarzi N, Chamjangali MA, Bagherian GA. “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.

[70] 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 benzodiazepine-like hypnotics in whole blood” Forensic Sci. Int. 2017; 274: 44-54.

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

[72] 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.

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

[74] Miyaguchi M, Iwata YT, 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.

[75] Somaini L, Saracino MA, Marcheselli C, Zanchini S, Gerra G, Raggi MA. "Combined liquid chromatography–coulometric detection and microextraction by packed sorbent for the plasma analysis of long acting opioids in heroin addicted patients" Anal. Chim. Acta 2011; 702: 280-282.

[76] Sarasin MA, Marcheselli C, Somaini L, Pieri MC, Gerra G, Ferranti A, Raggi MA. "A novel test using dried blood spots for the chromatographic assay of methadone" Anal. Bioanal. Chem. 2012; 404: 503-511.

[77] Candish E, Gooley A. Wirth H-J, Dawes PA, Shellie RA, Hilder EF. "A simplified approach to direct SPE-MS" J. Sep. Sci. 2012; 35: 2399-2406.

[78] Moreno IED, Fonseca BM, Magalhaes AR, Geraldes VS, Queiroz JA, Barroso M, Costa S, Gallardo E."Rapid determination of piperazine-type stimulants in human urine by microextraction in packed sorbent after method optimization using a multivariate approach" J. Chromatogr. A 2012; 1222: 116-120.

[79] Moreno IED, Da Fonseca BM, Barroso M, Costa S, Queiroz JA, Gallardo E. “Determination of piperazine-type stimulants in human urine by means of microextraction in packed sorbent and high performance liquid chromatography-diode array detection” J. Pharm. Biomed. Anal. 2012; 61: 93-99.

[80] Wietecha-Posluszny R, Garbacik A, Woźniakiewicz M, Moo 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.

[81] Sergi M, Montesano C, Odoardi S, Mainero Rocca L, 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.

[82] De Souza I.D, Domingues DS, Queiroz MEC. “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.

[83] Fernández P, González M, Regenjo M, Ares AM, Fernández AM, Lorenzo RA, Carro AM. “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.

[84] Rosado T, Fernandes L, Barroso M, Gallardo E. “Sensitive determination of THC and main metabolites in human plasma by means of microextraction in packed sorbent and gas chromatography–tandem mass spectrometry” J. Chromatogr. B 2017; 1043: 63-73.

[85] Ares AM, Fernández P, Regenjo M, Fernández AM, Carro AM, Lorenzo RA. “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.

[86] Skoog DA. "Principios de análisis instrumental" Ed. Cengage Learning, México, 2008.

[87] Cela R, Lorenzo RA, Casais MC. "Técnicas de separación en química analítica." Ed. Síntesis, 2002.

[88] Gilpin RG, Stinson J, Gilpin CS. "Ultra high-pressure liquid chromatography: an emerging technique" Meyers RA. "Encyclopedia of analytical chemistry, applications, theory and instrumentation". 1ªed. Ed. Wiley, USA, 2011.

[89] Zhang YV, Wei B, Zhu Y, Zhang Y, Bluth MH. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry: an emerging technology in the toxicology laboratory. Clin. Lab. Med. 2016; 36(4): 635-661.

[90] De Hoffmann E, Stroobant V. Mass spectrometry: Principles and applications. 3ª ed., John Wiley & Sons; 2007

[91] Fox EJ, Twigger S, Allen KR. "Criteria for opiate identification using liquid chromatography linked to tandem mass spectrometry: problems in routine practice". Ann. Clin. Biochem. 2009; 46: 50-57.

[92] Nakamura M, Ohmori T, Itoh Y, Terashitab M, Hiranob K. "Simultaneous determination of benzodiazepines and their metabolites in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a high resolution octadecyl silica column compatible with aqueous compounds". Biomed. Chromatogr. 2009; 23: 357–364.

[93] Badawi N, Simonsen KW, Steentoft A, Bernhoft IM, Linnet K. "Simultaneous screening and quantification of 29 drugs of abuse in oral fluid by solid-phase extraction and ultraperformance LC-MS/MS". Clin. Chem. 2009; 55: 2004-2018.

[94] Taylor K, Elliott S. "A validated hybrid quadrupole linear ion-trap LC-MS method for the analysis of morphine and morphine glucuronides applied to opiate deaths". Forensic Sci. Int. 2009; 187: 34-41.

[95] Gergov M, Nokua P, Vuori E, Ojanperä I. "Simultaneous screening and quantification of 25 opioid drugs in post-mortem blood

and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry". Forensic Sci. Int. 2009; 189: 36-43.

[96] Langman LJ, Bjergum MW, Williamson CL, Crow FW. "Sensitive method for detection of cocaine and associated analytes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in urine". J. Anal. Toxicol. 2009; 33(8): 447-55.

[97] Stout PR, Bynum ND, Mitchell JM, Baylor MR, Ropero-Miller JD. "A comparison of the validity of gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of urine samples for morphine, codeine, 6-acetylmorphine, and benzoylecgonine". J. Anal. Toxicol. 2009; 33(8): 398-408.

[98] Marchi I, Schappler J, Veuthey J-L, Rudaz S. "Development and validation of a liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry method for the quantification of alprazolam, flunitrazepam, and their metabolites in hemolysed blood". J. Chromatogr. A 2009; 877: 2275-2283.

[99] Berg T, Lundanes E, Christophersen AS, Strand DH. "Determination of opiates and cocaine in urine by high pH mobile phase reversed phase UPLC-MS/MS". J. Chromatogr. B 2009; 877: 421-432.

[100] Ishida T, Kudo K, Hayashida M, Ikeda N. "Rapid and quantitative screening method for 43 benzodiazepines and their metabolites, zolpidem and zopiclone in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with a small particle column" J. Chromatogr. B 2009; 877: 2652-2657.

[101] Bastos Borges K, Figueiredo Freire E, Martins I, Pereira Bastos de Siqueira ME. "Simultaneous determination of multi-benzodiazepines by HPLC/UV: Investigation of liquid-liquid and solid-phase extractions in human plasma" Talanta 2009; 78: 233-241.

[102] Mercolini L, Mandrioli R, Iannello C, Matrisciano F, Nicoletti F, Raggi MA. "Simultaneous analysis of diazepam and its

metabolites in rat plasma and brain tissue by HPLC-UV and SPE" Talanta 2009; 80: 279-285.

[103] Bjørk MK, Nielsen MK, Markussen LØ, Klinke HB, Linnet K. Determination of 19 drugs of abuse and metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem. 2010; 396(7): 2393-401.

[104] Fernández P, Vázquez C, Lorenzo RA, Carro AM, Álvarez I, Cabarcos P. "Experimental design for optimization of microwave-assisted extraction of benzodiazepines in human plasma" Anal. Bioanal. Chem. 2010; 397: 677-685.

[105] Concheiro M, Gray TR, Shakleya DM, Huestis MA. "High-throughput simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates, nicotine, and metabolites in oral fluid by liquid chromatography tandem mass spectrometry" Anal. Bioanal. Chem. 2010; 398: 915-924.

[106] Fernández P, Vázquez C, Lorenzo RA, Carro AM, Bermejo AM. "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.

[107] Chiuminatto U, Gosetti F, Dossetto P, Mazzucco E, Zampieri D, Robotti E, Gennaro MC, Marengo E. "Automated online solid phase extraction ultra high performance liquid chromatography method coupled with tandem mass spectrometry for determination of forty-two therapeutic drugs and drugs abuse in human urine" Anal. Chem. 2010; 82: 5636-5645.

[108] Sergi M, Compagnone D, Curini R, D'Ascenzo G, Del Carlo M, Napoletano S, Risoluti R. "Micro-solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of stimulants, hallucinogens, ketamine and phencyclidine in oral fluids" Anal. Chim. Acta, 2010; 675: 132-137.

[109] Simonsen KW, Hermansson S, Steentoft A, Linnet K. "A validated method for simultaneous screening and quantification of

twenty-three benzodiazepines and metabolites plus zopiclone and zaleplone in whole blood by liquid-liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry" J. Anal. Toxicol. 2010; 34: 332-341.

[110] Wang I-T, Feng Y-T, Chen C-Y. "Determination of 17 illicit in oral fluid using isotope dilution ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with three atmospheric pressure ion;izations" J. Chromatogr. B 2010; 878: 3095-3105.

[111] Remane D, Meyer MR, Wissenbach DK, Maurer HH. "Ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric multi-analyte procedure for target screening and quantification in human blood plasma: validation and application for 31 narcoleptics, 28 benzodiazepines, and Z-drugs" Anal. Bioanal. Chem. 2011; 401: 1341-1352.

[112] Fernández P, Seoane S, Vázquez C, Bermejo AM. "A rapid analytical method based on microwave-assisted extraction for the determination of drugs abuse in vitreous humor" Anal. Bioanal. Chem. 2011; 401: 2177-2186.

[113] Napoletano S, Montesano C, Compagnone D, Curini R, D´Ascenzo G, Roccia C, Sergi M. "Determination of illicit drugs in urine and plasma by micro-SPE followed by HPLC-MS/MS" Cromatographia. 2012; 75: 55-63.

[114] Kriikku P, Wilhelm L, Schwarz O, Rintatalo J. "New designer drugs of abuse: 3, 4-Methylendioxypyrovalerone (MDPV). Findings from apprehended drivers in Finland" Forensic Sci. Int. 2011; 210: 195-200.

[115] Uddin MN, Samanidou VF, Papadoyannis IN; "Simultaneous Determination of 1, 4-benzodiazepines and tricyclic antidepressants in saliva after sequential SPE elution by the same HPLC conditions" J. Chin. Chem. Soc. 2011; 58: 142-154.

[116] Ming DS, Heathcote J. "A rapid and accurate UPLC/ MS/MS method for the determination of benzodiazepines in human urine" J. Chromatogr. 2011; 879: 421-428.

[117] de Jager AD, Bailey NL. “Online extraction LC-MS/MS method for the simultaneous quantitative confirmation of urine drugs of abuse and metabolites: amphetamines, opiates, cocaine, cannabis, benzodiazepines and methadone” J. Chromatogr. B 2011; 879: 2642-2652.

[118] Sørensen LK. “Determination of cathinones and related compounds ephedrines in forensic whole-blood samples by liquid-chromatography-electrospray tandem mass spectrometry” J. Chromatogr. B 2011; 879: 727-736.

[119] Salomone A, Gerace E, Brizio P, Gennaro MC, Vicenti M. “A fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine. Validation and application to real cases of forensic interest” J. Pharm. Biomed. Anal. 2011; 56: 582-591.

[120] Magalhães EJ, Nascentes CC, Augusti R, Lopes Ribeiro de Queiroz ME, Cardoso da Silva JC, de Cássia Franco Alonso RJ. “Fast determination of benzodiazepines in human urine via liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and LC-HRMS” J. Anal. Chem. 2012; 3: 118-124.

[121] Cone EJ. “Oral fluid results compared to self reports of recent cocaine and heroin use by methadone maintenance patients” Forensic Sci. Int. 2012; 215: 88-91.

[122] Dupont Birkler RI, Telving R, Ingemann-Hansen O, Vesterby Charles A, Johannsen M, Findal Andreasen M. “Screening analysis for medicinal drugs and drugs of abuse in whole blood using ultra-performance liquid chromatography liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-TOF-MS)-Toxicological findings in cases of alleged sexual assault” Forensic Sci. Int. 2012; 222: 154-161.

[123] Zancanaro I, Pereira Limberger R, Bohel PO, Kerpel dos Santos M, De Boni RB, Pechansky F, Dutra Caldas E. “Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid-LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers” Forensic Sci. Int. 2012; 223: 208-216.

[124] Hoonka S, Bose D, Esteve-Romero J, Durgbanshi A. "Micellar liquid chromatography for the determination of some less prescribed benzodiazepines" J. Chem. 2012; 9: 443-450.

[125] Mirnaghi FS, Monton MRN, 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.

[126] Verplaetse R, Cuypers E, Tytgat J. "The evaluation of the applicability of a high pH mobile phase in ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of benzodiazepines and benzodiazepine-like hypnotics in urine and blood" J. Chromatogr. A 2012; 1249: 147-154.

[127] Wang X, Wang R, Zhang Y, Liang C, Ye H, Cao F, Rao Y. "Extending the detection window of diazepam by directly analyzing its glucuronide metabolites in human urine using liquid chromatography–tandem mass spectrometry" J. Chromatogr. A 2012; 1268: 29-34.

[128] Sauve EN, Langødegarda M, Ekeberg D, Øiestada AML. "Determination of benzodiazepines in ante-mortem and post-mortem whole blood by solid-supported liquid–liquid extraction and UPLC–MS/MS" J. Chromatogr. B 2012; 883-884: 177-188.

[129] Karampela S, Vardakou I, Papoutsis I, Dona A, Spiliopoulou C, Athanaselis S, Pistos C. "Direct urine analysis for the identification and quantification of selected benzodiazepines for toxicology screening" J. Chromatogr. B 2012; 902: 42-46.

[130] Madej K, Persona K, Nizio M. "Application of micelle-mediated extraction in preparation of body fluids for HPLC-DAD Screening of acidic and neutral drugs" Acta Chromatogr. 2013; 25: 97-110.

[131] Schaefer N, Peters B, Schmidt P, Ewald AH. "Development and validation of two LC-MS/MS methods for the detection and quantification of amphetamines, designer amphetamines,

benzoylecgonine, benzodiazepines, opiates, and opioids in urine using turbulent flow chromatography" Anal. Bioanal. Chem. 2013; 405: 247-258.

[132] Swortwood MJ, Boland DM, DeCaprio AP. "Determination of 32 cathinones derivatives and other designer drugs in serum by comprehensive LC-QQQ-MS/MS analysis" Anal. Bioanal. Chem. 2013; 405: 1383-1397.

[133] Bjørk MK, Simonsen KW, Andersen DW, Dalsgaard PW, Sigurðardóttir SR, Linnet K, Rasmussen BR. "Quantification of 31 illicit and medicinal drugs and metabolites in whole blood by fully automated solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry" Anal. Bioanal. Chem. 2013; 405: 2607-2617.

[134] Concheiro M, Anizan S, Ellefsen K, Huestis M. "Simultaneous quantification of 28 synthetic cathinones and metabolites in urine by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry" Anal. Bioanal. Chem. 2013; 405: 9437-9448.

[135] Matsuta S, Nakanishi K, Miki A, Zaitsu K, Shima N, Kamata T, Nishioka H, Katagi M, Tatsuno M, Tsuboi K, Tsuchihashi H, Suzuki K. "Development of a simple one-pot extraction method for various drugs and metabolites of forensic interest in blood by modifying the QuEChERS method" Forensic Sci. Int. 2013; 232: 40-45.

[136] Guale H, Shahreza S, Walterscheid JP, Chen H-H, Arndt C, Kelly AY, Mozayani A. "Validation of LC–TOF-MS screening for drugs, metabolites, and collateral compounds in forensic toxicology specimens" J. Anal. Toxicol. 2013; 37: 17-24.

[137] Amaratunga P, Loemberg BL, Lemberg D. "Quantitative measurement of synthetic cathinones in oral fluid" J. Anal. Toxicol. 2013; 37: 622-628.

[138] Fernández P, Seoane S, Vázquez C, Tabernero MJ, Carro AM, Lorenzo RA. "Chromatographic determination of drugs of abuse

in vitreous humor using solid-phase extraction" J. Appl. Toxicol. 2013; 33: 740-745.

[139] Mayer M, Benko A, Huszár, Sipos K, Lajtai A, Lakatos A, Porpàczy Z. "Simultaneous determination of 4-substituted cathinones (4-MMC, 4-MEC and 4-FMC) in human urine by HPLC-DAD" J. Chromatogr. Sci. 2013; 51: 861-866.

[140] Di Corcia D, Lisi S, Pirro V, Gerace E, Salomone A, Vicenti M. "Determination of pharmaceutical and illicit drugs in oral fluid by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry" J. Chromatogr. B. 2013; 927: 133-141.

[141] Lin H-R, Chen C-L, Huang C-L, Chen S-T, Lua A-C. "Simultaneous determination of opiates, methadone, buprenorphine and metabolites in human urine by superficially porous liquid chromatography tandem mass spectrometry" J. Chromatogr. B. 2013; 925 : 10-15.

[142] Jang M, Chang H, Yang W, Choi H, Kim E, Yu B-H, Oh Y, Chung H. "Development of an LC–MS/MS method for the simultaneous determination of 25 benzodiazepines and zolpidem in oral fluid and its application to authentic samples from regular drug users" J. Pharm. Biomed. Anal. 2013; 74: 213-222.

[143] Ramírez Fernández MM, Wille SMR, Kummer N, Di Fazio V, Ruyssinckx E, Samyn N. "Quantitative analysis of 26 opioids, cocaine, and their metabolites in human blood by Uutra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry" Ther. Drug Monit. 2013; 35: 510-521.

[144] Montenarh D, Hopf M, Maurer HH, Schmidt P, Ewald AH. "Detection and quantification of benzodiazepines and Z-drugs in human whole blood, plasma, and serum samples as part of a comprehensive multi-analyte LC-MS/MS approach" Anal. Bioanal. Chem. 2014; 406: 803-818.

[145] Anizan S, Ellefsen K, Concheiro M, Suzuki M, Rice KC, Baumann MH, Huestis MA. "3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) and metabolites quantification in human and rat plasma by

liquid chromatography–high resolution mass spectrometry" Anal. Chim. Acta 2014; 827: 54-63.

[146] Asgharinezhad AA, Ebrahimzadeh H, Mirbabaei F, Mollazadeh N, Shekari N. "Dispersive micro-solid-phase extraction of benzodiazepines from biological fluids based on polyaniline/magnetic nanoparticles composite" Anal. Chim. Acta 2014; 844: 80-89.

[147] Andersson M, Stephanson N, Öhman I, Terzuoli T, Lindh JD, Beck O. "Direct and efficient liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for opiates in urine drug testing – importance of 6-acetylmorphine and reduction of analytes" Drug Test. Analysis 2014; 6: 317-324.

[148] Anzillotti L, Odoardi L, Strano-Rossi S. "Cleaning up blood samples using a modified "QuEChERS" procedure for the determination of drugs of abuse and benzodiazepines by UPLC–MSMS" Forensic Sci. Int. 2014; 243: 99-106.

[149] Bertol E, Mari F, Berto RB, Mannaoni G, Vaiano F, Favretto D. "A mixed MDPV and benzodiazepine intoxication in a chronic drug abuser: Determination of MDPV metabolites by LC–HRMS and discussion of the case" Forensic Sci. Int. 2014; 243: 149-155.

[150] Steuer AE, Forss A-M, Dally AM, Kraemer T. "Method development and validation for simultaneous quantification of 15 drugs of abuse and prescription drugs and 7 of their metabolites in whole blood relevant in the context of driving under the influence of drugs—Usefulness of multi-analyte calibration" Forensic Sci. Int. 2014; 244: 92-101.

[151] de Castro A, Lendoiro E, Fernández-Vega H, Steinmeyer S, López-Rivadulla M, 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.

[152] Hegstad S, Hermansson S, Betnér I, Spigset O, Falch BMH. “Screening and quantitative determination of drugs of abuse in diluted urine by UPLC-MS/MS” J. Chromatogr. B 2014; 947-948: 83-95.

[153] Saito K, Kikuchi Y, Saito K. “Solid-phase dispersive extraction method for analysis of benzodiazepine drugs in serum and urine samples” J. Pharm. Biomed. Anal. 2014; 100: 28-32.

[154] 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.

[155] Jeong Y-D, Kim MK, Suh SI, In MK, Kim JY, Peang K-Y. “Rapid determination of benzodiazepines, zolpidem and their metabolites in urine using direct injection liquid chromatography–tandem mass spectrometry” Forensic Sci. Int. 2015; 257: 84-92.

[156] Xiong L, Wang R, Liang C, Teng X., Jiang F, Zeng L, Ye H, Ni C, Yuan X, Rao Y, Zhang Y. “Determination of co-administrated opioids and benzodiazepines in urine using column-switching solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry” J. Chromatogr. A 2015; 1395: 99-108.

[157] Concheiro M, Castaneto M, Kronstrand R, Huestis MA. “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.

[158] Wózniakiewicz A, Wietecha- Posłuszny R, Wózniakiewicz M, Nowak J, Kóscielniak P. “Development of the MAE/UHPLC-MS-TOF method for determination of benzodiazepines in human bio-fluids for toxicological analysis” J. Pharm. Biomed. Anal. 2015; 108: 97-101.

[159] Dulaurent S, El Balkhi S, Poncelet L, Gaulier J-M, Marquet P, Saint-Marcoux F. “QuEChERS sample preparation prior to LC-MS/MS determination of opiates, amphetamines, and cocaine metabolites in whole blood” Anal. Bioanal Chem. 2016; 408: 1467-1474.

[160] Pebdani AA, Khodadout S, Talebianpoor MS, Zargar HR, 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.

[161] Glicksberg L, Bryand K, Kerrigan S. "Identification and quantification of synthetic cathinones in blood and urine using Liquid Chromatography-Quadrupole/Time of Flight (LC-Q/TOF) Mass Spectrometry" J. Chromatogr. B 2016; 1035: 91-103.

[162] Mercolini L, Protti M, Catapano MC, Rudge J, Sbern AE. "LC–MS/MS and volumetric absorptive microsampling for quantitative bioanalysis of cathinones analogues in dried urine, plasma and oral fluid samples" J. Pharm. Biomed. Anal. 2016; 123: 186-194.

[163] Lee HH, Lee JF, Lin SY, Chen BH. "Simultaneous identification of abuse drugs, benzodiazepines, and new psychoactive substances in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry" J. Med. Sci. 2016; 32: 118-127.

[164] Lee X-P, Shouji Y, Kumazawa T, Hasegawa C, Fujishiro M, Sato J, Hasegawa I, Sato K. "Rapid and highly sensitive analysis of benzodiazepines and tandospirone in human plasma by automated on-line column-switching UFLC-MS/MS" Legal Med 2016; 24: 36-55.

[165] Vosough M, Iravani NJ. "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.

[166] Miller B, Kim J, Concheiro M; "Stability of synthetic cathinones in oral fluid samples" Forensic Sci. Int. 2017; 274: 13-21.

[167] Dunlop S, Hayes K, Leavy P, Cusack D, Maguire R. "An atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatographic–tandem mass spectrometry method for the analysis of benzodiazepines in urine" J. Chromatogr. B 2017; 1070: 22-27.

[168] Chen X, Xirong C, Ding K, Zhou Z, Zhan C-G, Zheng F. "A quantitative LC–MS/MS method for simultaneous determination of cocaine and its metabolites in whole blood" J. Pharma. Biomed. Anal. 2017; 134: 243-251.

[169] Fiorentin TR, D'Avila FB, Comiran E, Zamboni A, Juliana Nichterwitz Scherer J, Pechansky F, Mayorga Borges PE, Fröehlich PE, Pereira Limberger R. "Simultaneous determination of cocaine/crack and its metabolites in oral fluid, urine and plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in drug users" J. Pharm. Toxicol. Methods 2017; 86: 60-66.

[170] Montesano C, Vannutelli G, Piccirilli V, Sergi M, Compagnone D, Curini R. "Application of a rapid μ-SPE clean-up for multiclass quantitative analysis of sixteen new psychoactive substances in whole blood by LC– MS/MS" Talanta 2017; 167: 260-267.

[171] Caspar AT, Kollas AB, Maurer HH, Meyer MR. "Development of a quantitative approach in blood plasma for low-dosed hallucinogens and opioides using LC-high resolution mass spectrometry Talanta 2018; 176: 635-645.

[172] Brereton RG, Jansen J, Lopes J, Marini F, Pomerantsev A, Rodionova O, Roger JM, Walczak B, Tauler R. "Quimiometría en química analítica, Parte I: historia, diseño experimental y herramientas de análisis de datos" Anal. Bioanal. Chem. 2017; 409: 5891-5899.

[173] Candioti LV, De Zan MM, Cámara MS, Goicoechea HC. "Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development" Talanta 2014; 124: 123–138.

[174] Leardi R. "Experimental design in chemistry: A tutorial" Anal. Chim. Acta, 2009; 652: 161-172.

[175] Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM. "Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments" Wiley Series in Probability and Statistics Wiley, New York 2009.

[176] Lewis GA, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. "Pharmaceutical experimental design", Marcel Dekker, New York, 1999.

[177] Hibbert DB. "Experimental design in chromatography: A tutorial review" J. Chromatogr. B, 2012; 910: 2– 13.

[178] Callao MP. "Multivariate experimental design in environmental analysis" Trends Anal. Chem. 2012; 62: 86–92

[179] Ryan TP. "Modern experimental design", 1ªed, Ed Wiley-Interscience, 2007.

[180] Otto M. "Chemometrics: statistics and computer. Application in analitycal chemistry" 2ªed, Ed. Wiley-VCH, New York, 2007.

[181] "Guidance for industry. Bioanalytical method validation" 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 2013 BP.

[182] Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) "Guidelines on bioanalytical method validation." European Medicines Agency. Science Medicines Health. 2011.

[183] Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. "Validation of new methods." Forensic Sci. Int. 2007; 165: 216-224.

[184] González O, Blanco MA, Iriarte G, Bartolomé L, Maguregui MI, Alonso RM. "Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect." J. Chromatogr. A 2014; 1353: 10-27.

[185] 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.

[186] 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 I.” Anal. Chim. Acta 2015; 870: 29-44.

[187] Eurolab España. PP Morillas y col. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016). Disponible en www.eurachem.org

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN.

Las benzodiazepinas son unos de los medicamentos más usados a nivel mundial. Se prescriben como sedantes, hipnóticos, ansiolíticos, anticonvulsivantes, anestésicos o miorrelajantes, y su uso ha ido en aumento en los últimos años. En 2017, se observó que el clonazepam, diacepam y alprazolam se encontraban entre las veinte drogas más citadas en urgencias (Figura 31). Esto justifica la necesidad de métodos que permitan su detección en muestras biológicas.

Las drogas de abuso son responsables de numerosas muertes cada año. La cocaína es la segunda droga más consumida en Europa y se estima que 17,5 millones de adultos europeos la han consumido en algún momento de su vida. Otras de las drogas muy consumidas en Europa son los opiáceos, que se usan en algunos casos como medicamentos sustitutorios de otras drogas o medicamentos para el dolor. Actualmente se están introduciendo en el mercado nuevas drogas sintéticas entre las que se encuentran las catinonas, alternativas legales a otras drogas. [1-4]

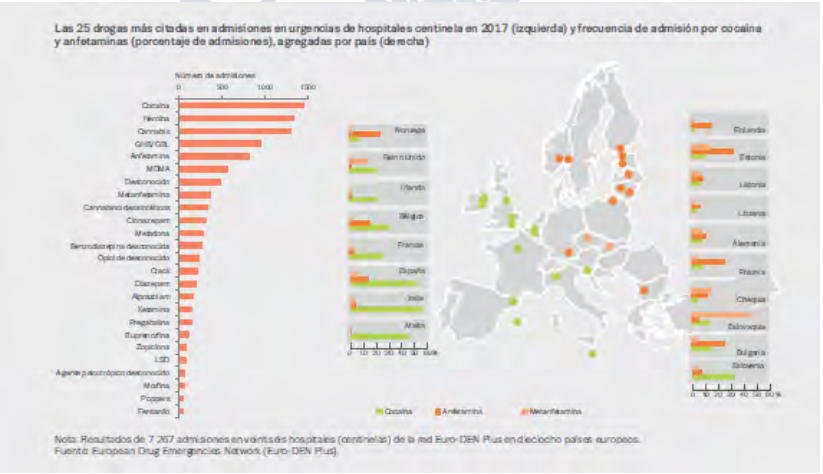


Figura 31. Las 20 drogas más citadas en los servicios de urgencias de hospitales centinela en 2017. Con permiso de Observatorio Europeo Sobre Drogas y Toxicomanía. "Informe europeo sobre drogas. Tendencias y novedades" Luxemburgo: Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, 2019.

La Figura 32 muestra las tasas de mortalidad por drogas entre 2000 y 2017. [4]

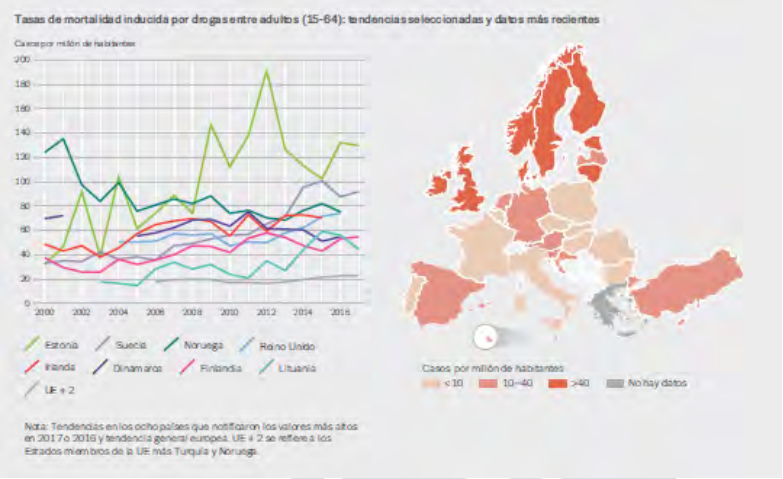


Figura 32. Tasas de mortalidad inducida por drogas entre adultos (15-64 años): tendencias seleccionadas y datos más recientes (Años 2000-2017). Con permiso de Observatorio Europeo Sobre Drogas y Toxicomanía. "Informe europeo sobre drogas. Tendencias y novedades" Luxemburgo: Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, 2019.

Por todos estos motivos es necesario poner a punto métodos para detectar estas drogas en muestras biológicas (Figura 33). En este trabajo, se estudiaron la orina, el plasma y la saliva, así como las aguas residuales, que tienen una gran importancia puesto que las drogas consumidas y eliminadas por la orina llegan a ellas, pudiendo contaminar el medio ambiente.

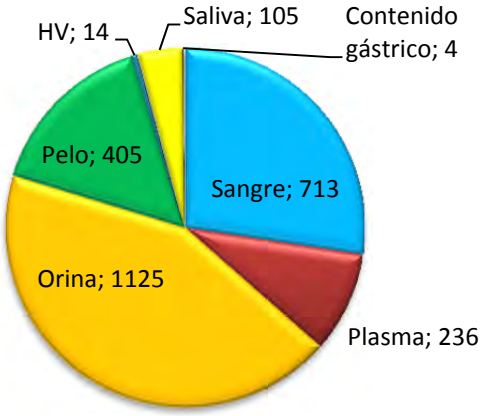


Figura 33: Número de artículos según la muestra biológica usada para el análisis de drogas de abuso en el período 2010-2016

Actualmente la miniaturización de las técnicas para hacer a los métodos más económicos y respetuosos con el medio ambiente (química verde) llevó a la aparición de la DLLME y la MEPS, técnicas que son una miniaturización de la LLE y la SPE tradicionales y que presentan las ventajas de estas técnicas clásicas, reduciendo la cantidad de muestra necesaria y el volumen utilizado de disolventes, así como el tiempo necesario para realizar la extracción. [5, 6]

La técnica de separación debe ser robusta para que permita la separación de los compuestos y su identificación inequívoca en el detector. En este trabajo, se seleccionó la cromatografía líquida como técnica de separación, por su idoneidad para la separación de muestras no volátiles y su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas [7]. Como técnicas de determinación se han seleccionado los detectores de array de diodos y la espectrometría de masas; el primero es uno de los detectores más habituales en los laboratorios y presenta una buena sensibilidad, mientras que el segundo proporciona información, tanto cualitativa como cuantitativa, de las moléculas analizadas. [2]

Referencias

[1] “Informe mundial sobre las drogas” UNODC Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito, 2016.

[2] Observatorio europeo sobre drogas y toxicomanía “Informe europeo sobre drogas. Tendencias y novedades” Luxemburgo: Oficina de publicaciones de la Unión Europea, 2017.

[3] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, AEMPS “Informe de utilización de medicamentos U/HAY/V1/17012014” Ministerio de Sanidad, 2014.

[4] Observatorio Europeo Sobre Drogas y Toxicomanía “Informe europeo sobre drogas. Tendencias y novedades” Luxemburgo: Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, 2019.

[5] Saraji M., Khalili Boroujent M.; “Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction” Anal. Bioanal. Chem. 2014; 406: 2027-2066

[6] Abdel-Rehim M. “Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial” Anal. Chim. Acta 2011; 701: 119-128.

[7] Skoog DA. “Principios de análisis instrumental” Ed. Cengage Learning, México, 2008.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2. OBJETIVOS.

1. Desarrollar un método de US-DLLME para la extracción de benzodiazepinas en orina y aguas residuales, con ayuda de los diseños experimentales.
2. Desarrollar un método UPLC-PDA para la separación y determinación de benzodiazepinas en orina y aguas residuales.
3. Aplicar el método US-DLLME-UPLC-PDA a muestras de orina de consumidores de benzodiazepinas y a aguas residuales de depuradoras y del hospital.
4. Desarrollar un método de US-DLLME para la extracción de drogas de abuso en plasma, con ayuda de diseños experimentales.
5. Desarrollar un método HPLC-PDA para la separación y determinación de drogas de abuso en plasma.
6. Aplicar el método US-DLLME-HPLC-PDA a muestras de individuos que han consumido estas drogas.
7. Desarrollar un método de MEPS para la extracción de drogas de abuso en plasma, usando diseños experimentales.
8. Desarrollar un método UPLC-PDA para la separación y determinación de drogas de abuso en plasma.
9. Aplicar el método MEPS-UPLC-PDA a muestras de consumidores y comparar los resultados de estas muestras con el método usado de forma rutinaria.
10. Desarrollar un método de US-DLLME para la extracción de drogas clásicas y nuevas drogas de síntesis en saliva, usando diseños experimentales.
11. Desarrollar un método UPLC-MS/MS para la separación y determinación de drogas en saliva.
12. Aplicar el método US-DLLME-UPLC-MS/MS a muestras de saliva de individuos que se encuentran en proceso de desintoxicación.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. METODOLOGÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. METODOLOGÍA

3.1. DETERMINACIÓN DE BENZODIAZEPINAS (BZD) EN ORINA Y AGUAS RESIDUALES DE HOSPITALES.

3.1.1. Reactivos.

Las siete benzodiazepinas (BZD) estudiadas (Alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam, lorazepam, lormetazepam y tetrazepam) se obtuvieron de Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Acetonitrilo, acetona, cloroformo, clorobenceno, tetracloroetileno, dicloroetano, tetracloruro de carbono, diclorometano, 2-propanol, metanol, ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potasio, hidróxido de potasio e hidróxido de sodio fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). El cloruro de sodio 99,8% fue proporcionado por VWR Prolabo (Mollet del Vallés, Barcelona, España). El agua ultrapura es producida por un sistema Milli-Q, de Millipore (Le Mont-sur-Lausane, Suiza). Se usaron membranas de acetato de celulosa de tamaño de poro 0,45 µm, (Millipore, MA, USA) para filtrar las aguas residuales. Se preparó un tampón fosfato 1mM disolviendo 0,064 g de dihidrogenofosfato de potasio en 0,5 L de agua Milli Q y se ajustó a pH 6 con hidróxido de potasio. Se prepararon disoluciones madre individuales que contenían 1 mg/mL de cada BZD en metanol. Se prepararon mezclas estándar en muestras de orina y aguas residuales, mediante dilución sucesiva de las disoluciones madre, a concentraciones entre 10 y 5000 ng/mL y entre 0,5 y 50 ng/mL, respectivamente. Las disoluciones madre se congelaron a -20ºC.

3.1.2. Muestras de orina y agua.

Se recogieron muestras de orina blanco de un adulto sano que no había tomado BZD y muestras de orina de pacientes que tomaban BZD. En ambos casos, las muestras se almacenaron a 4°C. Se usó hidróxido sódico 0,05M para ajustar el pH de la orina. Si el análisis se retrasa, las muestras de orina se congelan a -20ºC. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con los "*Principios éticos para la investigación médica implicando seres humanos”*. [1]

Se tomaron seis muestras de aguas residuales urbanas del afluente y el efluente, recogidas en la *Estación de Aguas Residuales* (EDAR) de Galicia y muestras de aguas residuales del efluente del hospital. Las muestras se recogieron en botellas de vidrio de color ámbar de 250 mL, previamente enjuagadas con agua de la muestra, y transportadas inmediatamente al laboratorio. Finalmente, se filtraron a través de membranas de acetato de celulosa (tamaño de poro: 0,45 µm) y se almacenaron a 4ºC en la oscuridad, hasta su análisis.

3.1.3. Procedimiento de UA-DLLME.

En un tubo cónico de vidrio con tapón de rosca se introducen 0,5 mL de orina (pH 9), 4,5 mL de agua ultrapura y 0,2 g de cloruro sódico. Se añaden rápidamente 1,5 mL de acetona (disolvente dispersante) y 160 µL de cloroformo (disolvente extractante). A continuación, la mezcla se introduce en un baño de ultrasonidos durante 4,5 minutos, formándose una disolución turbia. El extractante se separa por centrifugación a 3500 rpm durante 8 min, y la fase sedimentada se recupera usando una jeringa. El extracto se evapora a sequedad bajo una corriente de nitrógeno a 40ºC, se reconstituye en 100 µL de fase móvil, se pasa a través de un filtro de 0,2 µm y se inyecta en el sistema UPLC (Figura 34).

En muestras de aguas residuales se usaron 5 mL de muestra y el resto del procedimiento UA-DLLME se realizó igual que en la orina (Figura 34).

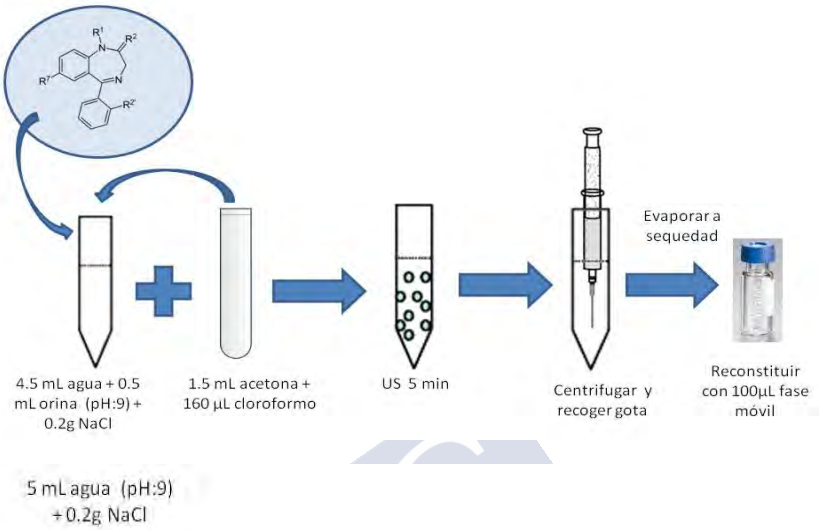


Figura 34: Procedimiento de la DLLME para benzodiazepinas en orina y aguas residuales.

3.1.4. Condiciones de UPLC-PDA.

La separación y la detección se realizaron utilizando un sistema ACQUITY UPLC H-Class con un detector ACQUITY UPLC PDA y una columna ACQUITY BEH Shield RP18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm de tamaño de partícula) a una velocidad de 0,4 mL/min y a una temperatura de 30ºC. El volumen de inyección fue de 5 µL. La fase móvil usada consiste en una mezcla de acetonitrilo (A) y tampón de fosfato 1mM pH 6 (B) en modo gradiente, de la siguiente manera: 0 min 34% A, 1,5 min 46% A, 2,33 min 60% A, 3,17 min 70% A, 4 min 70% A, y 4,5 min 34% A. El PDA permitió escanear el rango de longitud de onda de 200 a 400 nm para obtener cromatogramas tridimensionales (longitud de onda x tiempo x absorbancia). En este trabajo, la detección se realizó a 230 nm para obtener una mejor sensibilidad. Para confirmar la identidad de las señales cromatográficas se usaron el tiempo de retención y el espectro de absorbancia UV, característico de cada compuesto (Tabla 14).

Tabla 14: Tiempo de retención y longitud de onda máxima de cada compuesto.

Analito	tr (min)	λ max (nm)
Alprazolam	1,5	233,8
Bromazepam	2,1	221,5
Clonazepam	2,0	229,5
Diazepam	2,4	211,8
Lorazepam	2,7	230,7
Lormetazepam	3,1	229,5
Tetrazepam	3,6	227,0

3.1.5. Diseño Experimental: Diseño Doehlert.

Para obtener las mejores condiciones operacionales de UA-DLLME, el efecto del volumen de disolvente extractante (80; 140 y 200 μL), el tiempo de agitación por ultrasonidos (0,2; 1,4; 2,5; 3,6 y 4,8 min) y el pH (8,4; 9,0; 9,5; 10; 10,5; 11 y 11,6) se evaluaron simultáneamente por una metodología de superficie de respuesta, usando un diseño Doehlert que incluye quince experimentos, realizando tres replicados en el punto central del dominio experimental. La respuesta, el área del pico obtenida a partir del análisis UPLC-PDA para cada BZD, se ajustó mediante una ecuación de regresión múltiple (1), que incluye términos de curvatura e interacción:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^{n} b_i x_i + \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{n} b_{ij} x_i x_j \qquad (1)$$

donde $\mathbf{x_i}$ es el valor codificado de los factores estudiados e **y** es la función de respuesta obtenida para cada analito. Los valores **b** son los coeficientes polinómicos estimados: $\mathbf{b_0}$ es la ordenada en el origen, los coeficientes $\mathbf{b_i}$ representan el efecto principal para cada variable, los coeficientes $\mathbf{b_{ij}}$ en los términos cuadráticos son responsables de los efectos de curvatura, y los coeficientes $\mathbf{b_{ij\ (i=j)}}$ describen los efectos de

interacción. Los resultados obtenidos se evaluaron utilizando el software NemrodW®. Los coeficientes del modelo $\mathbf{b_i}$ se calculan mediante regresión lineal de mínimos cuadrados y se validan mediante ANOVA. Para encontrar las mejores condiciones de compromiso, se aplica una optimización multicriterio basada en las funciones de deseabilidad, sin experimentación adicional. Las respuestas se transformaron utilizando una escala de deseabilidad adimensional ($\mathbf{d_i}$), que varió entre d=0 para una respuesta completamente indeseable y d=1 para una respuesta completamente deseada. Se maximizó la deseabilidad global (**D**) que combina la deseabilidad individual ($\mathbf{d_i}$) de todas las variables de respuesta en una sola medida.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN PLASMA MEDIANTE DLLME-HPLC-PDA.

3.2.1. Reactivos.

Los estándares de las drogas estudiadas se obtuvieron de Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Acetonitrilo, metanol, acetona, cloroformo, tetracloruro de carbono, tetracloruro de etilo, clorobenceno, diclorometano, dicloroetano, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio y dihidrogenofosfato de potasio fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). El agua purificada se obtuvo de un sistema de agua Milli Q de Millipore (Le Mont-sur-Lausane, Suiza). Se preparó un tampón fosfato 0,05M disolviendo 0,68 g de dihidrogenofosfato de potasio en 1 L de agua Milli Q y se ajustó a pH 6,5 con hidróxido potásico. Se prepararon disoluciones madre individuales que contenían 1 mg/mL de cada droga en metanol. Las disoluciones de trabajo incluyendo las cinco drogas se realizaron por dilución sucesiva de las disoluciones madre hasta concentraciones finales de 100, 500, 1000, 2000, 5000 y 10000 ng/mL en plasma. Todas las disoluciones se almacenaron refrigeradas a 4ºC.

3.2.2. Muestras de plasma.

Para preparar estándares de calibración se utilizó plasma libre de drogas, suministrado por el Centro de Transfusión de Galicia. Se obtuvieron muestras reales de plasma de sujetos consumidores de drogas de abuso y se almacenaron a 4ºC cuando su análisis es inmediato o a -20ºC si se retrasa el análisis. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con los "*Principios éticos para la investigación médica implicando seres humanos”*. [1]

3.2.3. Procedimiento de US-DLLME.

En un tubo de 5 mL se añadieron 500 μL de plasma conteniendo las drogas y 3,2 mL de acetonitrilo (disolvente dispersante, que también facilita la precipitación de las proteínas plasmáticas). La mezcla se centrifugó a 4000 rpm durante 4 minutos, el sobrenadante se transfirió a otro tubo de 5 mL y se añadieron 220 μL de cloroformo (disolvente extractante). En otro tubo cónico se añadieron 4,5 mL de agua Milli-Q, 50 μL de NaOH 0,5M, 0,2 g de NaCl y los contenidos

del tubo anterior de 5 mL. La disolución turbia resultante se agitó en un baño de ultrasonidos durante 3,5 minutos y se centrifugó a 4000 rpm durante 4 minutos. La gota sedimentada se retiró con una microjeringa y se transfirió a un tubo cónico para su evaporación a sequedad, bajo una corriente de nitrógeno a 40°C. El residuo se reconstituyó con 100 µL de fase móvil (10:90, acetonitrilo/tampón fosfato pH 6,5) y una alícuota de 30 µL fue inyectada en el cromatógrafo, para su análisis (Figura 35). Puesto que se pasó de un volumen inicial de 500 µL de plasma a un volumen final de 100 µL de fase móvil, el factor de preconcentración de todos los analitos fue 5.

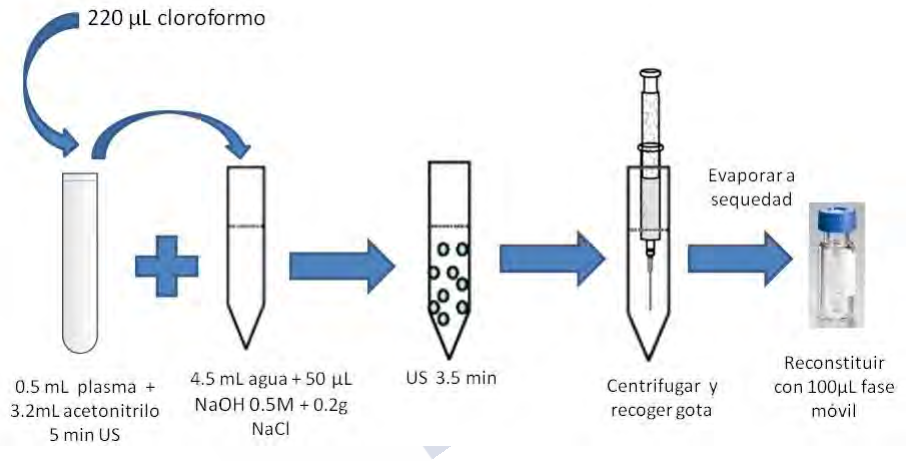


Figura 35: Procedimiento de DLLME para la extracción de drogas en plasma.

3.2.4. Condiciones de HPLC-PDA.

Se utiliza un sistema HPLC con detector de red de diodos (PDA) que consiste en una bomba Modelo 2695, un detector de fotodiodos Modelo 996 (multi-longitud de onda) y una columna XBridge TM Shield RP18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm), todo de Waters® (Milford, MA, USA). Los datos se procesaron con el software Empower Pro®. La fase móvil contenía acetonitrilo (A), tampón fosfato 0,05M a pH 6,5 (B) y agua Milli Q (C), y se utilizó a un caudal de 1,0 mL/min en modo gradiente: 0-5 min, 10% A y 90% B; 10 min, 25% A y 75% B; 11-13 min, 50% A y 50% B; 15 min, 70% A y 30% C, y 18 min, 10%

A y 90% B. En la Tabla 15 se pueden observar los tiempos de retención y las longitudes de onda máximas de las drogas estudiadas.

Tabla 15: Tiempos de retención y longitudes de onda máxima de las drogas estudiadas.

Droga	**t_r (min)**	**λ_{max}**
Morfina	7,0	284
BEG	11,9	233
6AM	13,7	284
Cocaína	15,3	233
Metadona	17,5	290

3.2.5. Diseño experimental.

Por lo general, las pruebas toxicológicas implican un estudio preliminar de detección, dada la gran cantidad de factores que pueden afectar a los análisis de drogas. Las pruebas preliminares facilitan la selección posterior de variables para evaluar la metodología de la superficie de respuesta con tan pocos experimentos como sea posible. La estrategia experimental (Red uniforme Doehlert) permite obtener una relación causa-efecto entre los factores que influyen en un sistema y las respuestas que se encuentran. En este trabajo, se utilizó un modelo polinomial de segundo orden ajustado a la respuesta de cada analito individual de acuerdo con la siguiente ecuación (2):

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^{n} b_i x_i + \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{n} b_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

donde $\mathbf{x_i}$ es el valor codificado de los factores diana**,** **y** es la función de respuesta, expresada como la eficiencia de la extracción (es decir, volumen de fase sedimentada × área cromatográfica de pico) para cada analito, y **b** indica los coeficientes polinómicos estimados: $\mathbf{b_0}$ es la ordenada en el origen, $\mathbf{b_i}$ representa el efecto principal de cada variable, $\mathbf{b_{ij}}$ son coeficientes que reflejan los efectos de la curvatura y $\mathbf{b_{ij}}$ **(i ≠ j)** describe los efectos de las interacciones entre los factores.

Los valores de respuesta obtenidos se usaron para estimar los coeficientes del modelo utilizando la regresión lineal múltiple con el método de mínimos cuadrados, y la validación del modelo se realizó por análisis de la varianza (ANOVA).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN PLASMA MEDIANTE MEPS-UPLC-PDA.

3.3.1. Reactivos.

Metanol, 2-propanol, acetonitrilo, diclorometano, ácido fosfórico, dihidrogenofosfato potásico, hidróxido potásico y ácido fórmico fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). El hidróxido amónico procede de Panreac (Barcelona, España). El agua ultrapura se obtuvo mediante un sistema Milli-Q suministrado por Millipore (Le Mont-sur-Lausanne, Suiza). Los estándares de drogas se obtuvieron de Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Los filtros de jeringa PTFE de 0,22 μm fueron adquiridos en *Membrane Solutions* (Dallas, TX, USA). La jeringa analítica automática eVols® (500 μL), el conjunto aguja insertada en barril (BIN) conteniendo los adsorbentes (C8, C18 y M1- adsorbente mixto, con 80% de C8 y 20% de un fuerte intercambiador catiónico, SCX) proceden de SGE Analytical Science (SGE Europe Ltd., Chester, Reino Unido). Se determinó que cada adsorbente era capaz de realizar unas 75 extracciones. La centrífuga Minicen, fue suministrada por Orto-Alresa (Ajalvir, Madrid, España). Se prepararon disoluciones madre individuales que contenían 1 mg/mL de cada droga, pesando y disolviendo exactamente la cantidad adecuada de estándar en metanol. También se prepararon mezclas estándar utilizadas para la optimización de los métodos y calibraciones, mediante dilución sucesiva de las disoluciones madre, hasta concentraciones entre 0,05 y 10 μg/mL. Las disoluciones se congelaron a -20°C.

3.3.2. Muestras de plasma.

Se obtuvieron muestras de plasma blanco del Centro de Transfusión de Galicia (Santiago de Compostela, España) y se utilizaron para la preparación de patrones de calibración. A este plasma libre de drogas se le añadieron los estándares para optimizar y validar el método analítico. Se obtuvieron muestras de plasma de casos de sobredosis de pacientes clínicos o intoxicaciones forenses con drogas de abuso y se almacenaron a 4°C o se congelaron cuando el análisis se retrasó. Cuando se reciben muestras de sangre completa

se necesita una etapa de centrifugación a 15596 xg para obtener la fracción de plasma. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con los "*Principios éticos para la investigación médica implicando seres humanos"*. [1]

3.3.3. Procedimiento de MEPS.

El proceso de MEPS fue realizado con una jeringa analítica automatizada eVol®XR (500 µL) equipada con un BIN que contiene 4 mg de material adsorbente (tamaño de partícula de 45 µm y tamaño de poro de 60 Å), que permite que el MEPS sea semiautomático. En primer lugar, el sorbente se acondicionó con 1×100 µL de metanol, seguido de 1x100 µL de agua ultrapura a 20 µL/seg, antes de las extracciones. Alícuotas de 300 µL de plasma se mezclaron con 200 µL de metanol para eliminar algunos compuestos endógenos del plasma (por ejemplo, proteínas o fosfolípidos). La mezcla se centrifugó (5 min a 15596 xg) y se tomaron 300 µL de sobrenadante, a los que se añadió 200 µL de tampón fosfato 0,05M pH 8. Esta mezcla de 500 µL se pasó a través del adsorbente de MEPS (C8/SCX) a 10 µL/seg**.** A continuación, el cartucho se lavó con 150 µL de agua ultrapura-metanol (90:10, v/v) a 10 µL/seg para eliminar las interferencias retenidas y se secó con 3x100 µL de aire. Los analitos se eluyeron con 200 µL de diclorometano: 2-propanol: hidróxido amónico (78: 20: 2, v/v/v) y el eluato se evaporó a sequedad, se redisolvió en 100 µL de fase móvil y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm, antes de su inyección en UPLC-PDA. El adsorbente se lavó con 4x100 µL de agua ultrapura, 4x100 µL de ácido fórmico acuoso al 0,1% y 4x100 µL de metanol (a 20 µL/seg) entre cada dos extracciones para aumentar el tiempo de vida del adsorbente hasta más de 80 extracciones (Figura 36).

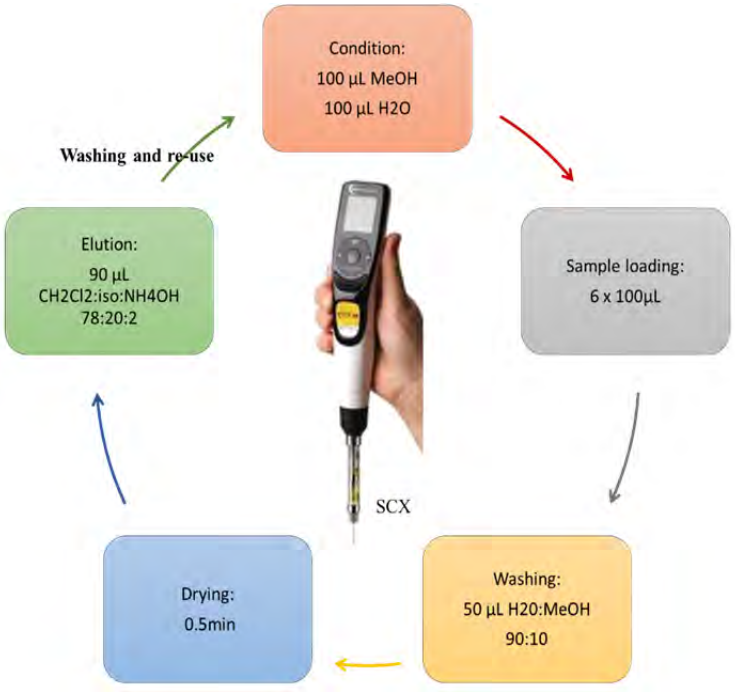


Figura 36: Procedimiento de MEPS para la extracción de drogas en plasma.

3.3.4. Condiciones de UPLC-PDA.

El análisis de las drogas se realizó con un sistema Waters® ACQUITY UPLC H-Class, compuesto por un controlador para disolventes (QSM) y un detector ACQUITY UPLC PDA (Milford, MA, USA). El control instrumental fue realizado con el software EmpowerPro®v2.0 de Waters. La separación se logró usando una columna Waters Acquity UPLC BEH Shield RP18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm) con una velocidad de flujo de 0,4 mL/min. La fase móvil contiene ácido fórmico en agua al 0,1% (A) y ácido fórmico en ACN al 0,1% (B). Gradiente: 0 min 90% A, 3,5 min 30% A, 4 min 90% A. La temperatura de la columna se ajustó a 55°C, y las muestras se mantuvieron a 10°C. Se inyectó un volumen de 5 µL, utilizando un muestreador automático. El PDA permitió escanear el rango de longitud de onda de 200 a 400 nm para obtener cromatogramas

tridimensionales (longitud de onda × absorbancia × tiempo). Los tiempos de retención, junto con los espectros UV obtenidos y la longitud de onda máxima de cada droga, fueron usados para confirmar la identidad de los picos cromatográficos (Tabla 16).

Tabla 16: Tiempo de retención y longitud de onda máxima de cada droga.

Droga	t_r (min)	λ_{max} (nm)
Morfina	0,50	285
Metilona	0,73	235
6AM	0,84	285
Mefedrona	1,03	260
BEG	1,84	235
Cocaína	1,88	235
MDPV	1,95	235
Cocaetileno	2,16	235
EDDP	2,51	260
Metadona	2,72	260

3.3.5. Diseño experimental. Diseño de screening asimétrico.

El uso de diseños experimentales permite la variación simultánea de importantes factores de extracción que influyen en MEPS, reduciendo el tiempo y el coste de la optimización. Para sistemas con un gran número de factores, se puede aplicar un diseño de cribado asimétrico para lograr un cribado de las variables potencialmente influyentes. Este estudio fue realizado con el diseño experimental $2^2 3^4 4^1 // 18$ que permite la evaluación de siete factores en dieciocho experimentos, dos factores en dos niveles, cuatro factores en tres niveles y un factor en cuatro niveles. Un diseño completo para siete factores requiere la realización de $2 \times 2 \times 3 \times 3 \times 3 \times 3 \times 4 = 1296$ experiencias, pero el diseño de cribado asimétrico reduce el número de experimentos. Los factores estudiados incluyen volumen de muestra (100, 300 µL), tiempo de secado del adsorbente (0,5, 2 min), volumen de lavado (50, 100, 200 µL), volumen de elución (50, 100, 500 µL), número de ciclos de extracción (2, 5, 10 strokes), fase (C8, C18, C8/SCX) y pH (7, 8, 9, 10). El modelo se define en la ecuación (3):

$$y = b_0 + b_{1/BA}x_{BA} \sum_{i=2}^{5} b_{i/BA}\, x_{BA} + b_{i/CA}x_{CA} + b_{i/CB}x_{CB} + b_{6/BA}x_{BA} + b_{6/CA}x_{CA} + b_{6/DA}x_{DA} + b_{6/CB}x_{CB} + b_{6/DB}x_{DB} + b_{6/DC}x_{DC} \quad (3)$$

donde: A = 1; B = 2; C = D = 4 (niveles de factor).

El modelo describe los efectos de reemplazar el nivel de un factor con respecto a otro en el MEPS (y = área de pico obtenida del análisis UPLC-PDA para cada droga). $\mathbf{x_{BA}}$ son variables de presencia/ausencia. El coeficiente $\mathbf{b_{3/21}}$ define el efecto diferencial de reemplazar un volumen de lavado de 50 µL por un volumen de 100 µL en el MEPS. De manera similar, $\mathbf{b_{3/31}}$ describe el efecto diferencial de reemplazar el volumen de lavado de 50 µL por un volumen de 200 µL y $\mathbf{b_{3/32}}$ describe el efecto de reemplazar el volumen de lavado de 100 µL por un volumen de 200 µL. El término constante $\mathbf{b_0}$ es la respuesta media para todas las series de experimentos. Se utilizó el software estadístico NemrodW® para la generación del diseño experimental, para la evaluación de los datos experimentales y para representar los efectos.

3.4. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN SALIVA MEDIANTE DLLME-UPLC-MS/MS.

3.4.1. Reactivos.

Morfina, 6-acetilmorfina, metadona, EDDP, buprenorfina, naloxona, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metilona, etilona, butilona, pirovalerona, metilendioxi-pirovalerona, pentedrona, mefedrona, etilcatinona, etilcatinona efedrina, metilefedrina, escopolamina, morfina D6, 6-acetilmorfina D3, metadona D9, EDDP-D3, buprenorfina D4, naloxona D5, cocaína D3, benzoilecgonina D8, cocaetileno D8, etilona D5, butilona D3, metilendioxipirovalerona D8, mefedrona D3, etilcatinona efedrina D5 y metilefedrina D3 se obtuvieron de Cerilliant (Round Rock, TX,USA). Acetonitrilo (grado LC-MS), metanol (grado LC-MS), acetona, isopropanol, cloroformo, tetracloruro de carbono, tetracloruro de etilo, clorobenceno, diclorometano, dicloroetano, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio e dihidrogeno fosfato potásico se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania). El agua purificada se obtuvo de un sistema de agua Milli Q de Millipore (Le Mont-sur-Lausane, Suiza). Las disoluciones madre individuales contenían 1 mg/mL de cada droga, las disoluciones de trabajo que contienen todas las drogas se realizaron por dilución sucesiva de las disoluciones madre en fase móvil y saliva. Todas las disoluciones se almacenaron refrigeradas a 4ºC.

3.4.2. Muestras de saliva.

Se obtuvieron muestras de saliva blanco de individuos sanos que no habían consumido drogas, y éstas se recogieron con ayuda de un dispositivo comercial Salivette® (Sarstedt, Alemania). A este fluido oral, libre de drogas, se le añadieron estándares para optimizar y validar el proceso DLLME. Se obtuvieron muestras reales de saliva de consumidores en proceso de desintoxicación y se almacenaron a 4°C o se congelaron a -20ºC, si se retrasaba el análisis. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con los Comités Autonómicos de Ética en la Investigación de Galicia y con los "*Principios éticos para la investigación médica implicando seres humanos*". [1]

3.4.3. Procedimiento de US-DLLME.

Se mezclaron 500 µL de fluido oral con 1,4 mL de metanol (precipitante y disolvente dispersante) y se centrifugó durante 5 minutos a 3500 rpm. A continuación, el sobrenadante se pasa a un tubo de DLLME y se agregan 1,5 mL de agua y 0,1 g de NaCl, el pH se ajusta a 8 y finalmente se añaden 200 µL de cloroformo (disolvente extractante), formando una disolución turbia. Se agita 5 minutos en un baño de ultrasonidos y se centrifuga durante 8 minutos a 3500 rpm. La gota depositada en el fondo del tubo cónico se recoge con una jeringa y se evapora a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 40ºC. La fase sedimentada o extracto seco se reconstituyó en 50 µL de fase móvil y finalmente se inyectaron 5 µL en el sistema UPLC-MS/MS (Figura 37).

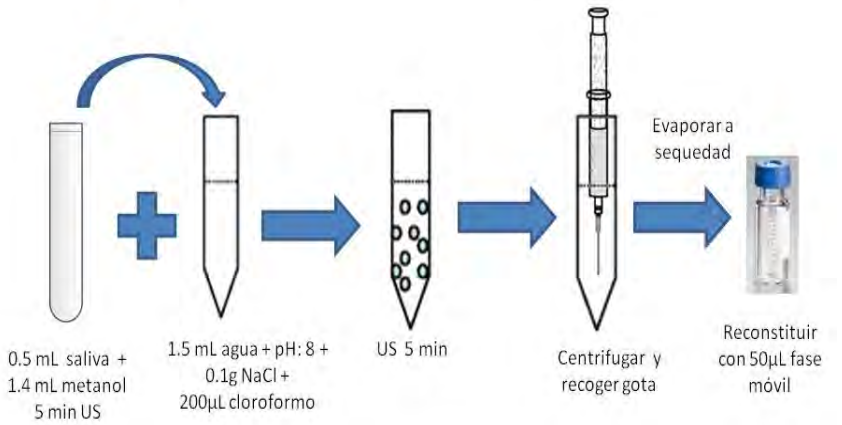


Figura 37: Procedimiento de DLLME para la extracción de drogas en saliva.

3.4.4. Condiciones de UPLC-MS/MS.

Para el análisis cromatográfico se utilizó un equipo Acquity UPLC H-Class acoplado a un Xevo TQD de Waters® (Milford, MA, USA). La columna era una Acquity UPLC TM BEH Shield RP18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm). La adquisición de datos se hizo con el software MassLynx V4.1, con proceso de datos automatizado, usando el software QuanLynx (Waters). La elución en gradiente se realizó con fase móvil A (ácido fórmico al 0,1% en agua) y B (ácido fórmico al

0,1% en acetonitrilo) a un flujo de 0,4 mL/min y a una temperatura de columna de 55ºC. El gradiente es: 0 min, 10% de B, se mantiene durante 0,2 min, se incrementa hasta el 70% de B a los 3,5 min y finalmente, a los 4 min se devuelve a las condiciones iniciales, que se mantienen durante 1 minuto.

Los parámetros optimizados de MS fueron los siguientes: el voltaje capilar se ajustó a 0,6 kV, la temperatura de la fuente fue de 120ºC, el caudal de gas del nebulizador fue de 50 L/h y el caudal del gas de secado fue de 1100 L/h. La temperatura del gas de secado fue de 500°C. El detector funcionaba en el modo de Monitorización de Reacción Múltiple (MRM) usando ionización positiva. Las transiciones específicas de MRM, las energías de colisión y el voltaje del cono se determinaron mediante el análisis de los estándares individuales a una concentración de 1 μg/mL. Los tiempos de retención (t_r), las transiciones de MRM, el voltaje del cono, la energía de colisión y el estándar interno correspondiente para cada compuesto se resumen en la Tabla 17.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 17: Parámetros de UPLC-MS/MS.

Droga	t_r (min)	CV (V)	$Q_1>Q_2$	CE (eV)	$Q_1>Q_3$	CE (eV)	IS
Morfina	0,61	55	286,00>201,04	24	286,00>165,00	38	Morfina D6
Naloxona	0,80	35	328,37>310,08	18	328,37>212,00	36	Naloxona D5
Metilona	0,86	30	207,93>159,95	16	207,93>190,01	12	Butilona D3
Etilcatinona efedrina	0,88	24	181,99>164,05	10	181,99>148,95	20	Etilcat efedrina D3
Flefedrona	0,89	26	181,99>164,05	10	181,99>148,95	20	MDPV D8
Etilcatinona	0,89	28	178,02>160,07	12	178,02>131,84	16	Etilona D5
Escopolamina	0,92	40	304,00>138,00	22	304,00>102,94	38	Naloxona D5
Etilona	1,01	55	222,14>174,10	16	222,14>204,02	12	Etilona D5
6AM	1,02	30	328,00>165,00	40	328,00>211,01	26	6AM D3
Metilefedrina	1,17	22	180,04>162,09	14	180,4>91,04	26	Metilefedrina D3
Butilona	1,20	30	222,01>174,11	16	222,01>201,04	12	Butilona D3
Mefedrona	1,23	25	177,96>159,95	12	177,96>144,93	20	Mefedrona D3
Pentedrona	1,71	28	192,16>174,10	12	192,16>131,88	18	MDPV D8
BEG	2,05	42	299,00>168,13	18	299,00>105,02	26	BEG D8
Cocaína	2,14	40	304,00>182,00	20	304,00>82,00	30	Cocaína D3
MDPV	2,19	40	276,06>126,08	26	276,06>175,04	22	MDPV D8

COCET	2,40	12	318,00>196,09	20	318,00>82,05	32	COCET D8
Pirovalerona	2,45	35	246,15>104,96	24	246,15>175,02	18	MDPV D8
EDDP	2,74	50	278,09>234,06	30	278,09>249,06	22	EDDP D3
Buprenorfina	2,78	60	468,34>54,35	48	468,34>55,06	46	Buprenorfina D4
Metadona	2,94	33	310,00>104,96	30	310,00>265,00	15	Metadona D9
Morfina D6	0,61		292,20>152,10		292,20>63,97		---
Naloxona D5	0,80	36	333,19>315,18	18	333,19>212,09	38	---
Etilcat efedrina D3	0,95		185,07>167,13		185,07>117,08		---
Etilona D5	1,01		227,07>179,04		227,07>209,02		---
6AM D3	1,02		331,39>165,05		331,39>211,03		---
Metilefedrina D3	1,17		183,52>165,19		183,52>91,03		---
Butilona D3	1,20		225,10>177,12		225,10>207,04		---
Mefedrona D3	1,23		181,07>163,06		181,07>148,04		---
BEG D8	2,05		298,22>171,05		298,22>109,90		---
Cocaína D3	2,14		306,37>104,96		306,37>85,05		---
COCET D8	2,19		326,14>204,08		326,14>85,04		---
MDPV D8	2,40		284,18>175,09		284,18>134,42		---
EDDP D3	2,74		281,22>234,10		281,22>249,12		---
Buprenorfina D4	2,78		472,35>59,02		472,35>101,04		---
Metadona D9	2,94		319,21>268,10		319,21>104,89		---

3.4.5. Diseño experimental.

Se utilizó el software estadístico NemrodW® para generar el diseño experimental, evaluar los datos y representar gráficamente los efectos y las superficies de respuesta.

Primero, se utilizó un diseño factorial asimétrico o de nivel mixto ($2^1 3^4 4^1$//18) para seleccionar seis variables a diferentes niveles. El diseño factorial completo consiste en todas las combinaciones posibles de los niveles de factores; es decir, 2 × 3 × 3 × 3 × 3 × 4 = 648 experimentos ejecutados. En este diseño de cribado asimétrico, se estudiaron todos los niveles con solo 18 experimentos. Se estudió un factor en dos niveles, cuatro factores en tres niveles y un factor en cuatro niveles. Las variables estudiadas fueron las siguientes: $\mathbf{b_1}$ volumen de muestra (0,25 y 0,50 mL); $\mathbf{b_2}$ volumen de dispersante (0,5, 1 y 2 ml); $\mathbf{b_3}$ volumen de extractante (50; 100 y 200 µL); $\mathbf{b_4}$ tiempo de US (1, 3 y 5 min); $\mathbf{b_5}$ NaCl (0, 0,1 y 0,2 g); y $\mathbf{b_6}$ pH (7, 8, 9 y 10).

Las respuestas del diseño, como **y** = área de pico para cada droga, se obtuvieron a partir del análisis UPLC-MS/MS de la mezcla de las 20 drogas. Se supone que la respuesta "**y**" está relacionada con los cinco factores, de acuerdo con el siguiente modelo (4):

$$y = b_0 + b_{1/BA}x_{BA}\sum_{i=2}^{5} b_{i/BA}\,x_{BA} + b_{i/CA}x_{CA} + b_{i/CB}x_{CB} + b_{6/BA}x_{BA} + b_{6/CA}x_{CA} + b_{6/DA}x_{DA} + b_{6/CB}x_{CB} + b_{6/DB}x_{DB} + b_{6/DC}x_{DC} \quad (4)$$

donde A = 1; B = 2; C = 3; D = 4 (niveles de factor)

El modelo describe los efectos sobre la DLLME cuando se reemplaza el nivel de un factor por otro**.** Los términos $\mathbf{x_{BA}}$ son variables presencia-ausencia. El coeficiente $\mathbf{b_{1/21}}$ define el efecto diferencial en la DLLME de las drogas al reemplazar 0,5 mL por 0,25 mL de volumen de muestra. El término constante $\mathbf{b_0}$ es la respuesta media para todas las ejecuciones experimentales.

De acuerdo con los resultados del diseño de screening, se aplicó un diseño de superficie de respuesta, denominado diseño Doehlert, para evaluar dos factores (volumen de dispersante y pH) en 9

experimentos. Este diseño experimental es adecuado para la exploración de la superficie de respuesta cuadrática y la construcción de un modelo polinomial de segundo orden (5):

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^{2} b_i x_i + \sum_{i=1}^{2} b_{ii} x_{ii}^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=1}^{2} b_{ij} x_{ij} \quad (5)$$

donde **y** es la función de respuesta calculada (el área del pico obtenida del análisis UPLC-MS/MS para cada droga), $\mathbf{x_i}$ representa los factores y $\mathbf{b_0}$, $\mathbf{b_i}$, $\mathbf{b_{ii}}$, $\mathbf{b_{ij}}$ son los coeficientes estimados. El término constante $\mathbf{b_0}$ es la respuesta media para todas las ejecuciones experimentales. Este diseño para dos factores consiste en los seis vértices de un hexágono con tres puntos centrales, que requieren nueve experiencias. A diferencia de otros diseños de superficie de respuesta, los factores se variaron en diferentes números de niveles (uno a tres y uno a cinco niveles en el diseño de dos factores). Se evaluaron volúmenes de dispersante entre 0,5 y 2,5 ml y valores de pH entre 6 y 10. Las funciones de deseabilidad, basadas en las funciones parciales de Derringer, se incluyeron en la metodología de diseño experimental para encontrar las condiciones óptimas de compromiso para que cada una de las respuestas esté dentro de un rango aceptable. Cada respuesta se transformó en una función de deseabilidad parcial sin dimensiones, $\mathbf{d_i}$, que varía de 0 (respuesta no deseada) a 1 (respuesta óptima), sin experimentos adicionales. La función objetivo general **D** que representa la función de deseabilidad global se define como el promedio geométrico ponderado de **n** funciones de deseabilidad individuales.

Referencia

[1] World Medical Association. Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. JAMA – J. Am. Med. Assoc. 2013; 310: 2191-2194. https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETERMINACIÓN DE BENZODIAZEPINAS EN ORINA Y AGUAS RESIDUALES DE HOSPITALES MEDIANTE US-DLLME - UPLC-PDA.

Las benzodiazepinas (BZD) son los hipnosedantes más prescritos en los países europeos [1]. Están asociadas a efectos adversos, como la adicción debida al uso continuado, las intoxicaciones solo por benzodiazepinas o asociadas con alcohol y/o otras drogas [2], y su abuso que se está convirtiendo en un grave problema de salud pública. Además, la presencia de productos farmacéuticos psiquiátricos en las matrices ambientales y su alta persistencia justifica su clasificación como contaminantes ambientales emergentes.[3] Por lo tanto, se requieren métodos analíticos confiables y rápidos para el control de BZD de manera simultánea y eficiente en muestras biológicas en escenarios clínicos y forenses. [4, 5] Los productos farmacéuticos podrían considerarse contaminantes ambientales activos ya que están presentes en las aguas residuales y, en la mayoría de los casos, deben eliminarse para evitar posibles rutas de exposición humana y ambiental. [6]

El análisis directo por cromatografía líquida (LC) sin derivatización se puede aplicar para compuestos hidrofílicos, termolábiles y no volátiles. En este sentido, se han desarrollado varios métodos para el análisis de BZD utilizando diferentes detectores, con espectrometría de masas (MS) [7–12] detección ultravioleta (UV) [5,13–16] o detección de matriz de fotodiodos (PDA). [1, 4, 17–20]

La etapa de preparación de la muestra es crítica y ocupa una parte importante del tiempo total de análisis. Existen numerosos métodos de preparación de muestras para el análisis de BZD en matrices de muestras complejas. La extracción líquido-líquido (LLE) [9–12], la extracción en fase sólida (SPE) [2, 4, 5, 14] y extracción asistida por microondas (MAE) [17] han sido notificadas para la extracción de BZD en cabello y fluidos biológicos. Un método de preconcentración basado en SPE es la opción más habitual para la extracción de estos

compuestos en el medio ambiente acuático. [3, 21, 22] Estas técnicas convencionales de preparación de muestras consumen mucho tiempo y disolventes orgánicos, por lo que se requieren procedimientos más rápidos y simples en el campo del análisis forense. El uso de técnicas de microextracción, como la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) parece una alternativa atractiva. [23] En DLLME, la mezcla de una muestra acuosa que contiene analitos con un disolvente de extracción (que no es miscible con agua) y un disolvente dispersivo (que es miscible tanto en agua como en el disolvente de extracción) forma una dispersión turbia en la que tiene lugar la división de los analitos entre las dos fases líquidas. Esta técnica de extracción se ha utilizado en bioanálisis, para la cuantificación de antidepresivos tricíclicos [24], inhibidores de zonisamida y carbamazepina [25], y fosfodiesterasa-5 (PDE-5) [26] en varias muestras biológicas, utilizando principalmente métodos de cromatografía líquida. También se han publicado métodos para la determinación de BZDs [21] en plasma, 7-aminoflunitrazepam [27], oxazepam, alprazolam y diazepam [28] en orina.

La microextracción líquido líquido dispersiva ha sido utilizada para el estudio de diversas sustancias contenidas en diferentes fluidos biológicos [23-27].

El objetivo de este trabajo ha sido la optimización, validación y posterior aplicación de un método de microextracción líquido líquido dispersiva asistida por ultrasonidos (US-DLLME) y de un método de cromatografía líquida de ultra eficacia (UPLC) para la separación y determinación simultaneas de siete benzodiazepinas (BZD) ampliamente usadas (alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam, lorazepam, lormetazepam y tetrazepam) en muestras de orina y aguas residuales. Las condiciones del proceso US-DLLME optimizado fue el siguiente: se mezclan 0,2 g de sal, 0,5 mL de muestra (pH: 9) y se inyecta rápidamente la mezcla dispersante + extractante (16 mL de acetona y 160 µL de cloroformo); después, la mezcla se coloca en un baño de ultrasonidos durante 4,5 minutos, se centrifuga y finalmente se extrae la gota formada en el fondo del tubo.

Para la determinación y cuantificación de estas sustancias, se utiliza la cromatografía líquida de ultra eficacia acoplada a un detector de serie de diodos, que permite obtener resultados satisfactorios de separación en 4 minutos, tanto en agua como en orina. Todos los estudios fueron realizados de acuerdo con los principios éticos para investigación biomédica en humanos [29].

El método ha sido aplicado para la determinación de las BZD estudiadas en 30 muestras de orina y 30 muestras de aguas residuales obteniendo en orina algún positivo a todas las benzodiazepinas, excepto para tetrazepam, y en agua se encontró bromazepam, alprazolam y lormetazepam. Alprazolam fue la BZD más detectada en ambos tipos de muestras.

4.1.1. Optimización de la US-DLLME.

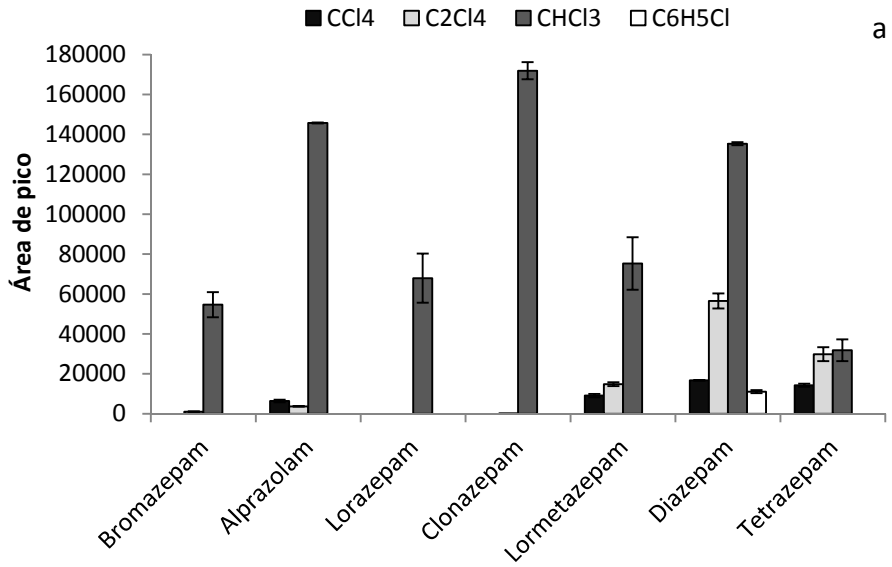
De acuerdo con las características requeridas para los disolventes de extracción usados en US-DLLME, tales como mayor densidad que el agua, bajo punto de fusión, baja hidrosolubilidad y alta capacidad de extracción de compuestos diana [23], se han probado seis disolventes [20]: cloroformo ($CHCl_3$), tetracloruro de carbono (CCl_4), tetracloroetileno (C_2Cl_4), diclorometano (CH_2Cl_2), dicloroetano ($C_2H_4Cl_2$) y clorobenceno (C_6H_5Cl). Las condiciones generales utilizadas en este experimento fueron las siguientes: una alícuota de 0,5 mL de orina conteniendo las BZD (2 µg/mL) se diluyó con 4,5 mL de agua (pH 11,7) en un tubo cónico. Después se añadieron 3 mL de disolvente dispersante (acetonitrilo) y 200 µL de disolvente extractante, y la mezcla se sometió a ultrasonidos durante 4 minutos para obtener la cantidad apropiada de la fase sedimentada en el fondo del tubo cónico. Con el dicloroetano y el diclorometano no se formó la gota debido a su solubilidad en agua (0,81% y 1,6%, respectivamente). De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 38a, el $CHCl_3$ mostró la mayor respuesta de extracción. En consecuencia, se seleccionó el cloroformo como disolvente de extracción.

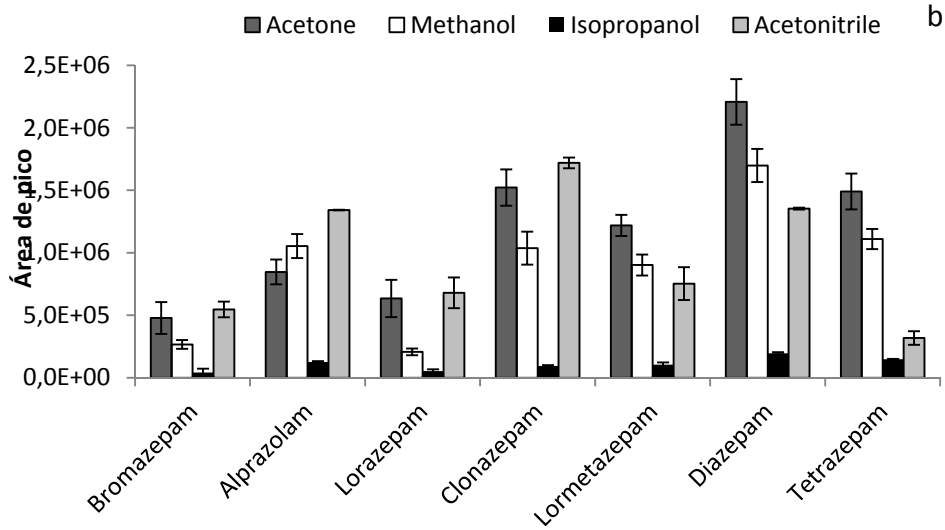
La selección del disolvente dispersante se basó en su miscibilidad con la fase acuosa y el disolvente extractante para permitir la formación de una dispersión turbia cuando el extractante se inyecta en

la muestra acuosa. Para estudiar la eficacia de la extracción, se probaron acetona, metanol, isopropanol y acetonitrilo. Las condiciones iniciales para este ensayo fueron 3 mL de disolvente dispersante, 200 µL de cloroformo (como disolvente extractante), pH 11,7 y 4 minutos de ultrasonidos. La extracción fue muy baja cuando se usó isopropanol. Como se muestra en la Figura 38b, los mejores resultados se obtuvieron cuando se usó acetonitrilo o acetona. Sin embargo, la disolución turbia (agua, dispersante y extractante) fue menos estable con acetonitrilo y la fase sedimentada era menos favorecida. Por esta razón, se seleccionó acetona como disolvente dispersante.

La influencia del volumen de disolvente dispersante sobre el rendimiento de la US-DLLME se investigó utilizando diferentes volúmenes de acetona (0,5; 1; 1,5; 2 y 3 mL). Como se muestra en la Figura 38c, a un volumen bajo de acetona, la disolución turbia no está bien formada y la respuesta de extracción disminuye. Con un volumen de acetona superior a 1,5 mL, aumenta la solubilidad de las BZD en la fase acuosa, por lo tanto, los resultados de la extracción también son menores. En consecuencia, se usaron 1,5 mL de acetona.

La adición de cloruro sódico (NaCl) a muestras de orina puede aumentar la eficiencia de la extracción [19, 24, 26]. Los estudios en plasma demostraron la influencia de la fuerza iónica sobre el rendimiento de UA-DLLME, mejorando la extracción cuando se aumenta la concentración de sal hasta un 4% (0,2 g). Para investigar la influencia de la fuerza iónica en la extracción de muestras de orina, se realizaron experimentos en presencia (0,2 g) y ausencia de NaCl. Como se observa en la Figura 38d, los resultados muestran un efecto positivo en la respuesta de extracción con la adición de NaCl.


CCl4
C2Cl4
CHCl3
C6H5Cl
a
Área de pico
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
Bromazepam
Alprazolam
Lorazepam
Clonazepam
Lormetazepam
Diazepam
Tetrazepam


Acetone
Methanol
Isopropanol
Acetonitrile
b
Área de pico
2,5E+06
2,0E+06
1,5E+06
1,0E+06
5,0E+05
0,0E+00
Bromazepam
Alprazolam
Lorazepam
Clonazepam
Lormetazepam
Diazepam
Tetrazepam

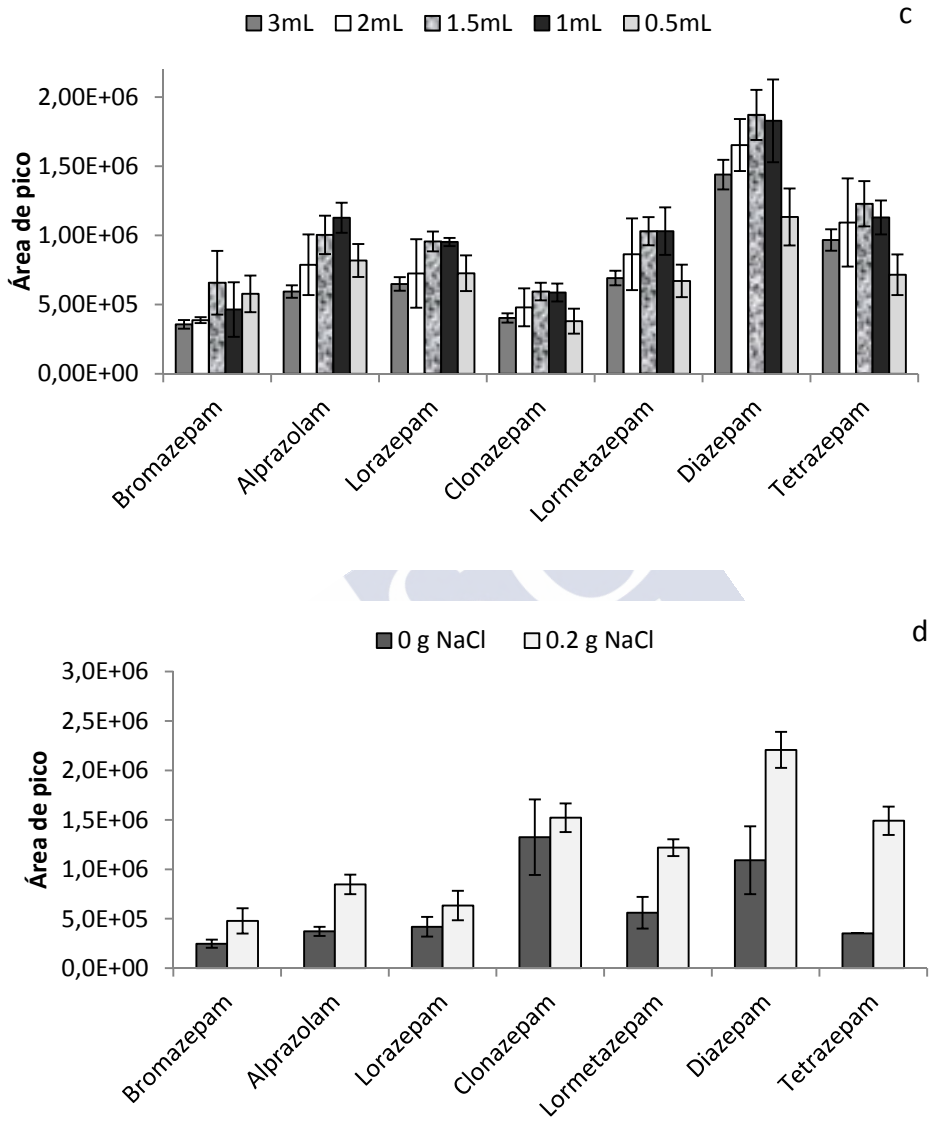


Figura 38: Variables optimizadas para el procedimiento DLLME. (a) Efecto de los disolventes extractantes, (b) Efecto de los disolventes dispersantes, (c) Efecto del volumen de disolvente dispersante (acetona) y (d) Efecto de la adición de sal.

De acuerdo con estudios previos, la transferencia de analitos desde la fase acuosa de la muestra a la fase orgánica de extracción es rápida debido al área interfacial extremadamente grande. En este trabajo, se evaluaron la agitación manual (1 minuto) y mediante ultrasonidos (de 1 a 4 minutos). La eficacia de extracción fue mayor, especialmente para clonazepam, alprazolam y lormetazepam, cuando se usó la agitación mediante ultrasonidos durante 4 minutos. Se espera que el pH de la muestra tenga un impacto significativo en la extracción de BZD porque determina que el estado iónico de los analitos y las condiciones alcalinas sean las convenientes [20].

Para obtener las mejores condiciones operacionales de US-DLLME, el efecto del volumen de disolvente de extracción (80, 140 y 200 mL), el tiempo de agitación ultrasónica (0,2; 1,4; 2,5; 3,6 y 4,8 min) y el pH (8,4; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5; 11,0 y 11,6) fueron evaluados simultáneamente, mediante un diseño Doehlert [31] que incluye 15 experimentos, con tres réplicas en el punto central del dominio experimental (Tabla 18). Los experimentos se llevaron a cabo usando 0,5 mL de orina, adicionada a una concentración 2 µg/mL de BZD, diluida en 4,5 mL de agua y 1,5 mL de acetona.

Tabla 18. Plan de experimentación del Diseño Doehlert (BZD en orina y aguas).

N°Exp	Rand	Tiempo US (min)	pH	Vol cloroformo (µL)
1	15	4,8	10,0	140
2	13	0,2	10,0	140
3	12	3,6	11,6	140
4	11	1,4	8,4	140
5	4	3,6	8,4	140
6	2	1,4	11,6	140
7	5	3,6	10,5	200
8	8	1,4	9,5	80
9	14	3,6	9,5	80
10	7	2,5	11,0	80
11	9	1,4	10,5	200
12	3	2,5	9,0	200
13	6	2,5	10,0	140
14	1	2,5	10,0	140
15	10	2,5	10,0	140

Los resultados indican que el efecto del factor pH (b_2) presentó significación estadística con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$) para lormetazepam y diazepam, con mejores respuestas a niveles de pH bajos o medios, mientras que el efecto cuadrático de pH (b_{22}) ($p < 0,01$) también fue estadísticamente significativo para alprazolam, lorazepam, lormetazepam y diazepam. Un nivel medio de volumen de cloroformo y un alto nivel de tiempo de ultrasonidos proporcionaron las mejores respuestas para la mayoría de las BZD. Se muestran a continuación (Figura 39) algunas representaciones tridimensionales que reflejan la influencia de los factores sobre la respuesta obtenida para los compuestos.

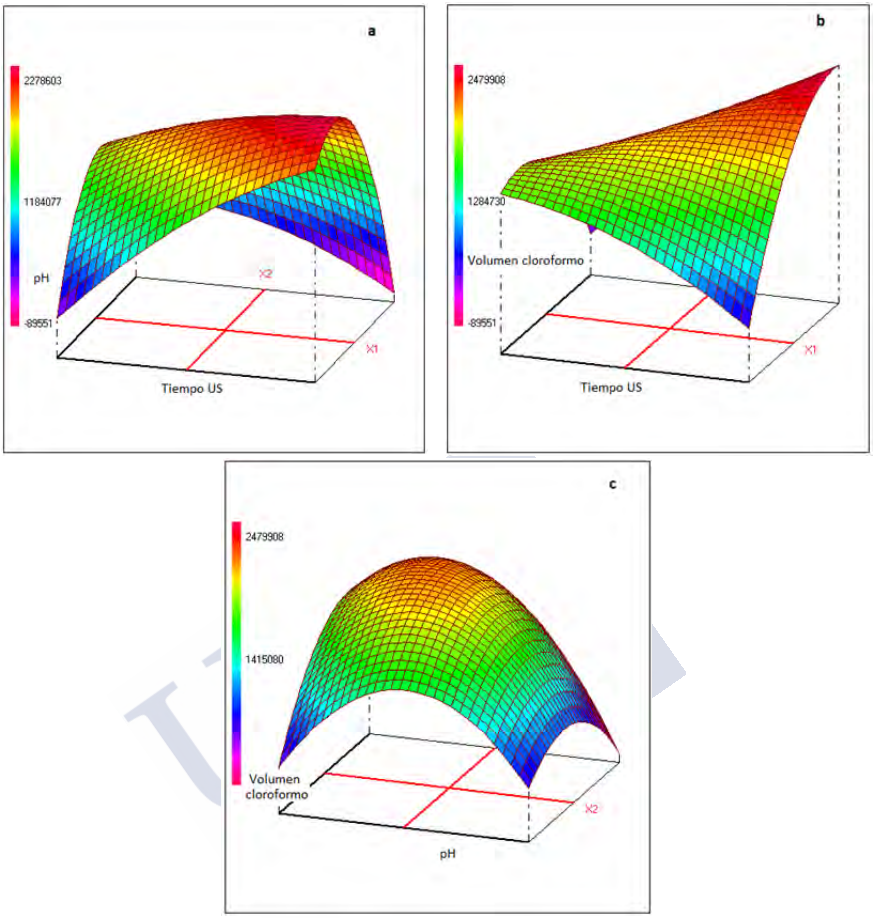


Figura 39: Superficies de repuesta (a) del pH frente al tiempo de agitación en el US, (b) volumen de disolvente frente a tiempo de agitación en el US y (c) y volumen de cloroformo frente a pH para el diazepam.

Para encontrar las mejores condiciones de compromiso, se aplicó una optimización multicriterio, basada en funciones de deseabilidad [30], sin experimentación adicional. [31] Las respuestas se transformaron utilizando una escala de deseabilidad adimensional (d_i), que varió entre d = 0 para una respuesta completamente indeseable y d = 1 para una respuesta completamente deseada. Se maximizó la deseabilidad global (D) que combina la deseabilidad individual (d_i) de

todas las variables de respuesta en una sola medida. Las representaciones bidimensionales de la isodeseabilidad se muestran en la Figura 40, donde las regiones en gris corresponden a valores nulos de deseabilidad cuando los niveles del factor no fueron adecuados. La flecha muestra la región correspondiente a las condiciones óptimas (D= 0,967), las cuales resultaron ser: 160 mL de cloroformo, pH 9 y agitación con ultrasonidos durante 4,5 minutos.

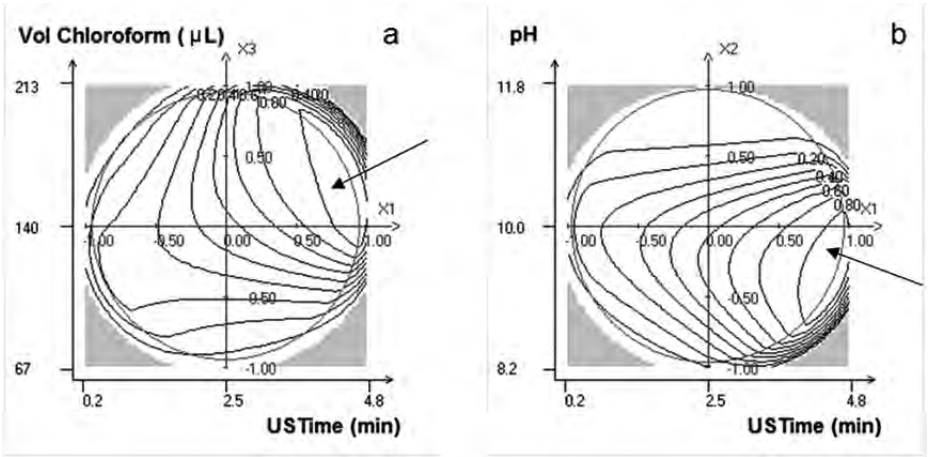


Figura 40: Superficies de respuesta de la deseabilidad global obtenidas mediante un diseño Doehlert, (a) en función del volumen de cloroformo y el tiempo de ultrasonidos, con pH 9,5 fijo, (b) pH y tiempo de ultrasonidos, con volumen de cloroformo fijado a 140 mL.

4.1.2. Validación del método analítico.

La linealidad del método US-DLLME-UPLC-PDA se evaluó en muestras blanco, a las que se añadieron niveles de concentración en los rangos de 10 a 5000 ng/mL para orina y de 0,5 a 50 ng/mL para aguas residuales procedentes de hospital y plantas de tratamiento de aguas residuales (WWTP), usando tres repeticiones por nivel. Las matrices de muestras complejas utilizadas no interferían con los analitos de interés, por lo tanto, el método propuesto se consideró suficientemente selectivo para la determinación de BZD. Los coeficientes de determinación (r^2) que varían de 0,994 a 1,000

indicaron una excelente linealidad para todas las BZD (Tabla 19). Los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ) se calcularon en el nivel de concentración más bajo para una relación señal / ruido (S/N) de 3 y 10, respectivamente. Como se puede ver en la Tabla 19, los LOQ varían entre 1,8 y 7,4 ng/mL y entre 0,07 y 0,42 ng/mL para orina y aguas residuales (influente y efluente de la EDAR), respectivamente.

Tabla 19: Datos de linealidad (n=3) y LOD y LOQ (ng/mL) para las BZD estudiadas.

Analito	Orina			WWTP influente			WWTP efluente		
	r^2	LOD*	LOQ*	r^2	LOD*	LOQ*	r^2	LOD*	LOQ*
Bromazepam	0,999	2,9	3,9	0,998	0,12	0,42	0,996	0,10	0,36
Alprazolam	0,999	4,7	5,3	0,998	0,05	0,15	0,994	0,02	0,07
Lorazepam	1	6,2	6,8	0,999	0,04	0,14	0,997	0,04	0,15
Clonazepam	0,999	0,6	1,8	0,999	0,04	0,13	0,998	0,10	0,36
Lormetazepam	1	3,8	5,1	0,999	0,03	0,09	0,999	0,08	0,29
Diazepam	0,999	2,7	4,6	0,997	0,02	0,05	0,997	0,02	0,07
Tetrazepam	0,999	4,5	7,4	0,999	0,10	0,35	0,997	0,06	0,21

*ng/mL

La precisión del método se evaluó analizando nueve muestras repetidas en un día (precisión intradía) y en tres días consecutivos (precisión interdía), y se expresó como desviación estándar relativa (%RSD). Se estudiaron muestras de orina a dos niveles de adición de 0,5 y 5 µg/mL, y aguas residuales en tres niveles de adición de 0,5, 5 y 25 ng/mL (Tabla 20). El método mostró una buena precisión intradía e interdía con valores de RSD que varían desde 4,3 a 10,4% para orina, desde 2,0 a 13,7% para el influente, y desde 3,1 a 14,1% para el efluente de aguas residuales.

Tabla 20: Estudio de precisión (% RSD) para muestras de orina y aguas residuales (n=9).

	Orina				WWTP influente						WWTP efluente					
	Intradía[a]		Interdía[a]		Intradía[b]			Interdía[b]			Intradía[b]			Interdía[b]		
	0,5	5	0,5	5	0,5	5	25	0,5	5	25	0,5	5	25	0,5	5	25
Broma	4,3	5,9	4,8	5,0	9,8	4,5	5,3	11,5	8,5	5,6	11,8	7,9	5,6	13,2	12,6	11,3
Alpra	4,9	9,0	9,9	8,8	5,1	12,0	2,0	12,6	12,8	7,5	5,3	13,6	9,3	12,9	10,1	7,4
Lora	4,6	5,6	7,5	5,8	10,0	11,5	11,9	10,4	8,1	4,8	9,3	8,9	13,4	13,6	10,8	7,8
Clona	5,4	5,9	7,4	5,1	12,2	8,9	7,0	3,8	13,5	4,7	12,9	11,7	10,1	3,8	12,4	9,2
Lormet	8,8	9,8	9,1	8,4	8,5	10,9	8,4	13,7	4,3	4,8	14,1	6,9	8,7	12,8	8,3	8,0
Dia	8,1	10,4	9,1	8,9	9,0	13,3	8,6	9,2	7,3	5,4	7,5	3,1	13,2	8,8	12,5	9,2
Tetra	9,7	9,4	9,8	8,5	7,7	6,9	8,1	6,3	11,0	6,7	12,3	4,4	7,0	7,3	9,9	12,5

[a] µg/mL, [b] ng/mL

La exactitud se evaluó en términos de recuperación para cada BZD en las muestras sometidas al método completo (UA-DLLME-UPLC-PDA), tanto en orina como en agua residual (influente y efluente de la WWTP) (Tabla 21). Los valores de recuperación se calcularon a dos niveles de concentración en orina y a tres niveles de concentración en aguas residuales (n=12). Los resultados medios estuvieron en los rangos de 96-114%, 81-121% y 87-124%, para orina, influente de WWTP y efluente de WWTP, respectivamente. El presente método ofrece ventajas sobre otros métodos, el procedimiento de extracción es muy simple y la preparación de la muestra consume menos tiempo y disolventes que las técnicas convencionales. Los LODs y LOQs, la precisión y las recuperaciones son comparables o mejores que los resultados obtenidos por detectores de espectrometría de masas [32, 33].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 21: Estudio de la recuperación (%) en orina y aguas residuales para las BZD estudiadas (n=9).

Analito	Orina		WWTP influente			WWTP efluente		
	0,5 [a]	5 [a]	0,5 [b]	5 [b]	25 [b]	0,5 [b]	5 [b]	25 [b]
Bromazepam	98±4	96±5	121±8	115±6	110±7	93±8	124±12	100±5
Alprazolam	114±12	109±10	109±1	93±2	88±17	117±16	114±10	110±15
Lorazepam	113±9	106±5	93±5	109±8	103±14	114±15	91±6	99±5
Clonazepam	103±8	102±5	109±8	90±9	81±13	92±15	100±5	98±5
Lormetazepam	114±11	99±8	90±9	104±1	89±14	107±11	87±4	100±5
Diazepam	107±9	99±9	95±3	95±3	92±14	90±8	108±6	102±5
Tetrazepam	108±10	103±9	99±4	99±4	87±14	91±9	91±9	106±6

[a] µg/mL [b] ng/mL

4.1.3. Aplicación del método a muestras de orina y aguas residuales.

Para completar el procedimiento de validación y demostrar la aplicabilidad de la metodología optimizada, treinta muestras de orina, los efluentes de aguas residuales de un hospital y los influentes y efluentes de aguas residuales de WWTP se analizaron por duplicado cuantificándose mediante el método de adición estándar.

Un resumen de los niveles encontrados para las BZD en 30 muestras de orina humana y 30 muestras de aguas residuales se muestra en la Tabla 22 y la Figura 41. Se evidenció la presencia de BZD en las muestras analizadas.

Tabla 22: Concentración de BZD encontradas en muestras de orina humana (µg/mL) y aguas residuales de un hospital (ng/mL). (Freq.: Número de muestras positivas)

Muestras de orina	Broma	Alpra	Lora	Clona	Lormet	Dia	Tetra
1	n.d.	0,08	n.d.	n.d.	0,19	n.d.	n.d.
2	n.d.	0,21	n.d.	n.d.	1,01	n.d.	n.d.
3	n.d.	0,31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,30	n.d.	n.d.
5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,31	n.d.	n.d.
6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,39	n.d.	n.d.
7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,04	n.d.	n.d.
8	n.d.	1,69	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
9	n.d.	n.d.	0,03	0,33	n.d.	n.d.	n.d.
10	n.d.	0,26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
11	n.d.	0,15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12	n.d.	0,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13	n.d.	0,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
14	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ	n.d.	n.d.
15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,07	n.d.
16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,08	n.d.
17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.20	n.d.	n.d.
18	0,10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

19	0,08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,04	n.d.	n.d.
22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,17	n.d.	n.d.
23	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
24	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
Freq.	**2/30**	**10/30**	**1/30**	**3/30**	**9/30**	**4/30**	**0/30**
Muestras de agua residual	**Broma**	**Alpra**	**Lora**	**Clona**	**Lormet**	**Dia**	**Tetra**
1	n.d.	6,40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	6,68	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	n.d.	1,97	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	n.d.	1,14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	2,90	3,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	n.d.	1,35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7	3,71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8	1,40	7,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
9	1,31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,80	n.d.	n.d.
Freq.	**4/30**	**8/30**	**0/30**	**0/30**	**1/30**	**0/30**	**0/30**

n.d. =no detectado

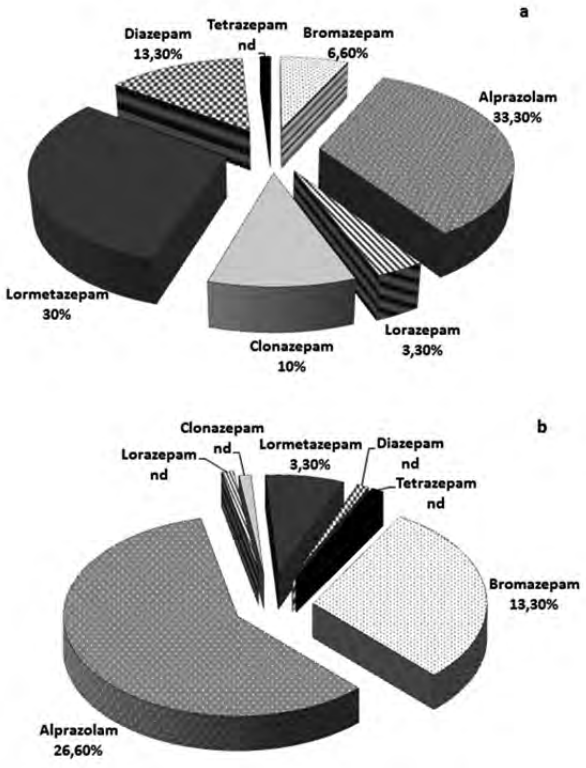


Figura 41: Distribución de las benzodiazepinas encontradas en: [a] 30 muestras de orina humana y [b] 30 muestras de aguas residuales.

Se detectaron una o más BZD en 26 de las 30 muestras de orina. No se detectó tetrazepam en ninguno de los casos, resultado coherente con el hecho de que el fármaco está actualmente retirado del mercado, debido a sus efectos secundarios. Los niveles de los compuestos diana encontrados en las muestras de orina estaban en el rango de 0,08-0,10 µg/mL para bromazepam, 0,08-1,69 µg/mL para alprazolam, 0,04-0,39 µg/mL para lormetazepam y 0,07-0,08 µg/mL para diazepam. Se detectaron dos BZD en tres muestras (casos 1, 2 y 9). Un caso fue positivo para lorazepam y clonazepam con una concentración de 0,28 µg/mL y 0,33 µg/mL, respectivamente. Otros dos casos fueron positivos para alprazolam y lormetazepam. La Figura 42a refleja el

cromatograma de una muestra de orina con el código 2 de la Tabla 22 (que contiene alprazolam y lormetazepam). En el caso de la orina con el código 8 de la Tabla 22, la concentración de alprazolam encontrada concuerda con los niveles letales proporcionados para la orina. En la Figura 49b se puede ver un cromatograma de una muestra de un agua residual de un hospital con el código 2 (que contiene alprazolam). Bromazepam y alprazolam fueron las BZD más comunes detectadas en aguas residuales de origen hospitalario; sus concentraciones variaban entre 1,31 y 3,71 ng/mL para el bromazepam y entre 1,14 y 6,68 ng/mL para el alprazolam. Una muestra de agua residual fue positiva para lormetazepam, con una concentración de 1,80 ng/mL.

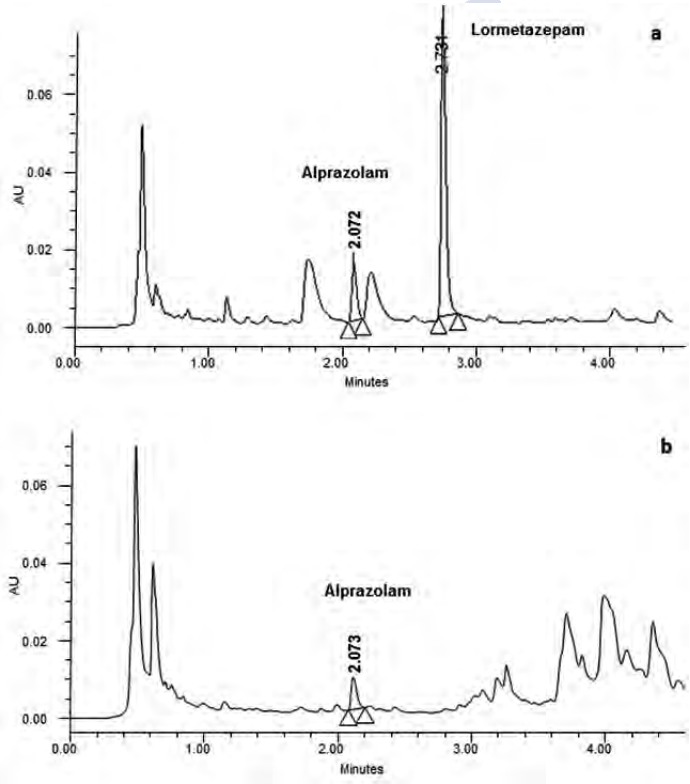


Figura 42: Cromatogramas de: (a) la muestra de orina (código 2, Tabla 22) que contiene 0,21 µg/mL de alprazolam y 1,01 µg/mL de lormetazepam y (b) la muestra de agua residual del hospital (código 2, Tabla 22) que contiene 6,68 ng/mL de alprazolam.

4.1.4. Bibliografía.

[1] Samanidou VF, Pechlivanidou AP, Papadoyannis IN. "Development of a validated HPLC method for the determination of four 1,4-benzodiazepines in human biological fluids" J. Sep. Sci. 2007; 30: 679-687.

[2] Cabarcos P, Tabernero MJ, Álvarez I, López P, Fernández P, Bermejo AM. "Analysis of six benzodiazepines in vitreous humor by high-performance liquid chromatography-photodiode-array detection" J. Anal. Toxicol. 2010; 34: 539-542.

[3] Yuan S, Jiang X, Xia X, Zhang H, Zheng S. "Detection, occurrence and fate of 22 psychiatric pharmaceuticals in psychiatric hospital and municipal wastewater treatment plants in Beijing, China" Chemosphere 2013; 90: 2520-2525.

[4] Fernández P, Vázquez C, Lorenzo RA, Carro AM, Bermejo AM. "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.

[5] Bastos Borges K, Figueiredo Freire E, Martins I, Pereira Bastos de Siqueira ME. "Simultaneous determination of multibenzodiazepines by HPLC/UV: Investigation of liquid-liquid and solid-phase extractions in human plasma" Talanta 2009; 78: 233-241.

[6] Saussereau E, Lacroix C, Guerbet M, Cellier D, Spiroux J, Goulle JP. "Determination of levels of current drugs in hospital and urban wastewater" Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2013; 91: 171-176.

[7] Lee HH, Lee JF, Lin SY, Lin YY, Wu CF, Wu MT, Chen BH. "Simultaneous quantification of urine flunitrazepam, nimetazepam and nitrazepam by using liquid chromatography tandem mass spectrometry" Clin. Chim. Acta 2013; 420: 134-137.

[8] Marin SJ, Roberts M, Wood M, McMillin GA. "Sensitive UPLC-MS-MS assay for 21 benzodiazepine drugs and metabolites, zolpidem and zopiclone in serum or plasma" J. Anal. Toxicol. 2012; 36:472-476.

[9] Rust KY, Baumgarther B, Meggiolaro N, Kraemer T. "Detection and validated quantification of 21 benzodiazepines and 3 "Z-drugs" in human hair by LC–MS/MS" Forensic Sci. Int. 2012; 215: 64-72.

[10] Ming DS, Heathcote J. "A rapid and accurate UPLC/MS/MS method for the determination of benzodiazepines in human urine" J. Chromatogr B 2011; 879: 421–428.

[11] Morini L, Vignali C, Polla M, Sponta M, Groppi A. "Comparison of extraction procedures for benzodiazepines determination in hair by LC-MS/MS" Forensic Sci. Int. 2012; 218: 53-56.

[12] Zancanaro I, Pereira Limberger R, Bohel PO, Kerpel dos Santos M, Boni RB de, Pechansky F, Dutra Caldas E. "Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid-LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers" Forensic Sci. Int. 2012; 223: 208-216.

[13] He C, Long Y, Dan J, Li K, Liu F. "Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples" J. Biochem. Biophys. Methods 2007; 70: 133-170.

[14] Rouini MR, Aradakani YH, Moghaddam KA, Solatani F. "Improved HPLC method for rapid quantitation of diazepam and its major metabolites in human plasma" Talanta 2008; 75: 671-676.

[15] Nicoletti F, Raggi MA. "Simultaneous analysis of diazepam and its metabolites in rat plasma and brain tissue by HPLC-UV and SPE" Talanta 2009; 80: 279-285.

[16] Galaon T, Anghel DF, David V, Aboul-Enein HY. "Unusual Temperature-Retention Dependences Observed for Several Benzodiazepines in RP-HPLC Using Different Mobile Phase Compositions" Chromatographia 2013; 76: 1623-1630.

[17] Fernández P, Vázquez C, Lorenzo RA, Carro AM, Álvarez I, Cabarcos P. "Experimental design for optimization of microwave-assisted extraction of benzodiazepines in human plasma" Anal. Bioanal. Chem. 2010; 397: 677-685.

[18] Es'haghi Z, Bandegi S, Daneshvar L, Salari P. "Analysis of Diazepam Residue from Water Samples by Triple Phase-Suspended Droplet Microextraction Coupled to High Performance Liquid Chromatography and Diode Array Detection" Asian J. Chem. 2009; 21: 6392-6402.

[19] Jiménez Moreno AM, Navas MJ, Asuero AG. HPLC-DAD "Determination of CNS-Acting Drugs in Human Blood, Plasma, and Serum" Critical Reviews Anal. Chem. 2014; 44: 68-106.

[20] Fernández P, González C, Pena MT, Carro AM, Lorenzo RA. "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.

[21] Ferrando-Climent L, Rodriguez-Mozaz S, Barceló D. "Development of a UPLC-MS/MS method for the determination of ten anticancer drugs in hospital and urban wastewaters, and its application for the screening of human metabolites assisted by information-dependent acquisition tool (ID.A) in sewage samples" Anal. Bioanal. Chem. 2013; 405:5937-5952.

[22] Negreira N, López de Alda M, Barceló D. "On-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of 17 cytostatics and metabolites in waste, surface and ground water samples" J. Chromatogr. A 2013; 1280: 64- 74.

[23] Rezaee M, Assadi, Y, Milani Hosseini MR, Aghaee E, Ahmadia F, Berijani S. "Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction" J. Chromatogr. A 2006; 1116, 1-9.

[24] Ito R, Ushiro M, Takahashi Y, Saito K, Ookubo T, Iwasaki Y, Nakazawa 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.

[25] Behbahani M, Najafi F, Bagheri S, Bojdi MK, Salarian M, Bagheri A. "Application of surfactant assisted dispersive liquid-liquid microextraction as an efficient sample treatment technique for preconcentration and trace detection of zonisamide and carbamazepine in urine and plasma samples" J. Chromatogr. A 2013; 1308: 25-31.

[26] Xiao C, Tang M, Li J, Yin CR, Xiang G, Xu L. "Determination of sildenafil, vardenafil and aildenafil in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction-back extraction based on ionic liquid and high performance liquid chromatography-ultraviolet detection" J. Chromatogr. B 2013; 931: 111-116.

[27] Melwanki MB, Chen WS, Bai HY, Lin TY, Fuh MR. "Determination of 7-aminoflunitrazepam in urine by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry" Talanta 2009; 78: 618-622.

[28] Vardini MT, Mashayekhi HA, Saber-Tehrani M. "Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for the simultaneous determination of alprazolam, oxazepam, and diazepam in human urine samples" J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2012; 35:988-999.

[29] Williams JR. "The declaration of Helsinki and public health" Bull .World Health Organ. 2008; 86: 650-651.

[30] Lewis GA, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. "Pharmaceutical Experimental Design", Marcel Dekker, New York, 1999.

[31] Mathieu D, Nony J, Phan-Than-Luu R. Nemrod®W, Ver. 2000, LPRAI, Marseille, 2000.

[32] Salomone A, Gerace E, Brizio P, Gennaro MC, Vincenti M. "A fast liquid chromatography - tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine. Validation and application to real cases of forensic interest" J. Pharm. Biomed. Anal. 2010; 56: 582-591.

[33] Chiuminatto U, Gosetti F, Dossetto P, Mazzucco E, Zampieri D, Robotti E, Gennaro MC, Marengo E. "Automated Online Solid Phase Extraction Ultra High Performance Liquid Chromatography Method Coupled with Tandem Mass Spectrometry for Determination of Forty-Two Therapeutic Drugs and Drugs of Abuse in Human Urine" Anal. Chem. 2010; 82: 5636 - 5645.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN PLASMA MEDIANTE US-DLLME-HPLC-PDA.

El consumo de drogas de abuso es una epidemia social que se ha expandido rápidamente en los últimos años. Este fenómeno representa una gran amenaza para la salud y el bienestar humano porque repercute negativamente sobre las bases sociales, económicas, culturales y políticas de la sociedad. Según un informe de la Oficina de las Naciones Unidas contra las Drogas y el Delito, la prevalencia anual de heroína y cocaína se ha mantenido estable a nivel mundial entre 0.3 y 0.5% de la población adulta. [1] En los últimos 10 años, la cocaína se ha convertido en la droga ilegal más utilizada en Europa, incluso más que la heroína. [2] Los opiáceos y la cocaína son drogas muy consumidas en la actualidad; se encuentran en el 81% de las sobredosis, y la cocaína es una de las principales drogas disponibles en Europa. Esto plantea la necesidad de desarrollar nuevos métodos analíticos específicamente diseñados para la extracción y preconcentración de estas sustancias en muestras biológicas, de forma simple y económica. La miniaturización ha jugado un papel importante para alcanzar estos objetivos. [3,4] La combinación de microextracción y ultrasonidos [5-8] y la microextracción en fase líquida [9-12] han permitido determinar concentraciones muy bajas, acelerando la transferencia de masa entre dos fases inmiscibles y boosting la extracción en un tiempo muy corto. La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) fue introducida por Rezaee et al. en 2006 y usa un sistema ternario de disolventes, incluyendo un extractante de alta densidad, un dispersante altamente miscible con él y una muestra acuosa. La elevada superficie de contacto entre el extractante y la muestra acuosa en la mezcla turbia formada facilita un rápido equilibrio. La DLLME es simple, rápida, económica, eficiente y amigable con el medio ambiente, lo que ha promovido su uso para la determinación de muchas sustancias en muestras acuosas [13-15] y más recientemente en matrices biológicas [16-21].

Por estos motivos, en este trabajo se evaluó por primera vez la microextracción líquido-líquida dispersiva como un nuevo método de preparación de muestra para la extracción simultánea de morfina, 6-acetilmorfina, cocaína, benzoilecgonina y metadona en plasma

humano, y su posterior análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fotodiodos. El método fue validado y posteriormente aplicado a 22 intoxicaciones, encontrando benzoilecgonina en 15 de los 22 casos, metadona en 13 casos, morfina en 7 casos y cocaína en 5 casos.

4.2.1. Optimización del procedimiento US-DLLME.

Se realizaron varios experimentos preliminares para optimizar el disolvente extractante, el disolvente dispersante, el pH de extracción, la adición de sal y el tipo de agitación.

El disolvente extractante es la variable más importante en US-DLLME. Se prueban seis disolventes, elegidos en términos de densidad relativa al agua, capacidad de extracción para los compuestos, inmiscibilidad con agua y rendimiento cromatográfico (tetracloruro de carbono, dicloroetano, tetracloroetileno, diclorometano, cloroformo y clorobenceno), todos con 2 mL de ACN como disolvente dispersante, 100 µL de cada disolvente de extracción, pH 10,2, y 3 minutos de agitación con ultrasonidos. El cloroformo fue el disolvente extractante elegido pues se obtuvo un extracto final más limpio, conteniendo todas las drogas (Figura 43).

Se analizaron tres disolventes dispersantes (acetona, metanol y acetonitrilo), utilizando 2 mL de cada uno, 100 µL de cloroformo como extractante, pH 10,2 y 3 minutos de ultrasonidos. Las mejores recuperaciones de todos los fármacos se obtuvieron con acetonitrilo como dispersante (Figura 44a).

La eficacia de la extracción se evaluó en condiciones ácidas, neutras y básicas, y se encontró que era óptima en un medio alcalino porque las recuperaciones alcanzaron un máximo a pH 10,6 (Figura 44b).

La adición de sal generalmente aumenta la solubilidad de los analitos en la fase orgánica y reduce el volumen de la gota al reducir la solubilidad del extractante. Se examina el efecto de la sal, añadiendo 0,1, 0,2 ó 0,3 g de NaCl a las muestras acuosas, y se

observa que la eficacia de extracción aumenta, particularmente con 0,2 g de sal (Figura 44c).

También se estudia la eficacia de varios procedimientos de agitación que incluyen ultrasonidos (US), agitación manual, agitación mecánica o sin agitación, un tiempo de 3,5 min en todas las pruebas. Los mejores resultados para la extracción simultánea de las cinco drogas se obtuvieron con ultrasonidos como método de agitación (Figura 44d).

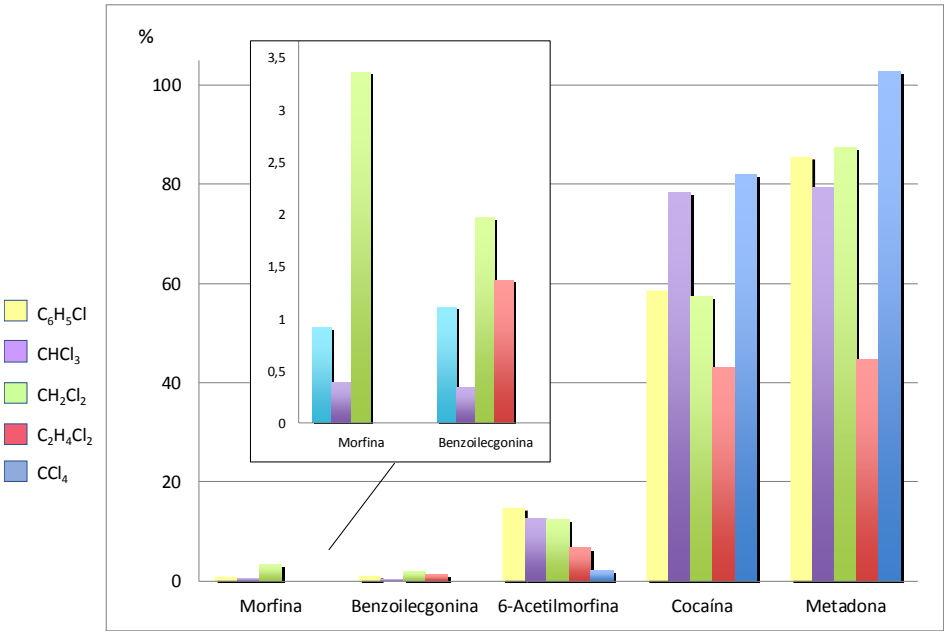


Figura 43: Optimización del disolvente extractante.

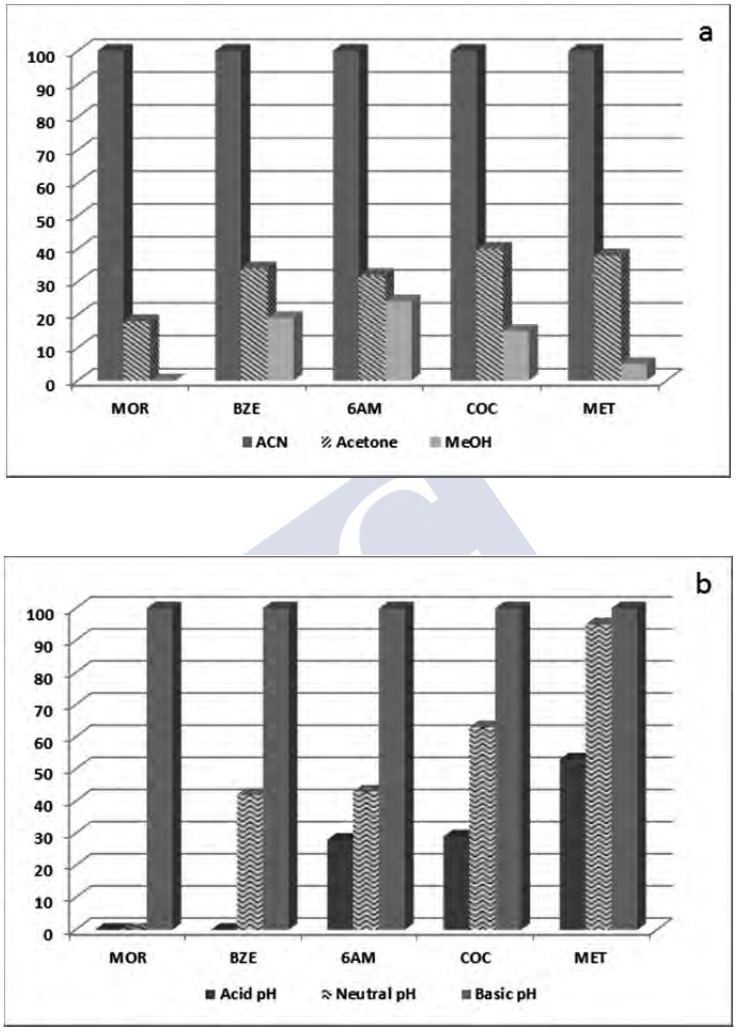


Figura 44: Optimización del (a) disolvente dispersante; (b) pH.

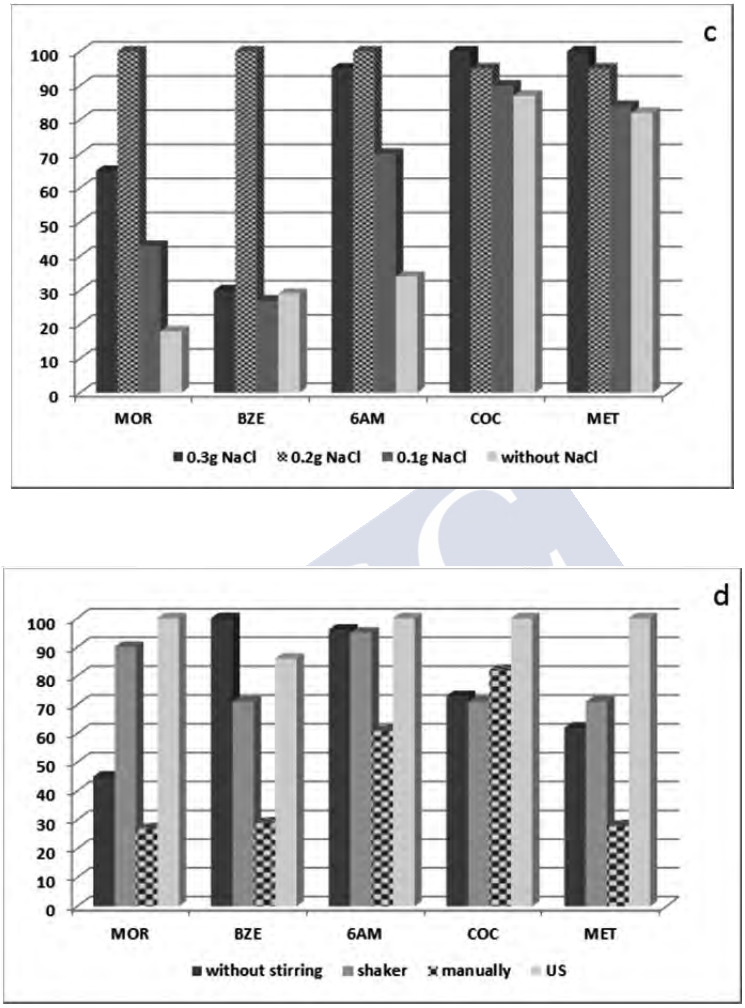


Figura 44 (continuación): Optimización de (c) adición de sal; (d) tipo de agitación.

Se optimizaron otras variables que influyen en el rendimiento de la DLLME usando un diseño experimental de superficie de respuesta, tipo Doehlert. [22] Se consideraron tres factores diferentes: tiempo de agitación en US (0,5, 1,5, 2,5, 3,5 ó 4,5 min), volumen de acetonitrilo (2,1, 2,7 ó 3,3 mL) y volumen de cloroformo (50, 90, 130, 175, 220 ó 300 μL). Se estimó el error experimental realizando tres repeticiones

en el centro del dominio. Por lo tanto, el diseño incluyó 15 experimentos (Tabla 23) que se realizaron en orden aleatorio para evitar los efectos de otras variables no consideradas.

Tabla 23. Plan de experimentación.

N°Exp	Orden aleatorio	Tiempo US (min)	Volumen cloroformo (µL)	Volumen ACN (mL)
1	4	4,5	175	2,7
2	10	0,5	175	2,7
3	3	3,5	300	2,7
4	5	1,5	50	2,7
5	2	3,5	50	2,7
6	1	1,5	300	2,7
7	7	3,5	220	3,3
8	14	1,5	130	2,1
9	9	3,5	130	2,1
10	15	2,5	260	2,1
11	6	1,5	220	3,3
12	8	2,5	90	3,3
13	12	2,5	175	2,7
14	13	2,5	175	2,7
15	11	2,5	175	2,7

En base a los resultados de ANOVA, la regresión del modelo matemático fue estadísticamente significativa para los cinco analitos. El efecto principal de $\mathbf{b_1}$ (tiempo de agitación) fue significativo para 6-acetilmorfina y cocaína, y se relacionó con un signo positivo en la eficacia de extracción. Por el contrario, un tiempo intermedio-bajo resultó ser más efectivo para extraer benzoilecgonina. El efecto principal de $\mathbf{b_2}$ (volumen de extractante) fue estadísticamente significativo para benzoilecgonina, cocaína y metadona, que requirieron grandes volúmenes para garantizar una extracción eficiente. Sin embargo, los volúmenes medios de cloroformo

permitieron una extracción aceptable de morfina y 6-acetilmorfina. El principal efecto de $\mathbf{b_3}$ (volumen de dispersante) fue estadísticamente significativo para benzoilecgonina, cuya extracción se vio favorecida por el uso de altos volúmenes de dispersante. Por el contrario, los volúmenes bajos fueron más efectivos para extraer morfina y 6-acetilmorfina.

Dos factores fueron estadísticamente significativos para dos analitos (cocaína y benzoilecgonina), y también un solo factor para otras dos drogas (6-acetilmorfina y metadona). Los siguientes factores también fueron estadísticamente significativos: $\mathbf{b_{33}}$ para morfina; $\mathbf{b_{22}}$ para morfina, benzoilecgonina, 6-acetilmorfina, cocaína y metadona; y $\mathbf{b_{11}}$ para benzoilecgonina. De manera similar, algunas interacciones entre dos factores fueron estadísticamente significativas (por ejemplo, $\mathbf{b_{23}}$ para benzoilecgonina y cocaína). La Figura 45 muestra cuatro gráficos tridimensionales de los factores y su influencia sobre la respuesta de cada analito. Como puede verse, la eficacia de extracción mejoró con el aumento del volumen de disolvente y el tiempo de agitación para la mayoría de las drogas estudiadas. Debido a que las superficies de respuesta no permitieron identificar las condiciones óptimas para la extracción simultánea de todos los compuestos, se utiliza un algoritmo numérico basado en funciones de deseabilidad no lineal, del tipo unilateral izquierdo y proporcionado por el programa NemrodW para calcular la deseabilidad general, D, como la media geométrica de la deseabilidad individual para cada droga. [22] De esta forma, se identificaron las condiciones óptimas de compromiso para la extracción simultánea de las cinco drogas (D = 97,7%). La Figura 46 muestra las funciones generales de deseabilidad en dos dimensiones.

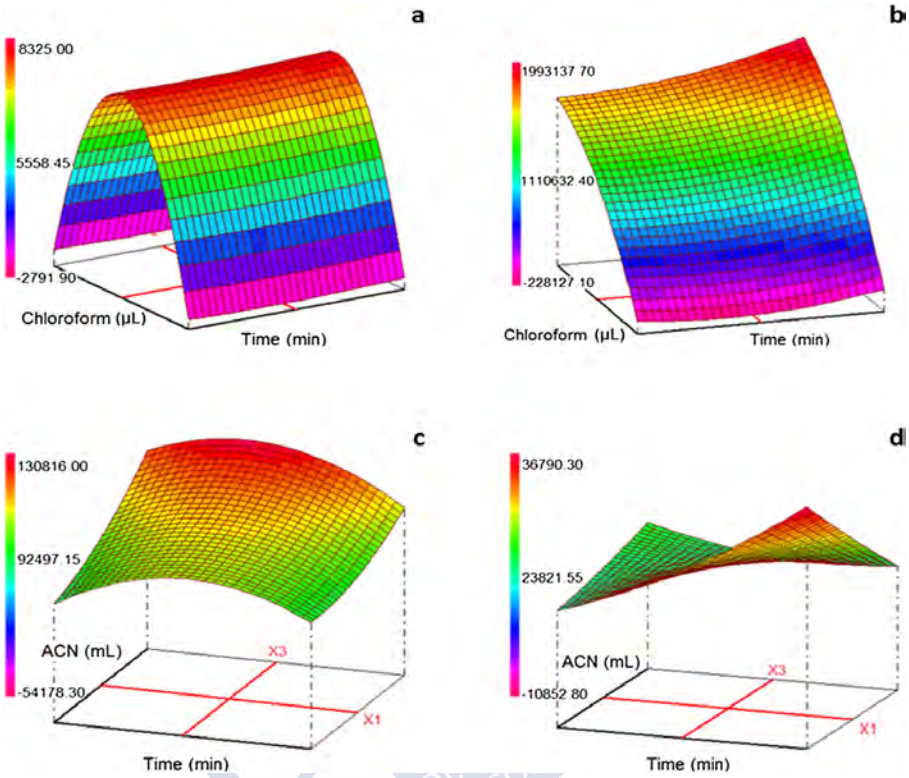


Figura 45: Superficies de respuesta: volumen de extractante versus tiempo de agitación para morfina (MOR) (a) y cocaína COC (b); volumen de dispersante versus tiempo de agitación para benzoilecgonina (BZE) (c) y 6-acetilmorfina (6AM) (d)

En base a los resultados, las mejores condiciones de extracción fueron: 20 µL de cloroformo como disolvente extractante, 3,2 mL de acetonitrilo como disolvente dispersante, 0,2 g de NaCl, pH 10,6 y 3,5 min de agitación US.

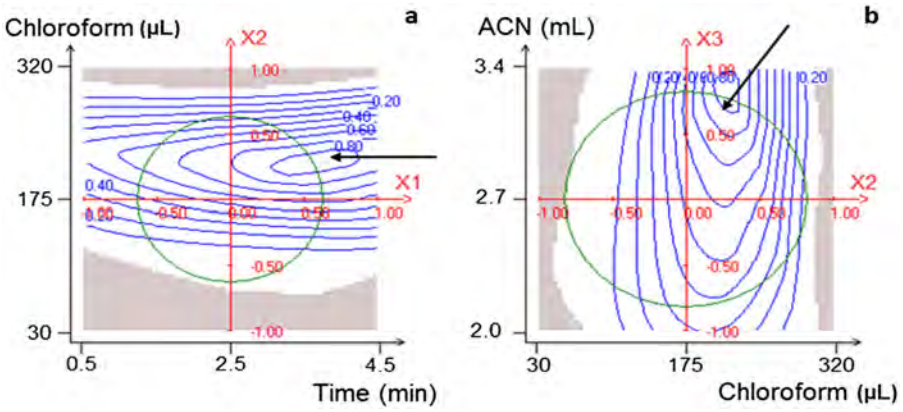


Figura 46: Gráficos de isorespuesta desde un valor D=0 (área gris) a D=1 para la deseabilidad general, D. Las flechas indican el área donde se obtienen valores óptimos para los factores estudiados

4.2.2. Validación del método analítico.

Las drogas se identificaron a partir de sus tiempos de retención y su espectro UV. La técnica demostró una buena selectividad ya que permitía discriminar los analitos de otras sustancias presentes en el plasma que podían eluirse en momentos similares. Se obtuvo una alta sensibilidad operando a la longitud de onda de absorción máxima para cada fármaco.

Los criterios de validación usados fueron los recomendados por la Food and Drug Administration (FDA) [23] y la International Conference on Harmonization (ICH) [24], lo que implica un estudio de la linealidad, límites de detección y cuantificación, selectividad, precisión y exactitud (en términos de recuperación).

Las curvas de calibración para los analitos se construyeron en un rango de concentración de 0,1 a 10 µg/mL en plasma. Las áreas de los picos obtenidos se usaron para establecer ecuaciones de regresión y calcular el coeficiente de correlación de Pearson, r, que es una medida del grado de relación entre las variables x e y. La Tabla 24 muestra los resultados del análisis de regresión. La pendiente de la curva de calibración es una medida de la sensibilidad del método analítico.

Como se observa, los valores de sensibilidad más baja y más alta corresponden a morfina y cocaína, respectivamente.

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de cada droga se determinaron a partir de las concentraciones más bajas con una relación señal / ruido de al menos 3 y 10, respectivamente. Los LOD variaron de 13,9 a 28,5 ng/mL y los LOQ variaron de 46,2 a 94,9 ng/mL (Tabla 24). Estos valores son aceptables para el propósito previsto ya que los niveles tóxicos de las drogas analizadas en plasma son más altos que los LOQ obtenidos. [25]

La selectividad de un método analítico es una medida de su capacidad para distinguir y cuantificar un compuesto dado en presencia de otros en una muestra. La forma más simple de evaluar la selectividad es verificando la ausencia de respuesta en varias muestras blanco. Como se puede ver en la Figura 47, no hubo interferencias en los tiempos de retención de las cinco drogas en estudio; por lo tanto, el método propuesto es selectivo para el propósito previsto.

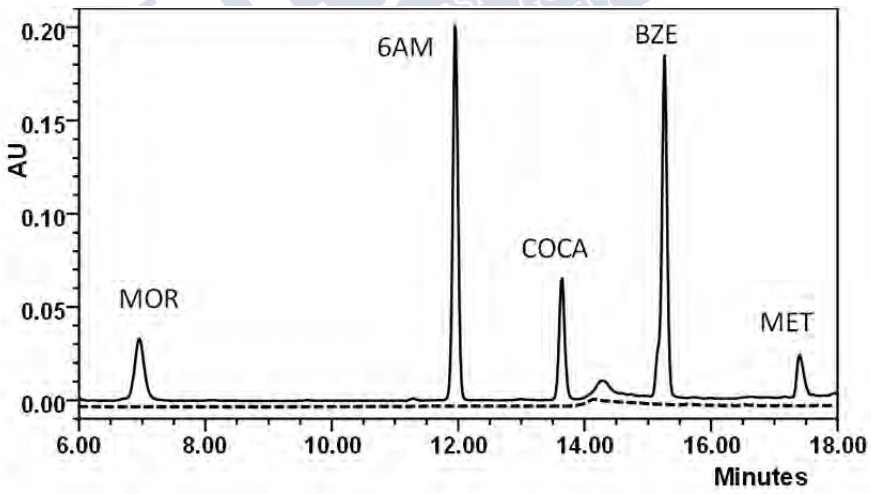


Figura 47: Cromatograma de una muestra patrón que contiene las cinco drogas (línea continua) y una muestra blanco (línea punteada).

La precisión se determinó a tres niveles de concentración de las drogas en plasma (0,1, 0,5 y 5 μg/mL), y los coeficientes de variación fueron aceptables (Tabla 24). La exactitud se evaluó en términos de recuperación, también a tres niveles de concentración diferentes en plasma (0,1, 0,5 y 5 μg/mL). Napoletano y col. [26] obtuvieron resultados similares, y otros autores [27-29], usando también LC-MS/MS para las determinaciones reportaron precisiones más altas.

Las recuperaciones se calcularon comparando las concentraciones reales añadidas con las determinadas con el método propuesto. Como se puede ver en la Tabla 24, alcanzaron su valor máximo en los niveles más altos de droga y oscilaron entre 84,2% para morfina y 101,9% para benzoilecgonina. Estos resultados son mejores que los obtenidos previamente por otros autores, usando extracción en fase sólida [30, 31], extracción asistida por microondas [32] o microextracción en fase líquida [33].

Kohler y col. [34] publicaron el único estudio donde se usó la microextracción líquido-líquida dispersiva acoplada a electroforesis capilar y espectrometría de masas para extraer y cuantificar 30 drogas de abuso en muestras de orina. Obtuvieron LODs de 5 ng/mL para 6AM y cocaína, y una recuperación del 90% para metadona.

Tabla 24: Parámetros de validación de drogas en plasma (rango de linealidad 0,1-10 µg/mL).

Analito	Linealidad	R	LOD/LOQ (ng/mL)	Precisión intradía %RSD (n=5) (µg/mL)			Precisión interdía %RSD (n=5) (µg/mL)			Exactitud (%Recuperación±SD) (n=5) (µg/mL)		
				0,1	0,5	5	0,1	0,5	5	0,1	0,5	5
Morfina	y=281x-7	0,999	28,5/ 94,9	2,9	2,0	1,8	3,7	3,0	0,2	84,2 ± 0,4	98,0 ± 0,2	101,7 ± 0,3
BEG	y=7166x-95	1,000	24,9/ 83,0	3,6	2,0	1,9	2,4	0,9	0,3	88,9 ± 0,5	98,0 ± 0,1	101,9 ± 0,2
6AM	y=323x+7	0,999	27,6/ 91,9	4,9	3,3	1,5	6,8	5,7	3,3	89,7 ± 0,3	98,4 ± 0,2	100,4 ± 0,1
Cocaína	y=46868x-728	0,999	20,5/ 68,4	2,6	2,8	2,5	4,1	4,4	1,4	84,9 ± 0,5	95,5 ± 0,1	100,5 ± 0,1
Metadona	y=2876x-25	1,000	13,9/ 46,2	3,0	1,6	0,1	2,1	1,1	0,1	86,0 ± 0,4	99,9 ± 0,3	101,6 ± 0,3

4.2.3. Aplicación del método a muestras de plasma.

Una vez optimizado el método propuesto DLLME-HPLC/PDA, se aplicó con éxito para analizar 22 muestras de plasma de consumidores de heroína, cocaína y/o metadona (Tabla 25). La presencia o ausencia de fármacos en cada caso confirmaron los resultados obtenidos previamente mediante inmunoensayo enzimático y cromatografía de gases-espectrometría de masas. La droga cuantificada con más frecuencia fue benzoilecgonina (15 muestras), seguida de metadona (13 muestras), morfina (7 muestras) y cocaína (5 muestras). Los niveles de las drogas en plasma estaban incluidos en los siguientes rangos: 0,10-0,28 μg/mL (media 0,18 μg/mL) para morfina, 0,07-0,43 μg/mL (media 0,24 μg/mL) para cocaína, 0,10 - 2,96 μg/mL (media 0,57 μg/mL) para benzoilecgonina, y 0,15-2,04 μg/mL (media 0,62 μg/mL) para metadona.

Tabla **25:** Concentraciones de drogas (μg/mL) en 22 muestras reales de plasma.

Caso	Morfina	6AM	Cocaína	BEG	Metadona
1	0,14	n.d.	<LOQ	0,11	n.d.
2	n.d.	n.d.	0,26	0,57	0,21
3	n.d.	n.d.	0,07	0,62	0,22
4	0,27	n.d.	n.d.	n.d.	0,19
5	0,10	n.d.	<LOQ	0,77	0,15
6	0,28	n.d.	n.d.	n.d.	0,18
7	0,28	n.d.	0,30	n.d.	n.d.
8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,73
9	n.d.	n.d.	n.d.	0,41	n.d.
10	n.d.	n.d.	n.d.	0,12	0,43
11	n.d.	n.d.	n.d.	0,18	0,49
12	n.d.	n.d.	n.d.	0,10	n.d.
13	n.d.	n.d.	n.d.	0,10	1,75
14	n.d.	n.d.	0,12	0,44	n.d.
15	n.d.	n.d.	n.d.	0,10	0,33
16	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	0,86
17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,45
18	n.d.	n.d.	<LOQ	0,11	n.d.

19	0,10	n.d.	n.d.	n.d.	2,04
20	n.d.	n.d.	0,43	2,96	n.d.
21	0,12	n.d.	n.d.	1,60	n.d.
22	n.d.	n.d.	<LOQ	0,41	n.d.
Freq	**8/22**	**0/22**	**9/22**	**15/22**	**13/22**

n.d., no detectado.

La prevalencia relativa de las drogas y la mayor concentración media de BEG con respecto a la cocaína fueron consistentes con los resultados reportados previamente por otros autores (Tabla 26). Sin embargo, la concentración plasmática de cocaína en un caso fatal de un "*body stuffer*" fue mayor que la de BEG [35]**.**

Según los criterios de Baselt [25], las concentraciones plasmáticas encontradas fueron tóxicas para morfina en tres muestras y para metadona en siete muestras. Sin embargo, una interpretación toxicológica precisa de estos resultados no es sencilla porque los niveles terapéuticos y tóxicos de las drogas de abuso pueden superponerse dependiendo del grado de tolerancia desarrollado por los usuarios, y a menudo es difícil conocer su historia previa de consumo.

Tabla 26. Datos de muestras de plasma, reportados por varios autores.

AUTOR	MÉTODO	Nº CASOS	CASOS POSITIVOS	CONC.MEDIA (µg/mL)	BEG/COCA	MOR/6AM
Fineschi, 2002 [35]	SPE/GC-MS	1	BEG: 1 COCA: 1	86,10 98,10	0,9	
Giroud, 2004 [36]	LLE/HILIC-MS	1	BEG: 1 COCA: 1	10,40 5,02	10,40 5,02	
Concheiro, 2006 [37]	SPE/HPLC-MS	156	BEG: 11 COCA: 4	0,61 0,041	14,9	
Musshoff, 2006 [38]	SPE/HPLC-MS-MS	1	MOR: 1 MET: 1	0,011 0,0023		
Fernández, 2006 [39]	SPE/HPLC-PDA	21	BEG: 19 COCA: 8 MOR: 13 6AM: 8 MET: 11	3,56 1,48 2,97 1,91 0,53	2,4	1,6

Fernández, 2007 [32]	MAE/HPLC-PDA	38	BEG: 29 COCA: 19 MOR: 22 6AM: 16 MET: 18:	0,99 0,94 0,73 0,55 0,77	1,1	1,3
Bjørk, 2010 [40]	SPE/HPLC-MS-MS	267	BEG: 65 COCA: 35 MOR: 24 6AM: 2 MET: 29	0,37 0,096 0,039 0,0065 0,22	3,9	6,0
Napoletano, 2012 [26]	µSPE/HPLC-MS-MS	1	BEG	0,0043		
Pilgrim, 2013 [41]	---	49	BEG: 45 COCA: 25	2,10	8,4	
Este trabajo	DLLME/HPLC-PDA	22	BEG: 15 COCA: 5 MOR: 7 MET: 13	0,57	2,4	

4.2.4. Bibliografía.

[1] UNODC. 2012. “World Drug Report 2012”. United Nations Publications: New York.

[2] EMCDDA (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction). 2012. Annual report 2012: The State of the Drugs Problem in Europe. Publications Office of the European Union: Luxembourg.

[3] Lee J, Lee HK, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S. “Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: a review” Anal. Chim. Acta 2008; 624: 253–268.

[4] Saraji M, Boroujeni MK, Bidgoli AAH. “Comparison of dispersive liquid–liquid microextraction and hollow fiber liquid–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.

[5] Ma JJ, Du X, Zhang JW, Wang LZ. "Ultrasound-assisted emulsification microextraction combined with flame atomic absorption spectrometry for determination of trace cadmium in water samples". Talanta 2009; 80: 980–984.

[6] Jia C, Zhu X, Chen L, He M, Yu P, Zhao E. "Extraction of organophosphorus pesticides in water and juice using ultrasound-assisted emulsification-microextraction". J. Sep. Sci. 2010; 33: 244–250.

[7] Cheng J, Matsadiq G, Liu L, Zhou YW, Chen G. "Development of a model ultrasound-assisted surfactant-enhaced emulsification microextraction method and its application to the analysis of eleven polycyclic aromatic hydrocarbons at trace levels in water" J. Chromatogr. A 2011; 1218: 2476–2482.

[8] Zhang Y, Lee HK. "Application of ultrasound-assisted emulsification microextraction based on applying low-density organic solvent for the determination of organochlorine pesticides in water samples" J. Chromatogr. A 2012; 1252: 67–73.

[9] Leong M, Huang SD. "Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection" J. Chromatogr. A 2008; 1211: 8–12.

[10] Xu H, Song D, Cui Y, Hu S, Yu QW, Feng YQ. "Analysis of hexanal and heptanal in human blood by simultaneous derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction then LC-APCI-MS-MS" Chromatographia 2009; 70: 775–781.

[11] Lili L, Xu H, Song D, Cui Y, Hu S, Zhang G. "Analysis of volatile aldehide biomarkers in human blood by derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method by high performance liquid chromatography" J. Chromatogr. A 2010; 1217: 2365–2370.

[12] Rezaee M, Yamini Y, Khanchi A, Faraji M, Saleh A. "A simple and rapid new dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop combined with inductively

coupled plasma optical emission spectrometry for preconcentration and determination of aluminium in water samples" J. Hazardous Materials 2010; 178: 766–770.

[13] Nagaraju D, Huang SD. "Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with gas chromatography-ion trap mass spectrometry" J. Chromatogr. A 2007; 1161:89–97.

[14] Li Y, Hu J, Liu X, Fu L, Zhang X, Wang X. "Dispersive liquid-liquid microextraction followed by reversed phase HPLC for the determination of decabrominated diphenyl ether in natural water" J. Sep. Sci. 2008; 31: 2371–2376.

[15] Melwanki MB, Fuh MR. "Partitioned dispersive liquid-liquid microextraction. An approach for polar organic compounds extraction from aqueous samples" J. Chromatogr. A 2008; 1207: 24–28.

[16] Xiong C, Ruan J, Cai Y, Tang Y. 2009. "Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography" J. Pharm. Biomed. Anal. 2008; 49: 572–578.

[17] Xu H, Ding Z, Lv L, Song D, Feng YQ. "A novel dispersive liquid liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples" Anal. Chim. Acta 2009; 636: 28–33.

[18] Mashayekhi HA, Abroomand-Azar P, Saber-Tehrani M, Hussain SW. "Rapid determination of carbamazepine in human urine, plasma samples and water using DLLME followed by RP-LC" Chromatographia 2010; 71:517–521.

[19] Rezaee M, Yamini Y, Faraji M. "Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method" J. Chromatogr. A 2010; 1217: 2342–2357.

[20] Rezaee M, Yamini Y, Hojjati M, Faraju M. "Novel extraction method based on the dispersion of the extraction solvent for

extraction of letrozole from biological fluids" Anal. Methods 2010; 2: 1341–1345.

[21] Fernández P, González C, Pena MT, Carro AM, Lorenzo RA. "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.

[22] Lewis GA, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. "Pharmaceutical experimental design" Marcel Dekker: New York. 1999.

[23] Food and Drug Administration (FDA), U.S. Department of Health and Human Services, "Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation" 2001. http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf.

[24] International Conference on Harmonization. 2005. "Validation of analytical procedures: Methodology" ICH Q2 B. http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf.

[25] Baselt RC. "Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man" Biomedical Publications: Seal Beach. 2011.

[26] Napoletano S, Montesano C, Compagnone D, Curini R, D'Ascenzo G, Roccia C, Sergi M. "Determination of illicit drugs in urine and plasma by micro-SPE followed by HPLC-MS/MS" Chromatographia 2012; 75:55–63.

[27] Bassan DM, Erdmann F, Krüll R. "Quantitative determination of 43 common drugs and drugs of abuse in human serum by HPLC-MS/ MS" Anal. Bioanal. Chem. 2011; 400:43–50.

[28] Dowling G, Regan L. "A new mixed mode solid phase extraction strategy for opioids, cocaine, amphetamines and adulterants in human blood with hybrid liquid chromatography tandem mass spectrometry detection" J. Pharm. Biomed. Anal. 2011; 54:1136–1145.

[29] Ramírez Fernández MM, Wille SMR, Kummer N, Di Fazio V, Ruyssinckx E, Samyn N. "Quantitative analysis of 26 opioids, cocaine, and their metabolites in human blood by ultra performance

liquid chromatography tandem mass spectrometry" Ther. Drug Monit. 2013; 35: 510–521.

[30] Rook EJ, Hillebrand, MJX, Rosing H, Van Ree JM, Beijnen JH. "The quantitative analysis of heroin, methadone and their metabolites and the simultaneous detection of cocaine, acetylcodeine and their metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry" J. Chromatogr. B 2005; 824:213–221.

[31] Bjørk MK, Simonsen KW, Andersen DW, Dalsgaard PW, Siguroardóttir SR, Linnet K, Rasmussen BS. "Quantification of 31 illicit and medicinal drugs and metabolites in whole blood by fully automated solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry2 Anal. Bioanal. Chem. 2013; 405:2607–2617.

[32] Fernández P, Lago M, Lorenzo RA, Carro AM, Bermejo AM, Tabernero MJ. "Microwave-assisted extraction and HPLC-DAD determination of drugs of abuse in human plasma" J. Anal. Toxicol. 2007; 31: 388–393.

[33] Ebrahimzadeh H, Khezri E, Kamarei F. "Determination of methadone in biological samples using liquid phase microextraction with back extraction combined with LC" Chromatographia 2010; 72: 231–238.

[34] Kohler I, Schappler J, Sierro T, Rudaz S. "Dispersive liquid-liquid microextraction combined with capillary electrophoresis and time of-flight mass spectrometry for urine analysis" J. Pharm. Biomed. Anal. 2013; 73: 82-89.

[35] Fineschi V, Centini F, Monciotti F, Turillazzi E. "The cocaine "body stuffer" syndrome: a fatal case" Forensic Sci. Int. 2002; 126: 7–10.

[36] Giroud C, Michaud K, Sporkert F, Eap C, Augsburger M, Cardinal P. "A fatal overdose of cocaine associated with coingestion of marijuana, buprenorphine and fluoxetine. Body fluids and tissue distribution of cocaine and its metabolites determined by hydrophilic

interaction chromatography-mass spectrometry" J. Anal. Toxicol. 2004; 28: 464–474.

[37] Concheiro M, De Castro A, Quintela O, López-Rivadulla M, Cruz A. "Determination of drugs of abuse and their metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. An application to 156 road fatalities" J. Chromatogr. B 2006; 832: 81–89.

[38] Musshoff F, Trafkowski J, Kuepper U, Madea B. "An automated and fully validated LC-MS/MS procedure for the simultaneous determination of 11 opioids used in palliative care, with 5 of their metabolites" J. Mass Spectrom. 2006; 41: 633–640.

[39] Fernández P, Morales L, Vázquez C, Bermejo AM, Tabernero MJ. "HPLC-DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma" Forensic Sci. Int. 2006; 161: 31–35.

[40] Bjørk MK, Nielsen MKK, Markussen LØ, Klinke HB, Linnet K. "Determination of 19 drugs of abuse and metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry" Anal. Bioanal. Chem. 2010; 396: 2393–2401.

[41] Pilgrim JL, Woodford N, Drummer OH. "Cocaine in sudden and unexpected death: A review of 49 post-mortem cases" Forensic Sci. Int. 2013; 227:52–59.

4.3. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN PLASMA MEDIANTE MEPS - UPLC-PDA.

Hoy en día, el uso de sustancias ilegales es un fenómeno relacionado con el ocio, que afecta particularmente a los jóvenes, que toman sustancias psicoactivas con fines recreativos, sin percibir los riesgos involucrados. El cannabis, la cocaína y el éxtasis son, en este orden, las sustancias ilegales más consumidas. A fines de la última década, surgió una nueva familia de medicamentos de diseño que contenía uno o más químicos sintéticos relacionados con la catinona, un estimulante similar a las anfetaminas que se encuentra naturalmente en la planta de khat (*Catha edulis Forsk*). La metilona, mefedrona y metilendioxipirovalerona (MDPV) parecen ser las catinonas más vendidas hasta 2010. Los efectos encontrados en personas que han tomado estas drogas sintéticas son similares a los que producen otras drogas como las anfetaminas y la cocaína que aumentan el nivel de dopamina en los circuitos cerebrales causando euforia y una mayor actividad. [1-3]

Debido a su reciente abuso, las concentraciones terapéuticas, tóxicas y fatales de las catinonas sintéticas en muestras biológicas como la sangre y la orina no están suficientemente documentadas. Con el fin de evitar las leyes de protección al consumidor y comercialización, algunas sustancias psicoactivas nuevas (NSP) se venden en sitios web, 'tiendas inteligentes' y 'tiendas de cabecera', con etiquetas que hacen referencia a varios tipos de productos como 'químicos de investigación', 'sales de baño' o 'alimento vegetal'. La rápida aparición de medicamentos nuevos y desconocidos ha llevado a varios países de la UE a tomar iniciativas para adaptar su legislación sobre medicamentos, mejorar y acelerar el procedimiento para agregar nuevas sustancias a la lista de medicamentos. [1]

Además, el uso de drogas múltiples, incluida la combinación de drogas ilícitas con alcohol y, a veces, productos farmacéuticos y sustancias no controladas, se ha convertido en el patrón dominante del uso de drogas en Europa. En los estudios realizados en conductores detenidos bajo sospecha de conducir bajo la influencia de drogas, a

menudo se detecta una sustancia psicoactiva distinta del alcohol en más del 80% de los casos. [1]

En consecuencia, se necesitan métodos analíticos confiables para la determinación eficiente de diferentes drogas de abuso en matrices biológicas, como el plasma, para el control de posibles intoxicaciones. Por todo ello, se ha desarrollado un método basado en la extracción con adsorbentes empaquetados (MEPS), seguida de la cromatografía líquida de ultra eficacia acoplada a un detector de serie de diodos (UPLC-PDA), para la extracción y determinación de siete drogas clásicas con sus metabolitos y tres catinonas en muestras de plasma.

La bibliografía muestra métodos de análisis de drogas usando GC-MS [4-6] LC-MS/MS [7-9] o LC-PDA [10-13]. El proceso de extracción es una etapa fundamental e influye significativamente sobre la calidad de los resultados [14]. En los últimos años, en el grupo de investigación se han desarrollado y validado varias técnicas de extracción para la determinación de drogas de abuso de diferentes muestras biológicas. Estos procedimientos, como la extracción asistida por microondas [10, 11] y la extracción en fase sólida (SPE) [12], que requieren cierto tiempo y varios mililitros de solvente orgánico. Estos inconvenientes pueden superarse utilizando técnicas de microextracción, como la microextracción líquido líquido dispersiva (DLLME) [13] y la microextracción con adsorbentes empaquetados (MEPS). MEPS es una miniaturización de la extracción en fase sólida (SPE) tradicional [15, 16], usada para la extracción de drogas en muestras biológicas complejas [17-25]. La fase se integra directamente en una jeringa y se puede usar más de 90 veces para muestras líquidas biológicas, mientras que la columna SPE convencional se usa solo una vez. El sistema de dispensación controlado digitalmente eVol® mejora la jeringa manual y permite un rápido desarrollo del método. [16]

Para la optimización de los diferentes factores se usó un diseño de screening $2^2 3^4 4^1$//18 [26], obteniéndose como condiciones más adecuadas: 300 µL de muestra, pH 8, fase C8/SCX (M1), 10 strokes, lavado con 150 µL de agua: metanol (90:10, v/v), 0,5 min de secado y

elución con 200 µL de diclorometano: isopropanol: hidróxido amónico (78:20:2, v/v/v).

Para la determinación de las drogas se utiliza la cromatografía líquida de ultra eficacia, usando una columna Acquity UPLC BEH Shield RP18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) acoplada a un detector de serie de diodos, que permite separar las 10 drogas de interés en 3 minutos, reduciendo los tiempos de retención obtenidos anteriormente en HPLC.

Tras la validación satisfactoria del método, con límites de detección entre 5 y 25 ng/mL, el método se aplicó al análisis toxicológico de muestras de plasma, procedentes de 24 individuos. Se obtuvieron resultados positivos en todos los casos, y en veinte de ellos se pudo cuantificar al menos una de las drogas detectadas. En todas las muestras analizadas se encontraron drogas clásicas y ninguna de las catinonas estudiadas. En algunos casos, se compararon los resultados obtenidos por MEPS/UPLC-PDA y por SPE/GC-MS, técnica validada y usada en el laboratorio para realizar análisis de rutina.

4.3.1. Optimización de MEPS.

La eliminación de proteínas en matrices biológicas puede llevarse a cabo usando ácido o calor, o añadiendo disolventes orgánicos, tales como metanol para la precipitación de las proteínas. Una parte del contenido de fosfolípidos en las muestras de plasma también se elimina mediante la adición de disolventes orgánicos. Además, el uso combinado de adsorbentes a base de sílice permite la eliminación de grandes cantidades de fosfolípidos en los extractos, al incluir un paso de lavado con metanol [27]. En este caso, se añadieron 200 µL de metanol a una muestra de plasma antes del procedimiento de MEPS, básicamente para la eliminación de compuestos endógenos.

La selección de disolventes de elución y lavado se realizó antes del diseño de screening. Todos los experimentos de optimización de MEPS se hicieron sobre una muestra de plasma blanco conteniendo las drogas en una concentración adicionada de 1 µg/mL. Los MEPS se acondicionaron pasando 1x100 µL de MeOH y

luego 1x100 µL de agua ultrapura antes del primer uso para activar y garantizar la reproducibilidad. Inicialmente, se utilizaron las siguientes condiciones generales de trabajo: Diez ciclos de extracción y extracción, sin paso de lavado y 100 µL de disolvente de elución. Todos los análisis se realizaron por triplicado (n = 3). En estudios anteriores sobre extracción de drogas de abuso, se muestra que se obtienen resultados satisfactorios con diferentes fases utilizando SPE, concretamente con cartuchos de fase reversa como Oasis HLB [12] o Strata X [28] e intercambio catiónico de fase inversa, como Oasis MCX [29] o Bond Elut Certify [30]. En base a estos datos, los experimentos preliminares con MEPS se realizaron utilizando un adsorbente C8/SCX, de modo mixto, aunque se evaluaron más tarde diferentes tipos de adsorbentes, utilizando un diseño experimental.

El disolvente de elución debe ser un disolvente orgánico o una mezcla capaz de eluir los analitos retenidos en el adsorbente después de la carga de la muestra. Este disolvente debe eluir selectivamente los analitos de la fase en un volumen pequeño y evitar pérdidas [16]. Se evaluaron acetonitrilo, metanol y mezclas de disolventes en dos fases tales como agua: MeOH (50:50, v/v), agua: ACN (50:50, v/v) y ácido fórmico acuoso al 0,1%: ácido fórmico en ACN al 0,1% (50:50, v/v) con el fin de seleccionar un disolvente de extracción adecuado (todos los ensayos se realizaron por triplicado). Tanto los disolventes puros como las mezclas binarias no mostraron resultados satisfactorios para la extracción simultánea de las drogas. Se realizó un segundo experimento, estudiando otros disolventes, incluyendo disolventes de elución trifásicos. El uso de DCM, combinado con una disolución de alcohol e hidróxido amónico, ya había dado buenos resultados en la SPE [12, 28, 30]. Por esta razón, se ensayaron mezclas ternarias de hidróxido amónico: DCM: 2-propanol con diferentes proporciones para seleccionar el disolvente de elución adecuado (Figura 48a). Se observó que todos los disolventes de elución proporcionaban buenos resultados para metilona y metadona; sin embargo, la eficacia de la extracción de MDPV, mefedrona, BEG, cocaína, cocaetileno y EDDD usando cualquier combinación de los disolventes de elución trifásicos fue mejor que con MeOH o ACN-hidróxido amónico. Además, la extracción de BEG, cocaína y MDPV se logró usando DCM: 2-

propanol: hidróxido amónico. Entre las fases ternarias evaluadas, el disolvente de elución seleccionado fue DCM: 2-propanol: hidróxido amónico (78: 20: 2, v/v/v) porque mostró una mejor reproducibilidad que las otras combinaciones.

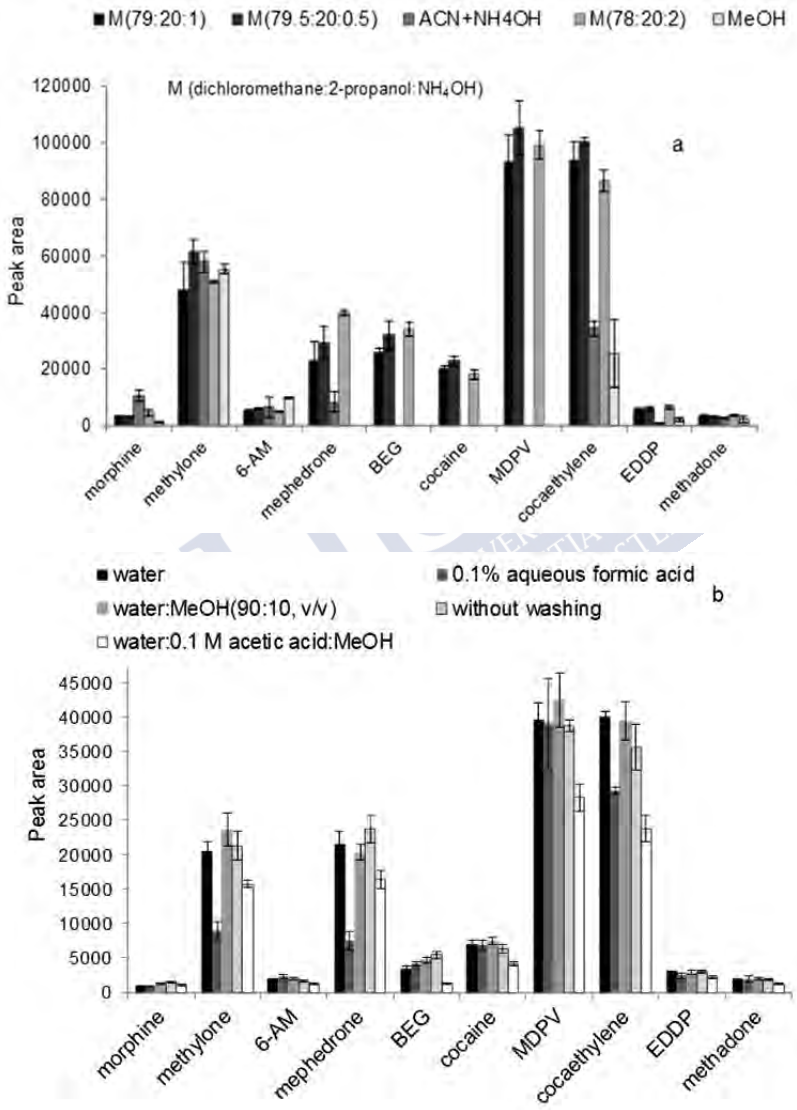


Figura 48: Efecto de (a) elución del disolvente y (b) Disoluciones de lavado, en la eficiencia de extracción de MEPS de los fármacos diana (n = 3)

Se evaluó el uso de diferentes disolventes de lavado antes de la etapa de elución (n=3). La etapa de lavado se realiza para eliminar interferencias débilmente retenidas, con una pérdida mínima de las drogas. Para la optimización del lavado, se bombearon 100 μL de diferentes disoluciones acuosas a través del cartucho MEPS a un flujo de 10 μL/seg basándose en la bibliografía [19-21, 31-34] (Figura 48b). El uso de ácido acético en el disolvente de lavado produjo una pérdida de analitos. Cuando el adsorbente se lavó posteriormente con agua ultrapura (100 μL), ácido acético 0,1M (100 μL) y metanol (100 μL), los resultados no fueron satisfactorios por pérdida de alguno de los analitos que fueron eluidos antes [35]. Cuando se utilizó ácido fórmico en el disolvente de lavado, se perdió una cantidad significativa de metilona, mefedrona y cocaetileno en el eluato, en contraste con los resultados de otros estudios [19, 31-33, 36].

La mezcla agua: metanol (90:10, v/v) fue la seleccionada pues asegura la obtención de extractos limpios y recuperaciones satisfactorias. Esta decisión es consistente con el uso de mezclas agua/metanol usadas en otras aplicaciones de MEPS [22, 34]

Otros factores que afectan a la eficacia de la MEPS (b_1: volumen de muestra, b_2: tiempo de secado del adsorbente, b_3: volumen de lavado, b_4: volumen de elución, b_5: número de strokes ó ciclos, b_6: fase y b_7: pH) se optimizaron utilizando un diseño experimental. Las condiciones experimentales del diseño de screening se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27. Condiciones experimentales para el diseño de screening asimétrico $2^2 3^4 4^1$//18 experimentos en la MEPS de drogas de abuso a partir del plasma

N°Exp	Orden aleatorio	Volum muestra (µL)	Tiempo secado (min)	Volum lavado (µL)	Volum elución (µL)	Nº ciclos	Sorbente	pH
1	3	100	0,5	50	50	2	C8	7
2	11	300	2	100	100	5	C18	7
3	1	100	0,5	200	500	10	C8/SCX	7
4	6	100	0.5	100	100	10	C8/SCX	8
5	8	300	2	200	500	2	C8	8
6	17	100	0,5	50	50	5	C18	8
7	10	100	2	50	500	5	C8/SCX	9
8	12	300	0,5	100	50	10	C8	9
9	7	100	0,5	200	100	2	C18	9
10	15	100	0,5	200	100	5	C8	10
11	18	300	0,5	50	500	10	C18	10
12	14	100	2	100	50	2	C8/SCX	10
13	16	100	2	200	50	10	C18	7
14	2	300	0,5	50	100	2	C8/SCX	7
15	9	100	0,5	100	500	5	C8	7
16	5	100	0,5	100	500	2	C18	8
17	13	300	0,5	200	50	5	C8/SCX	8
18	4	100	2	50	100	10	C8	8

Los resultados pueden ser ilustrados mediante diagramas de barras como los *gráficos de pesos delta* [26] que representan los efectos diferenciales de cada factor cuando son considerados dos niveles diferentes, tomados dos a dos. La longitud de las barras es proporcional a la magnitud relativa del efecto, la cual es negativa para las barras que se dirigen hacia la izquierda y positiva para las que se dirigen hacia la derecha. Las líneas punteadas de los diagramas de pesos delta representan los niveles de significación estadística, determinados mediante el método de Lenth [26]. Cuando las barras de efectos superan este umbral, el efecto de ese nivel sobre la respuesta es estadísticamente significativo en un intervalo de confianza del 95%. Si un efecto es positivo, la respuesta aumenta cuando el factor se mueve del nivel bajo al nivel alto; lo contrario ocurre si el efecto es

negativo. El signo y el valor de los efectos hacen posible seleccionar el mejor nivel para cada parámetro experimental. Además, los *gráficos de efectos totales* [26] en los cuales las barras son proporcionales al efecto de cada nivel de factor en la respuesta analítica también se usaron para determinar el nivel más adecuado de cada variable, cuando éste no es estadísticamente significativo.

Las respuestas (áreas de los picos) del diseño experimental se evaluaron usando ANOVA, y todos los factores estudiados, excepto el volumen de elución (b_4), presentaron significación estadística con un intervalo de confianza del 95% para algunas de las drogas estudiadas. Cuatro factores (b_1: volumen de muestra, b_2: tiempo de secado del sorbente, b_5: número de ciclos de extracción y b_7: pH) fueron estadísticamente significativos para cocaetileno. Tres factores (b_3: volumen de lavado, b_6: fase de adsorbente y b_7: pH) fueron estadísticamente significativos para morfina. Dos factores (b_5: número de ciclos de extracción y b_6: fase de adsorbente) fueron estadísticamente significativos para mefedrona. El número de ciclos de extracción (b_5) fue el único factor estadísticamente significativo para cocaína, MDPV y metadona, mientras que la fase de adsorbente (b_6) fue el único factor estadísticamente significativo para 6AM y metilona. Cualquier factor fue estadísticamente significativo para EDDP y BEG. La significación estadística en la respuesta para cocaetileno y mefedrona se muestra como un ejemplo en las Figuras 49a y 49b y representan las gráficas de pesos delta que son útiles cuando se comparan los efectos relativos de los cambios de nivel en una variable. Paralelamente, se muestran los gráficos de los efectos totales de cocaetileno (Figura 49c) y mefedrona (Figura 49d). Un nivel alto de ciclos de extracción (10) y un nivel bajo de tiempo de secado del adsorbente (0,5 min) proporcionó las mejores respuestas para todas las drogas. La mayoría de estas sustancias mostraron las mejores respuestas para la extracción usando un adsorbente mixto (C8/SCX), excepto morfina y metadona que mostraron respuestas ligeramente mejores usando una fase C18. Finalmente, la fase C8/SCX fue la seleccionada para el proceso de MEPS simúltáneo de todos los analitos.

Se observó que la mejor extracción para cocaetileno, morfina, cocaína y MDPV se conseguía con un nivel alto de volumen de muestra (300 µL), mientras que metilona, 6AM, BEG y EDDP presentaron respuestas de extracción similares que mefedrona para el nivel bajo de volumen de muestra (100 µL). La influencia de este factor fue estadísticamente significativa en el nivel alto para cocaetileno, por lo tanto, finalmente se selecionó el valor de 300 µL como el volumen óptimo de muestra para el proceso de MEPS.

Las mejores extracciones se obtuvieron con los niveles más altos de volumen de lavado (100 ó 200 µL), a excepción de morfina para la que el nivel bajo (50 µL) era estadísticamente significativo. Finalmente, se seleccionó un valor medio (150 µL) como una solución de compromiso para el proceso de MEPS de todas las drogas.

Se observó que la eficacia de extracción aumenta al aumentar el volumen de elución (500 µL) para morfina, metilona, BEG, MDPV, cocaetileno, EDDP y metadona. El nivel medio del volumen de elución (100 µL) conduce a las respuestas más altas para 6AM, mefedrona y cocaína. De acuerdo con los resultados obtenidos, se adoptó un valor intermedio de volumen de elución (200 µL) para la extracción simultánea de todas las drogas.

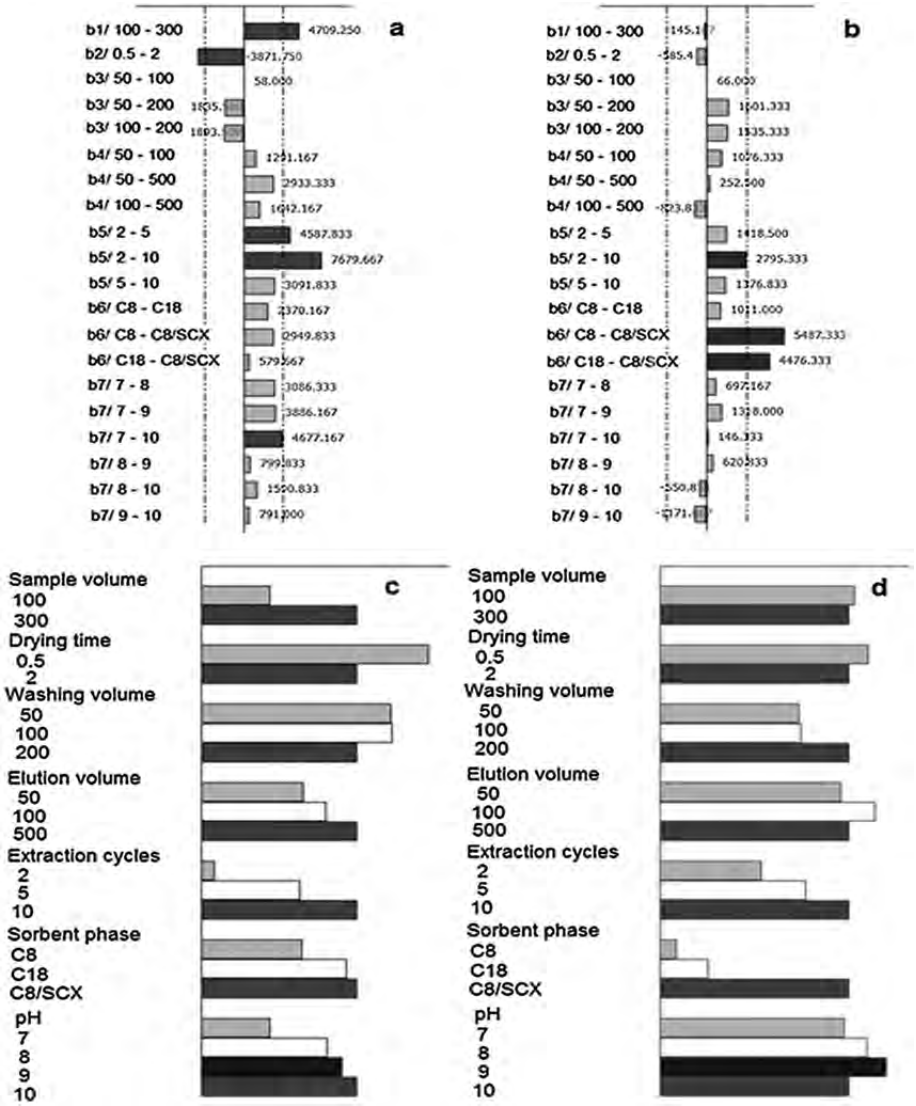


Figura 49: Estudio gráfico de los efectos de los factores en los MEPS basados en los diagramas de pesos delta para (a) cocaetileno y (b) mefedrona, y los diagramas de efectos totales para (c) cocaetileno y (d) mefedrona. Las unidades de barra son las áreas de pico cromatográficos

En base a los resultados del estudio de optimización del proceso de preparación de muestra, se puede observar que la eficacia de la extracción para la mayoría de las drogas mejoró a pH alcalino. Esto se debe al hecho de que, a un pH alto, la mayoría de las sustancias estudiadas (con pKa cercanos a 8) estaban en la disolución, en forma ionizada. Por lo tanto, se llevó a cabo una serie adicional de experimentos (n = 3) estudiando el pH de manera más detallada en un rango entrea pH 7 y 10. En general, se encontró que la extracción a pH 8 era la más adecuada (Figura 50).

Para maximizar la extracción simultánea de las diez drogas, se seleccionaron las siguientes condiciones experimentales en MEPS: volumen de muestra, 300 µL; pH:8; tipo de adsorbente, C8/SCX; número de strokes, 10; volumen de agua: MeOH (90:10, v/v) para la etapa de lavado, 150 µL; tiempo de secado del adsorbente, 0,5 min; volumen de DCM: 2-propanol: hidróxido amónico (78: 20: 2, v/v/v) para la elución, 200 µL.

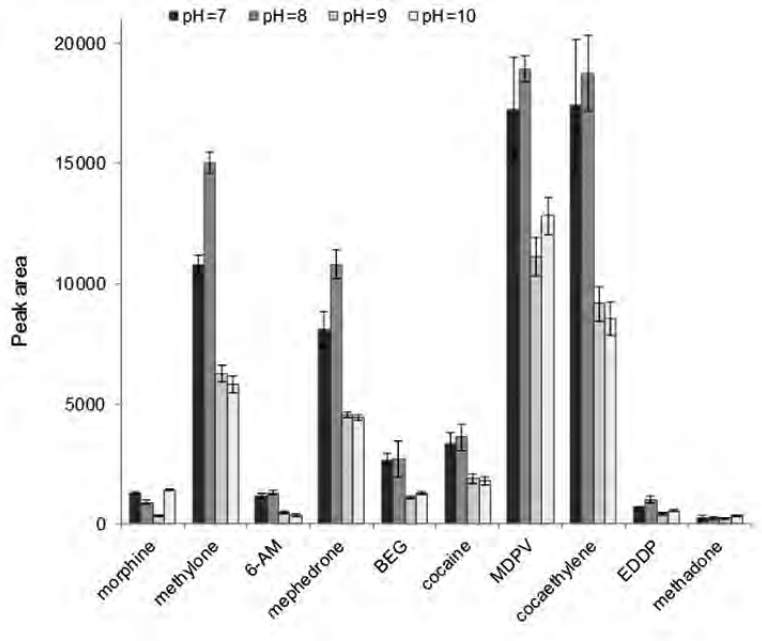


Figura 50: Efecto del pH en la eficiencia de extracción mediante MEPS de drogas usando las condiciones óptimas.

4.3.2. Validación del método analítico.

En las condiciones óptimas mencionadas anteriormente, el rendimiento del método MEPS-UPLC-PDA se evaluó, de acuerdo con las directrices de guías de validación internacionales como la Food Drug Administration (FDA) e International Conference on Harmonisation (ICH) [37, 38], en los siguientes términos: selectividad, linealidad, límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ), precisión y exactitud. La selectividad del método fue probada por la ausencia de picos interferentes a los tiempos de retención de los compuestos estudiados, y se muestra en la Figura 51, que refleja un tiempo de análisis corto (menos de 3 min) para separar los compuestos de interés. Para evaluar la linealidad, los gráficos de calibración se construyeron con seis niveles de concentración en el rango de 0,05-10 μg/mL, por triplicado. Se calcularon las ecuaciones de regresión lineal representando el área del pico del analito, frente a su concentración en seis muestras de plasma libre de drogas usando el método de adición estándar. Esta calibración se realiza con alícuotas de la muestra no enriquecida y de la muestra enriquecida con cantidades conocidas de patrón mezcla, a diferentes niveles de concentración. La linealidad se determinó mediante análisis de regresión lineal con coeficientes de determinación (r^2) mayores que 0,9923 (Tabla 28).

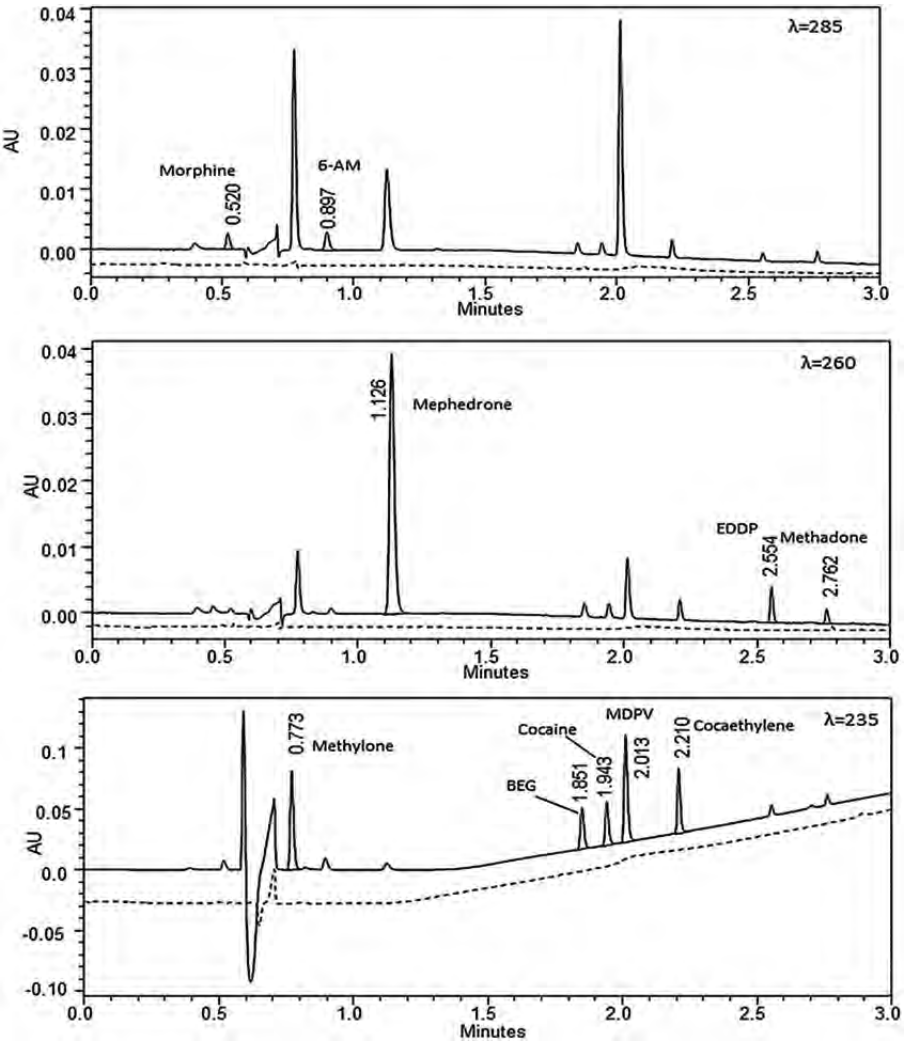


Figura 51: Cromatogramas obtenidos mediante MEPS-UPLC-PDA en una muestra de plasma libre de drogas (línea punteada) y plasma enriquecido con todas las drogas bajo investigación a una concentración de 1 µg/mL (línea continua). Las líneas del cromatograma están espaciadas artificialmente

Tabla 28: Parámetros de validación.

Analito	r^2	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	Efecto matriz (%)
Morfina	0,9953	0,025	0,05	91,3
Metilona	0,9976	0,025	0,05	7,7
6-AM	0,9984	0,025	0,05	50,3
Mefedrona	0,9995	0,005	0,01	67,2
BEG	0,9972	0,01	0,025	96,0
Cocaína	0,9923	0,01	0,025	74,4
MDPV	0,9982	0,01	0,025	42,4
Cocaetileno	0,9984	0,01	0,025	60,9
EDDP	0,9965	0,01	0,025	59,7
Metadona	0,9981	0,025	0,05	61,2

El efecto matriz [39] se determinó a partir de las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas en plasma blanco enriquecido después de la extracción "calibración matrix-matched" (b_1) y de patrones preparados en disolvente (b_2) para cada droga de abuso, usando la siguiente ecuación [40]:

$$\%\text{Efecto matriz} = \frac{b_1 - b_2}{b_2} \times 100$$

El efecto matriz podría ser ignorado si los valores son inferiores o iguales a 10 %. Según los resultados obtenidos (Tabla 28), el efecto matriz depende del origen de la muestra y puede afectar a la señal instrumental. Como se observa efecto matriz en varios compuestos, se recomienda el método de calibración de adición estándar para la cuantificación de las muestras procedentes de sujetos intoxicados.

Los LODs variaron desde 0,005 µg/mL para mefedrona a 0,025 µg/mL para morfina, metilona, 6AM y metadona. Los LOQs variaron desde 0,01 µg/mL para mefedrona, a 0,05 µg/mL para morfina,

metilona, 6AM y metadona. La precisión del método se estudió usando muestras de plasma de control de calidad (QC) enriquecidas con concentraciones bajas (0,1 μg/mL), medias (0,5 μg/mL) y altas (2,5 μg/mL), dentro del rango lineal de las curvas de calibrado de los compuestos, y tratadas por MEPS. Se realizaron seis replicados en el mismo día para obtener la repetibilidad (precisión intradía) y para el estudio de precisión intermedia (precisión interdía), se realizó el mismo protocolo en cinco repeticiones para muestras de plasma QC analizadas en días diferentes**.** Los resultados de la precisión intradía e interdía, expresados como desviaciones estándar relativas (%RSD) de las áreas de los picos, se muestran en la Tabla 29. Los valores de la precisión intradía en los tres niveles diferentes oscilaron entre 0,9 y 13,8%, mientras que la precisión interdía varió de 1,2 a 13,8%. La exactitud del método MEPS/UPLC-PDA se evaluó a través de un estudio de recuperación que se llevó a cabo utilizando las muestras de plasma QC anteriores, con seis repeticiones para cada uno de los tres niveles de concentración, anteriormente indicados. Los valores de la recuperación (%) se calcularon como se muestra a continuación:

$$\%\ Recuperación = (Concentración\ obtenida / Concentración\ añadida) \times 100$$

donde la concentración obtenida es la concentración de la droga, medida en muestras de plasma de control de calidad (QC), y la concentración añadida se refiere al nivel de concentración de las drogas añadido a las muestras de plasma de control de calidad (QC). La Tabla 29 recoge la precisión del método a los niveles bajo, medio y alto, mostrando recuperaciones entre 85,2% para MDPV y 104,5% para 6AM, al nivel bajo; entre 79,6% para morfina y 100% para metadona, al nivel medio; y entre 96,5% para metilona y 100,4% para morfina, al nivel alto.

Tabla 29: Precisión intradía e interdía del método propuesto a partir de muestras de plasma de control de calidad (QC), enriquecidas con las drogas estudiadas.

Analito	Precisión (n=6)			Exactitud	
	QC (µg/mL)	Intradía (%RSD)	Interdía (%RSD)	%Recuperación	%RSD
Morfina	0,1	3,7	5,8	99	10,6
	0,5	2,8	9,7	79,6	2,6
	2,5	4,9	4,9	100,4	1,1
Metilona	0,1	3,0	11,3	97,3	6,5
	0,5	2,0	8,5	96,2	2,0
	2,5	3,0	6,6	96,5	4,7
6AM	0,1	5,5	5,2	104,5	7,4
	0,5	8,9	12,4	98	7,2
	2,5	2,7	11,6	100	2,5
Mefedrona	0,1	5,4	12,7	101	7,2
	0,5	1,1	4,9	98,7	5,1
	2,5	7,4	13,6	99,8	0,9
BEG	0,1	2,8	2,7	94,5	11,4
	0,5	1,8	11,6	88,2	0,3
	2,5	12,5	12,5	99,5	1,9
Cocaína	0,1	9,7	10,9	96,5	6,0
	0,5	6,9	9,2	99,5	4,3
	2,5	10,6	10,6	100,2	1,0
MDPV	0,1	0,9	11,8	85,2	4,6
	0,5	6,0	1,2	98,2	2,3
	2,5	13,5	10,1	97,7	4,4
Cocaetileno	0,1	3,1	10,5	98,2	2,1
	0,5	7,9	11,6	99,5	2,5
	2,5	13,8	13,8	100	1,0
EDDP	0,1	10,6	12,4	92,8	13,5
	0,5	8,8	4,3	94	4,2
	2,5	11,5	11,5	98,8	4,6
Metadona	0,1	9,4	7,8	94,6	8,5
	0,5	9,2	10,9	100	7,5
	2,5	4,6	4,6	98,7	2,6

4.3.3. Aplicación del método a muestras de plasma.

Tras la validación del método MEPS-UPLC-PDA, utilizando las condiciones experimentales optimizadas y descritas anteriormente, se aplicó con éxito para el cribado primario de veinticuatro muestras de plasma obtenidas de individuos intoxicados por drogas de abuso en Galicia. Las muestras se midieron por triplicado, excepto para las muestras 1, 5, 6 y 10, que se hicieron por duplicado porque se disponía de una cantidad limitada de plasma. Se detectaron veinte casos positivos a cinco drogas de abuso (Tabla 30). Las muestras evaluadas pertenecen a individuos que consumieron varias drogas de abuso u otras sustancias (benzodiacepinas, antiepilépticos, etc.), que probablemente podrían ser la causa de la muerte. La morfina fue detectada y cuantificada en 7 casos (rango: <LOQ-7,88 ng/mL). SE detectó y cuantificó BEG en 9 casos (rango: <LOQ-4,21 ng/mL) mientras que la cocaína se encontró en 4 casos (desde trazas hasta 0,32 ng/mL). 8 casos fueron positivos a metadona, con niveles entre 0,09 y 1,29 ng/mL. La presencia de tres o más sustancias se detectó en 5 casos. La Tabla 28 muestra que el 50% de los sujetos consumió morfina, el 33% consumió metadona, el 33% consumió cocaína, mientras que la BEG aparece vinculada al consumo de cocaína en el 46% de los casos. Finalmente, el 8% de los individuos consumieron heroína, como lo demuestra la presencia de su metabolito 6AM, con niveles desde 0,05 a 7,9 μg/mL. Las catinonas sintéticas no se encontraron en las muestras analizadas; sin embargo, es importante disponer de un método optimizado para detectar la presencia de estas drogas, cuya presencia es cada día más habitual en todo el mundo. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros trabajos basados en la microextracción líquido líquido con fines forenses [9,13].

Para demostrar el potencial del método propuesto MEPS-UPLC-PDA, se comparó con un método de confirmación inequívoco usado en toxicología clínica y forense y que se basa en SPE-GC-MS [41]. Ambos métodos se aplicaron al análisis de dieciséis muestras (Tabla 30) poniéndose de manifiesto la obtención de valores similares por ambos métodos. Algunos resultados para morfina, obtenidos por MEPS-UPLC-PDA, fueron ligeramente menores que los obtenidos

por SPE-GC-MS. En la muestra con el código 16, se obtuvieron valores de concentración inversa de morfina y 6AM cuando se aplicaron ambos métodos; la razón podría atribuirse al proceso de desacetilación de 6AM en la morfina, ya que el análisis que utiliza el método propuesto se realizó posteriormente al uso del método de rutina SPE-GC-MS. Comparando los resultados obtenidos con los niveles terapéuticos, tóxicos o letales de cocaína, metadona y morfina [42], se observa que el 37,5% de las muestras presentan concentraciones letales y el 21% se corresponden con niveles tóxicos.

Tabla 30: Resultados obtenidos del análisis de muestras reales utilizando DLLME-UPLC-PDA y SPE-GC-MS

Muestra	Droga	Concentración encontrada por MEPS-UPLC-PDA: media ± desviación estándar (µg/mL)	Concentración encontrada por SPE-GC-MS (µg/mL)	Presencia de otras drogas (µg/mL)
1	Cocaína BEG Morfina	0,05 0,1 <LOQ	0,04 0,1 0,1	-
2	Metadona Morfina	1,0 ± 0,1 <LOQ	1,1 0,02	-
3	BEG	0,4 ± 0,04	0,3	-
4	Metadona	1,3 ± 0,01	2,0	-
5	Morfina	7,9	6,1	-
6	Cocaína BEG	<LOQ 1,1	0,03 1,2	-
7	Metadona	0,1 ± 0,06	0,1	-
8	BEG	0,1 ± 0,02	0,1	-
9	Cocaína BEG Morfina	0,3 ± 0,001 1,4 ± 0,1 0,2 ± 0,01	0,4 1,3 0,3	-
10	Metadona	0,4	0,3	Cannabis en orina
11	Cocaína BEG Morfina	0,05 2,6 ± 0,01 <LOQ	0,05 2,5 0,04	Codeína 0,01

12	Morfina	<LOQ	0,05	-
13	Morfina	0,2 ± 0,01	0,3	-
14	Metadona	0,1 ± 0,01	0,1	Topiramato 13,7 Nordiazepan 0,6 Oxazepan 0,1
15	Cocaína BEG	<LOQ <LOQ	0,03 0,02	Alcohol 3,3
16	6AM Morfina	0,2 ± 0,04 0,4 ± 0,03	0,3 0,2	-
17	Morfina BEG Cocaína Metadona	0,2 ± 0,01 0,2 ± 0,01 0,1 ± 0,03 0,4 ± 0,01	-	-
18	Morfina 6AM	0,7 ± 0,1 4,7 ± 0,05	-	Codeína, Mirtazapina, Alprazolan, Alcohol
19	Cocaína BEG	<LOQ <LOQ	-	Alcohol
20	BEG	4,2 ± 0,1	-	-
21	Metadona Cocaína BEG	0,1 ± 0,02 <LOQ 0,4 ± 0,01	-	-
22	Morfina	0,2 ± 0,02	-	-
23	Morfina	<LOQ	-	-
24	Metadona	0,1	-	-

4.3.4. Bibliografía.

[1] Mounteney J, Griffiths P, Sedefov R, Noor A, Vicente J, Simon R. “The drug situation in Europe: an overview of data available on illicit drugs and new psychoactive substances from European monitoring in 2015” Addiction 2016; 111: 34-48.

[2] Chung H, Lee J, Kim E. “Trends of novel psychoactive substances (NPSs) and their fatal cases” Forensic Toxicol. 2016; 34: 1-11.

[3] Baumann MH, Solis Jr E, Watterson LR, Marusich JA, Fantegrossi WE, Wiley JL. “Baths salts, spice, and related designer drugs: the science behind the headlines” J. Neurosci. 2014; 34: 15150-15158.

[4] Souza Peliç F, Dadalto Peres M, Fornaciari Pissinate J, Spinosa De Martinis B. “A one-step extraction procedure for the screening of cocaine, amphetamines and cannabinoids in postmortem blood samples” J. Anal. Toxicol. 2014; 38: 341-348.

[5] Alvarez I, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P, López P. “Determination of cocaine and cocaethylene in plasma by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry” J. Chromatogr. B 2007; 845: 90-94.

[6] Falcon M, Pichini S, Joya J, Pujadas M, Sanchez A, Vall O, et al. “Maternal hair testing for the assessment of fetal exposure to drug of abuse during early pregnancy: comparison with testing in placental and fetal remains” Forensic Sci. Int. 2012; 218: 92-96.

[7] Sorensen LK, Hasselstrom JB. “A high-throughput multi-class liquid chromatography tandem mass spectrometry method for quantitative determination of licit and illicit drugs in whole blood” Anal. Methods 2013; 5: 3185-3193.

[8] Shen M, Chen H, Xiang P. “Determination of opiates in human finger nail-comparison to hair” J. Chromatogr. B 2014; 967: 84-89.

[9] 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 app” Microchem. J. 2015; 123: 33-41.

[10] Fernández P, Lago M, Lorenzo RA, Carro AM, Bermejo AM, Tabernero MJ. "Microwave assisted extraction of drugs of abuse from human urine" J. Appl.Toxicol. 2007; 27: 373-379.

[11] Fernández P, Seoane S, Vázquez C, Bermejo AM, Carro AM, Lorenzo RA. "A rapid analytical method based on microwave-assisted extraction for the determination of drugs of abuse in vitreous humor" Anal.Bioanal. Chem. 2011; 401: 2177-2186.

[12] Fernández P, Seoane S, Vázquez C, Tabernero MJ, Carro AM, Lorenzo RA. "Chromatographic determination of drugs of abuse in vitreous humor using solid-phase extraction" J. Appl. Toxicol. 2013; 33: 740-745.

[13] Fernández P, Regenjo M, Bermejo AM, Fernández AM, Lorenzo RA, Carro AM. "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.

[14] Baciu T, Borrull F, Aguilar C, Calull M. "Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair" Anal. Chim. Acta 2015; 856: 1-26.

[15] 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 gaschromatography-mass spectrometry" J. Chromatogr. B 2004; 801: 317-321.

[16] Moein MM, Abdel-Rehim A, Abdel-Rehim M. "Microextraction by packed sorbent (MEPS)" Trends Anal. Chem. 2015; 67: 34-44.

[17] 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.

[18] da Fonseca BM, Moreno IED, Barroso M, Costa S, Queiroz JA, Gallardo E. "Determination of seven selected antipsychotic drugs in human plasma using microextraction in packed sorbent and gas

chromatography–tandem mass spectrometry" Anal. Bioanal. Chem. 2013; 405: 3953-3963.

[19] Gonçalves JL, Alves VL, Conceição CF, Teixeira HM, Câmara JS. "Development of MEPS-UHPLC/PDA methodology for the quantification of clozapine, risperidone and their major active metabolites in human urine" Microchem. J. 2015; 123: 90-98.

[20] 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.

[21] Magiera S, Kusa J. "Evaluation of a rapid method for the therapeutic drug monitoring of aliskiren: enalapril and its active metabolite in plasma and urine by UHPLC–MS/MS" J. Chromatogr. B 2015; 980: 79-87.

[22] Saracino MA, Santarcangelo L, Raggi MA, Mercolini L. "Microextraction by packed sorbent (MEPS) to analyse catecholamines in innovative biological samples" J. Pharm. Biomed. Anal. 2015; 104: 122-129.

[23] Saracino MA, Iacono C, Somaini L, Gerra G, Ghedini N, Raggi MA. "Multi-matrix assay of cortisol, cortisone and corticosterone using a combined MEPS-HPLC procedure" J. Pharm. Biomed. Anal. 2014; 88: 643-648.

[24] Moreno IED, da Fonseca BM, Barroso M, Costa S, Queiroz JA, Gallardo E. "Determination of piperazine-type stimulants in human urine by means of microextraction in packed sorbent and high performance liquid chromatography-diode array detection" J. Pharm. Biomed. Anal. 2012; 61: 93-99.

[25] Montesano C, Simeoni MC, 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.

[26] Lewis GA, Mathieu D D, Phan-Tan-Luu R. “Pharmaceutical experimental design” New York: Marcel Dekker; 1999.

[27] Bylda C, Thiele R, Kobold U, Volmer KA. “Recent advances in samplepreparation techniques to overcome difficulties encountered duringquantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS” Analyst 2014; 139: 2265-2276.

[28] de Castro A, Lendoiro E, Fernández-Vega H, Steinmeyer S, López-Rivadulla M, Cruz A. “Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of selected synthetic cathinones and two piperazines in oral fluid. Crossreactivity study with an on-site immunoassay device” J. Chromatogr. A 2014; 1374: 93–101.

[29] Ramírez Fernández MM, Fazio V, Wille SMR, Kummer N, Samyn N. “A quantitative, selective and fast ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 33 basic drugs in hair (amphetamines, cocaine, opiates, opioids and metabolites)” J. Chromatogr. B 2014; 965: 7-18.

[30] Lerch O, Temme O, Daldrup T. “Comprehensive automation of the solid phase extraction gas chromatographic mass spectrometric analysis (SPE-GC/MS) of opioids cocaine, and metabolites from serum and other matrices” Anal. Bioanal. Chem. 2014; 406: 4443–4451.

[31] Gonçalves JL, Alves VI, Rodrigues FP, Figueira JA, Câmara JS. “A semi-automatic microextraction in packed sorbent using a digitally controlled syringe, combined with ultra-high pressure liquid chromatography as a new and ultra-fast approach for the determination of prenylflavonbids in beers” J. Chromatogr. A 2013; 42-51: 1304.

`[32] Perestrelo R, Silva CL, Câmara JS. “Quantification of furanic derivatives in fortified wines by a highly sensitive and ultrafast analytical strategy based on digitally controlled microextraction by packed sorbent combined with ultra-high pressure liquid chromatography” J. Chromatogr. A 2015; 1381: 54-61.

[33] Mendes B, Silva P, Mendonça I, Pereira J, Câmara JS. "A new and fast methodology to assess oxidative damage in cardiovascular diseases risk development through eVol-MEPS–UHPLC analysis of four urinary biomarkers" Talanta 2013; 116: 164–172.

[34] Candish E , Gooley A , Wirth HJ, Dawes PA, Shellie RA, Hilder EF. "A simplified approach to direct SPE-MS" J. Sep. Sci. 2012; 35: 2399-2406.

[35] 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.

[36] Alves V, Gonçalves J, Conceição C, Teixeira HM, Câmara JS. "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.

[37] Food and Drug Administration (FDA), U.S. Department of Health and Human Services. "Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation" [Online].; 2001. Available from: http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf.

[38] ICH International Conference on Harmonisation. "Harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)" [Online].; 2005. Available from: http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2(R1).PDF.

[39] Campillo N, Viñas P, Feırez-Melgarejo G, Hernáındez-Cóırdoba M. "Liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry for the determination of neonicotinoid insecticides in honey samples using dispersive liquid–liquid microextraction" J. Agric. Food Chem. 2013; 61: 4799-4805.

[40] García-Galán MJ, Petrovic M., Rodríguez-Mozaz S, Barceló D. "Multiresidue trace analysis of pharmaceuticals: their human

metabolites and transformation products by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry" Talanta 2016; 158: 330-341.

[41] López P, Bermejo AM , Tabernero MJ, Fernández P, Álvarez I. "Determination of cocaine and heroin with their respective metabolites in human hair using gas chromatography-mass spectrometry" Anal. Letters 2006; 39: 2307-2316.

[42] Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Watts J. "Clarke´s Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material" London: Pharmaceutical Press 4ed. 2011.

.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.4. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN SALIVA MEDIANTE US-DLLME - UPLC-MS/MS.

Según un informe publicado en 2016 por el Centro Europeo de Monitoreo de Drogas y Adicciones a las Drogas (EMCDDA), el mercado de drogas ha aumentado en complejidad debido a la disponibilidad de nuevas sustancias psicoactivas (NPS) a través de Internet, de sus efectos estimulantes más potentes en comparación con drogas clásicas ya consumidas, de los nuevos patrones de uso de drogas múltiples y de la falta de regulación. La escasa información sobre NPS y el uso de drogas de alto riesgo se ha convertido en una amenaza para la salud pública y la seguridad en la conducción y justifica la necesidad de desarrollar políticas y metodologías de control rápidas y confiables. [1-3]

Las catinonas sintéticas son el segundo grupo más grande de NPS que vigila el EMCDDA. Desde que se detectaron por primera vez en Europa en 2004, se han identificado 103 nuevas catinonas: 31 en 2014 y 26 en 2015. [1] Generalmente se venden como sustitutos “legales” de drogas estimulantes como la anfetamina, la MDMA y la cocaína. [1-3]

Recientemente, una droga no recreativa, la escopolamina, está ganando popularidad debido a sus efectos alucinógenos por el mal uso para sedar y manipular a las víctimas de robos o violaciones. [4]

El test de detección de fluido oral (OF) es ideal para detectar la ingesta reciente de drogas en situaciones como infracciones de tránsito, accidentes o agresión sexual. El test OF requiere una pequeña muestra que se recoge bajo supervisión directa, lo que reduce la posible adulteración y refleja el uso reciente de drogas. Las drogas que se analizan con mayor frecuencia son THC (marihuana), opiáceos, cocaína, anfetaminas, metanfetaminas, éxtasis y PCP (fenciclidina) [5]. Además, los diferentes dispositivos de recolección de OF están destinados a detectar la presencia o no de drogas y metabolitos en la saliva con umbrales de concentración predeterminados, pero se requiere un análisis cuantitativo más exhaustivo en el laboratorio. Los métodos de screening son herramientas limitadas para identificar muestras positivas en el análisis de NPS en fluido biológico, y se

requieren técnicas más selectivas y sensibles, como los métodos cromatográficos, para un propósito de confirmación. [6-8]

Por estos motivos se ha desarrollado un método para la determinación de 20 drogas de abuso, incluidas NSP, como 10 catinonas sintéticas, escopolamina y drugas utilizadas en programas de terapia de sustitución (metadona, naloxona y buprenorfina) en saliva.

La cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) es la técnica utilizada para separar y determinar las drogas de abuso como la metanfetamina, los cannabinoides en OF. Para evitar la etapa de derivación antes del análisis, algunos estimulantes de diseño se analizan en cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS / MS), incluidas algunas catinonas y cannabinoides [8-10], anfetaminas [11], y anfetaminas y opioides sintéticos [12, 13]

Se usan diversas técnicas para la extracción de estas drogas en fluidos biológicos, siendo las más habituales la SPE [8, 14] y la LLE [7, 13,15]. Sin embargo, una consideración importante en el uso de OF es la disponibilidad limitada de la muestra y la posibilidad de encontrar concentraciones de fármacos en niveles traza. Estos desafíos han motivado la necesidad de profundizar en el desarrollo de estrategias de preparación de muestras miniaturizadas. El uso creciente de NPS y los efectos adversos en la salud humana han llevado al desarrollo de métodos de microextracción para la determinación sensible de estos fármacos emergentes en matrices biológicas alternativas de interés toxicológico. En este sentido, la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) desarrollada por Assadi et al. en 2006 se basa en un sistema ternario de disolventes en el que los disolventes de extracción y dispersión se inyectan rápidamente en la muestra acuosa con una jeringa. Después de agitar suavemente la mezcla, se forma una solución turbia y los analitos se extraen en una gota obtenida por centrifugación. [16] Es un procedimiento sencillo, usado en aplicaciones de control forense, que utiliza volúmenes reducidos de muestra y disolventes [17,18]. Por tanto, es la técnica de preparación de muestra seleccionada en este trabajo. Para evaluar los factores que pueden influir en la misma, se ha

utilizado un diseño de screening asimétrico y un diseño de superficie de respuesta, con el fin de optimizar todos los parámetros influyentes y obtener finalmente las condiciones de trabajo [19]: 0,5 mL de saliva; 1,4 mL de metanol como precipitante y dispersante; pH 8; 0,1 g de NaCl; 200 µL de cloroformo como extractante y 5 min de ultrasonidos (US).

Para la identificación y determinación de las drogas se utilizó la cromatografía líquida de ultra eficacia, usando una columna Acquity UPLC BEH Shield RP18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7µm) y un detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo. Con ello se consiguió la separación de todas las drogas en 3,5 min.

El método fue validado, siguiendo las guías de validación de FDA, ICH y Eurachem [20-24] de manera satisfactoria en términos de linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y recuperación. Posteriormente, el método fue aplicado a muestras de saliva procedentes de individuos en proceso de desintoxicación, observando que en algunos casos se sigue consumiendo drogas y en otros se está llevando a cabo la toma de medicación pautada en el proceso de desintoxicación.

4.4.1. Optimización de las condiciones de US-DLLME.

El dispersante y el extractante se optimizaron previamente a la utilización del diseño de experimentos. La selección del disolvente dispersante se basó en la miscibilidad de éste con la fase acuosa y el disolvente extractante. Se probaron acetonitrilo, acetona, isopropanol, metanol, ácido fórmico al 0,1% en metanol e hidróxido amónico al 5% en metanol. Para estos ensayos se utilizaron las siguientes condiciones generales: fluido oral, 0.5 mL; sin adición de sal; pH 7; volumen de solvente extractante (cloroformo), 100 µL; tiempo de ultrasonido, 5.0 min; centrifugación 3500 rpm por 5.0 min

Como se muestra en la Figura 52a**,** las respuestas cromatográficas de las drogas con cada disolvente demostraron que la capacidad de extracción, usando metanol como dispersante, es adecuada para la extracción de los 14 analitos considerados, aunque para cinco catinonas y para escopolamina, el mejor dispersante es el metanol

ligeramente alcalinizado, por lo que el pH debe considerarse un factor a estudiar.

La selección de un disolvente extractante apropiado es esencial en US-DLLME. Considerando la bibliografía y las características necesarias para su elección, cloroformo ($CHCl_3$), dicloroetano ($C_2H_4Cl_2$), diclorometano (CH_2Cl_2), clorobenceno (C_6H_5Cl), tetracloruro de etileno (C_2Cl_4) y tetracloruro de carbono (CCl_4) fueron probados. Como se muestra en la Figura 52b, el cloroformo mostró los mejores resultados, a excepción de algunos compuestos como naloxona, metilona, butilona y mefedrona. La extracción de estos analitos mejoró al considerar y optimizar otros factores, como el pH o el volumen del dispersante.

Para realizar estas experiencias previas al diseño, las muestras de saliva se enriquecieron con una concentración de 100 ng/mL de patrón mezcla de drogas y de patrón interno, y se usaron las siguientes condiciones: 0,5 mL saliva, pH: 7, sin adición de sal, 2 mL de metanol como dispersante (en el primer caso se probaron los antes indicados), 200 µL de cloroformo como extractante (en la segunda experiencia se prueban los diferentes extractantes antes indicados), 5 min de US y centrifugación durante 5 min a 3500 rpm.

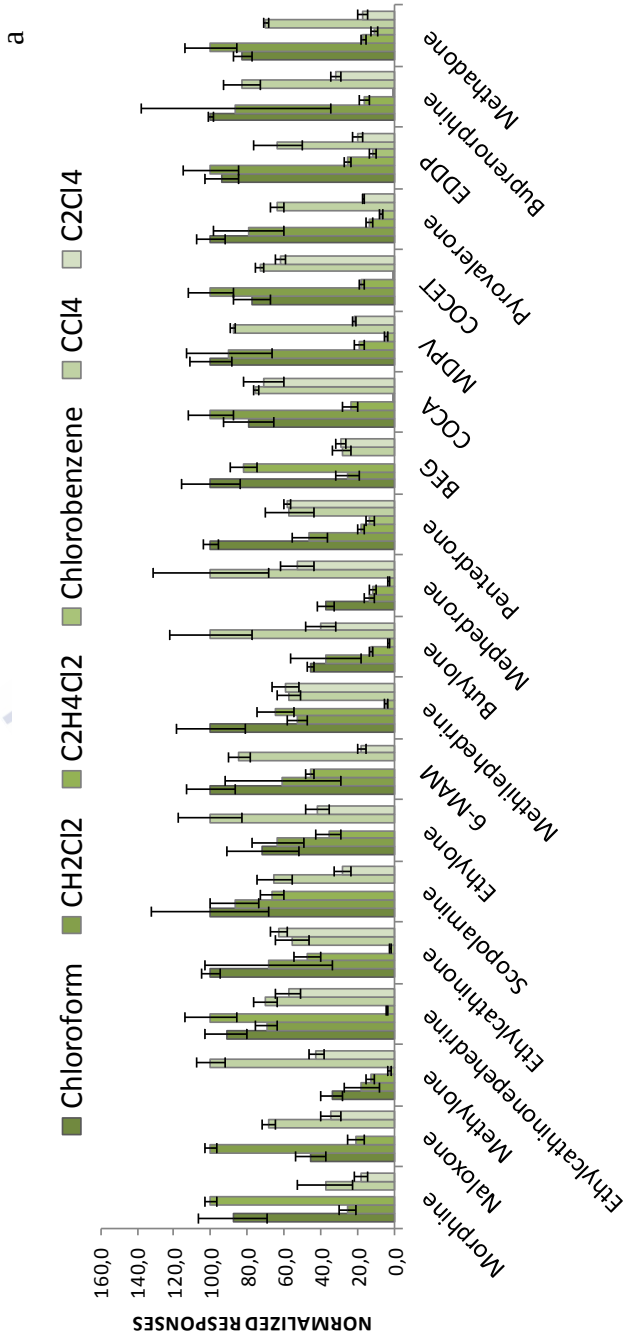


Figura 52: Optimización (a) del disolvente extractante y (b) del disolvente dispersante.

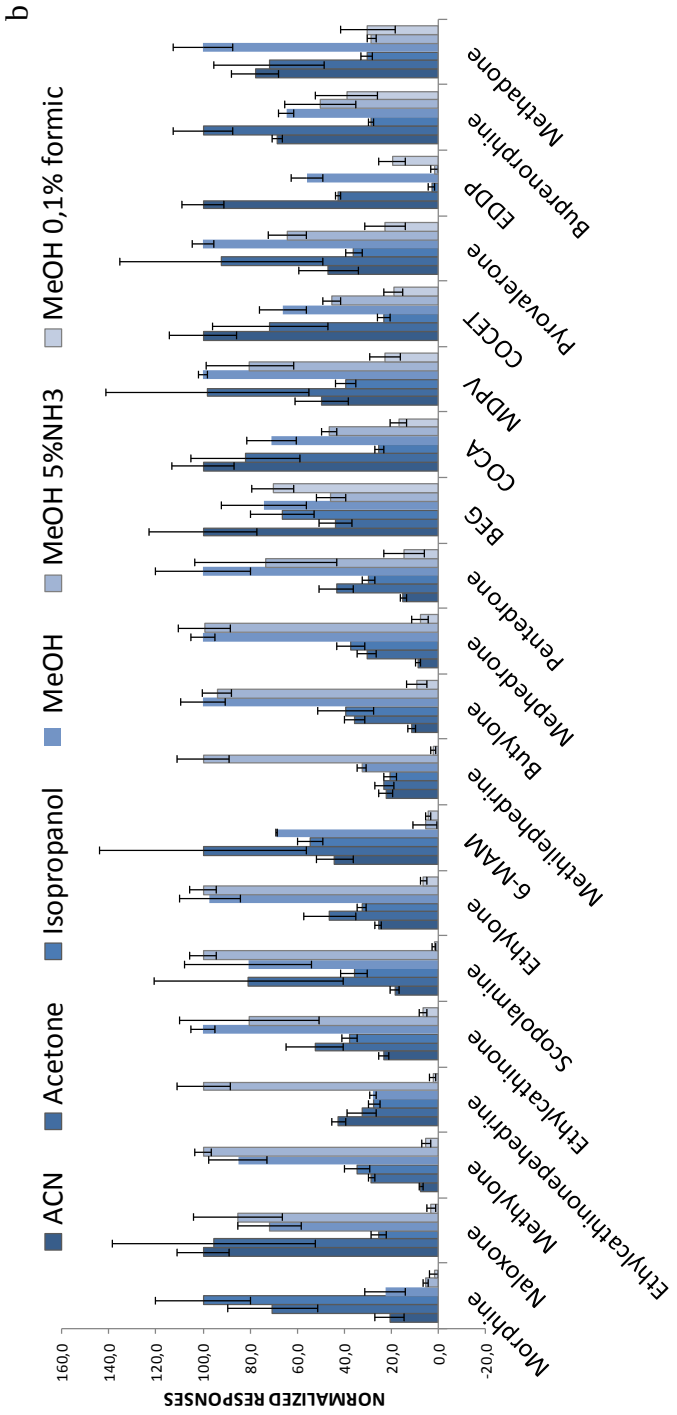


Figura 52: (Continuación) Optimización (a) del disolvente extractante y (b) del disolvente dispersante.

La optimización de los parámetros multivariados que afectan al proceso de US-DLLME, como los volúmenes de disolvente extractante y dispersante, el volumen de la muestra, el pH, la fuerza iónica (cantidad de NaCl añadido) y el tiempo de ultrasonidos se estudiaron mediante diseños de experimentos. [19] Este enfoque quimiométrico evalúa simultáneamente varios factores a dos o más niveles en un número reducido de experimentos.

Primero, se aplicó un diseño de cribado asimétrico ($2^1 3^4 4^1$) para encontrar los factores críticos entre los seis considerados (Tabla 31).

Tabla 31. Condiciones experimentales para un diseño de cribado asimétrico: $2^1 3^4 4^1$//18 experimentos en US-DLLME de nuevas sustancias psicoactivas en fluido oral

N°Exp	Random	Vol muestra (mL)	Vol dispers (mL)	Vol extract (µL)	US (min)	NaCl (g)	pH
1	7	0,25	0,5	50	1	0	7
2	11	0,5	1	100	3	0,1	7
3	3	0,25	2	200	5	0,2	7
4	17	0,25	0,5	100	3	0,2	8
5	12	0,5	1	200	5	0	8
6	16	0,25	2	50	1	0,1	8
7	18	0,25	1	50	5	0,1	9
8	5	0,5	2	100	1	0,2	9
9	2	0,25	0,5	200	3	0	9
10	8	0,25	2	200	3	0,1	10
11	9	0,5	0,5	50	5	0,2	10
12	14	0,25	1	100	1	0	10
13	6	0,25	1	200	1	0,2	7
14	13	0,5	2	50	3	0	7
15	1	0,25	0,5	100	5	0,1	7
16	4	0,25	2	100	5	0	8
17	10	0,5	0,5	200	1	0,1	8
18	15	0,25	1	50	3	0,2	8

Se evaluó el análisis de la varianza (ANOVA) y los factores mostraron significación estadística (nivel de confianza del 95%, $p < 0,5$) en US-DLLME para pentedrona, cocaína y cocaetileno. El efecto de cinco variables, volumen de dispersante (b_2), volumen de

extractante (b_3), tiempo de US (b_4), adición de NaCl (b_5) y pH (b_6), fue estadísticamente significativo para algunas de las drogas estudiadas. A modo de ejemplo, los factores significativos para pentedrona se muestran en el gráfico de pesos delta (Figura 53A) y el gráfico de efectos totales (Figura 53B) [19]. Estos gráficos han sido descritos con anterioridad. La línea vertical de puntos en el gráfico de pesos delta especifica la significación estadística de los factores que afectan a la eficacia del proceso US-DLLME. La longitud de cada barra en el gráfico de efectos totales es proporcional al efecto de ese nivel del factor sobre la extracción. Como se puede ver, los volúmenes de dispersante y extractante, el tiempo de US y el pH tienen efectos significativos sobre la US-DLLME, pero el volumen de muestra (b_1) y la adición de NaCl no tienen influencias significativas. Se seleccionó un volumen de extracción de 200 μL y 5 min de US para experimentos posteriores porque la mayoría de los analitos mostraron esta misma tendencia. También se recomienda un volumen de muestra de 0,5 mL para la mayoría de los compuestos. Aunque la adición de sal no tiene un efecto significativo sobre la US-DLLME, la influencia de la fuerza iónica (0,1 g de NaCl) es ventajosa, especialmente, para morfina, metilona, etilcatinona, EDDP y metadona, y este valor se mantuvo constante para los siguientes experimentos.

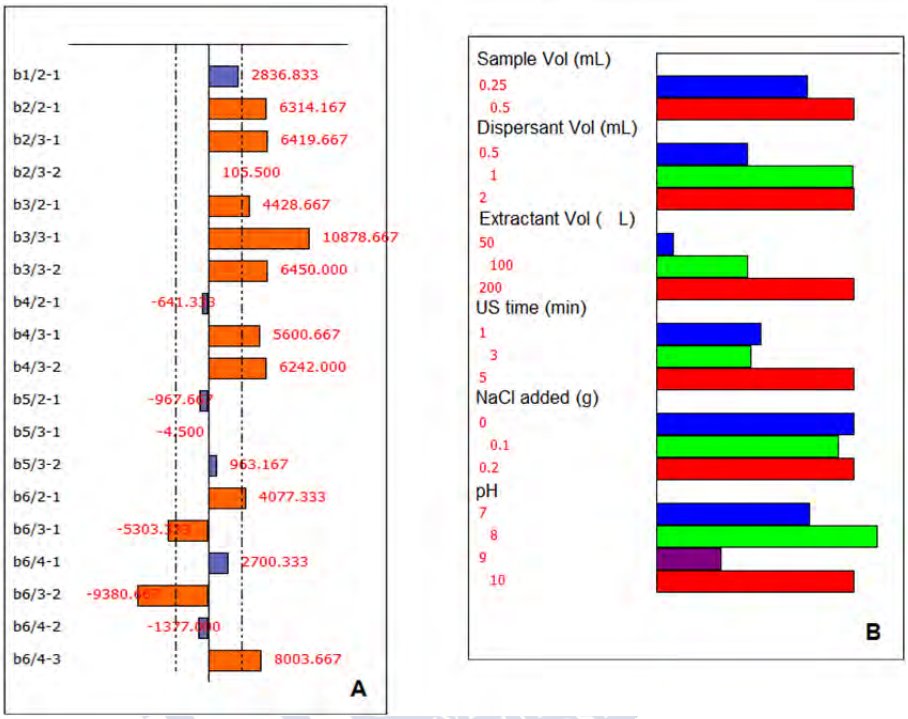


Figura 53: Pesos delta (A) y efectos totales (B) para la pentedrona.

Los resultados del diseño de screening no aclararon los valores más convenientes para el volumen del dispersante y el pH. Para algunas sustancias, como morfina y buprenorfina, se obtenía mejor respuesta con 1 mL de dispersante. De manera similar, un pH 9 fue adecuado para extraer EDDP y 6AM, pero un pH neutro producía mejores extracciones de BEG. Por estas razones, los valores óptimos de volumen de dispersante y pH fueron evaluados mediante un diseño Doehlert de superficie de respuesta (Tabla 32) [19].

Tabla 32. Condiciones experimentales para un diseño Doehlert en US-DLLME de nuevas sustancias psicoactivas en fluido oral.

N°Exp	Random	pH	Volumen de dispersante (mL)
1	7	10	1,5
2	8	6	1,5
3	2	9	2,5
4	1	7	0,5
5	5	9	0,5
6	3	7	2,5
7	4	8	1,5
8	6	8	1,5
9	9	8	1,5

Los resultados experimentales se evaluaron mediante ANOVA y la regresión fue estadísticamente significativa, asumiendo un nivel de confianza del 95%, para pH (b_1), volumen de dispersante (b_2), el efecto de la interacción entre ambos factores (b_{12}) y el efecto de términos cuadráticos del pH (b_{11}) y volumen de dispersante (b_{22}). Los gráficos de superficie de respuesta en la Figura 53 indican que el efecto de los dos factores en US-DLLME es diferente para las drogas estudiadas. A modo de ejemplo, se muestran tres tendencias diferentes: se requieren altos valores de pH y volumen de dispersante para extraer morfina (Figura 54A). Los valores medio-altos de pH y un bajo volumen de dispersante proporcionan la mejor extracción de metilona (Figura 54B). El valor medio del pH y el volumen medio-bajo del dispersante proporcionaron una mejor extracción para etilcatinona (Figura 54C). La explicación más probable de estos resultados son las diferentes características y propiedades físico-químicas de los compuestos estudiados.

Estos resultados requieren de un análisis de decisión multicriterio basado en funciones de deseabilidad que predicen las condiciones óptimas para la extracción de todos los compuestos de forma

simultánea [19] (Figura 54D). Los valores óptimo predichos por este algoritmo para los factores evaluados son pH 8 y 1,4 mL de disolvente dispersante.

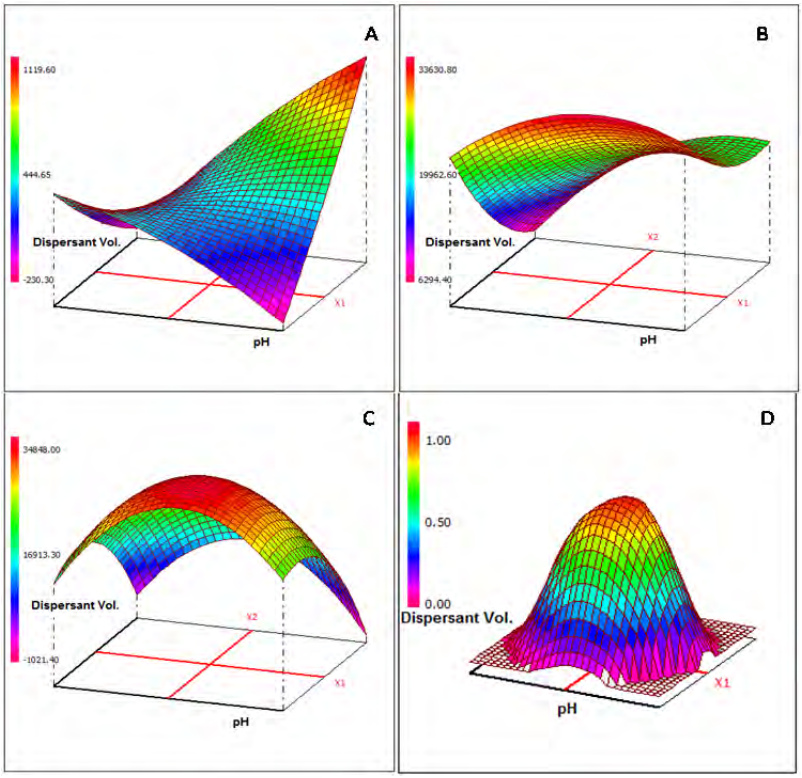


Figura 54: Superficies de respuesta para (A) morfina, (B) metilona, y (C) etilcatinona. (D) Función de deseabilidad global para todas las drogas.

4.4.2. Validación del método.

El método US-DLLME-UPLC-MS/MS optimizado se validó en términos de selectividad, linealidad, efecto matriz, reproducibilidad y recuperación. La Figura 55 muestra los cromatogramas correspondientes a un blanco de saliva libre de fármacos y saliva con patrones adicionados, observándose la ausencia de picos interferentes en la saliva blanco a los tiempos de retención de las drogas. Esto demuestra la selectividad proporcionada por la técnica MS/MS.

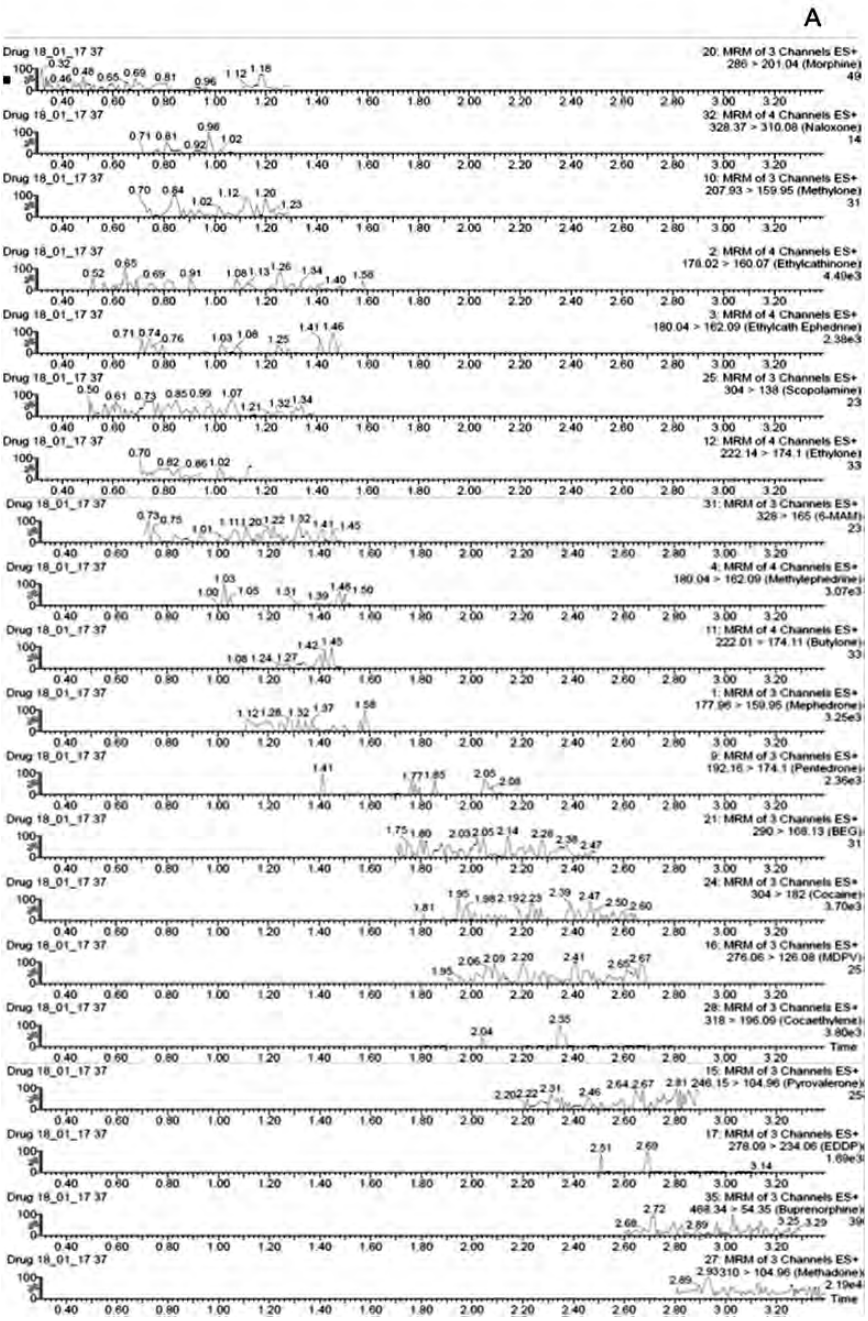


Figura 55: (A) Cromatograma de una muestra de saliva blanco.

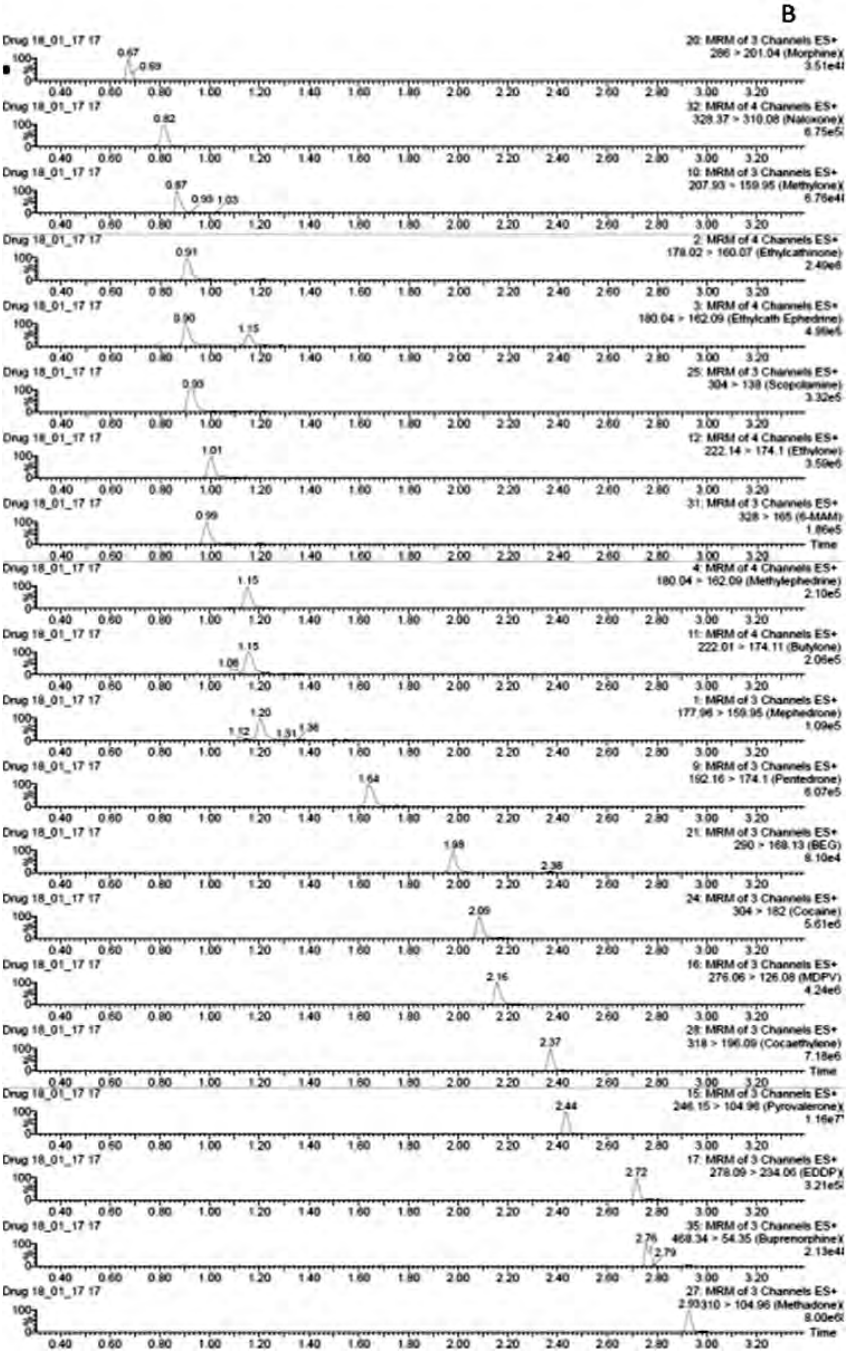


Figura 55 (continuación): (B) Cromatograma de una muestra de saliva con drogas.

La linealidad fue estudiada añadiendo analitos y patrón interno a muestras blanco de saliva en los siguientes rangos: 0,5 a 500 ng/mL (7 de las drogas analizadas), 1,0 a 500 ng/mL (5 de las drogas analizadas) y 2,5 a 500 ng/mL (5 de las drogas analizadas). Se obtuvieron rangos de linealidad más cortos: 5 a 500 ng/mL para etilcatinona y metilefedrina y 50 a 1000 ng/mL para la morfina (Tabla 33). Los coeficientes de determinación (r^2) se obtuvieron con un mínimo de siete niveles de concentración por triplicado, y oscilan entre 0,9901 y 0,9995. Los LOD variaron de 0,1 a 2,5 ng/mL, excepto para la morfina (25 ng/mL). Los LOQ oscilaron entre 0,25 y 5 ng/mL, excepto para la morfina (50 ng/mL). Como puede verse en la Tabla 30, nueve compuestos muestran un efecto matriz (EM) de 63,1% a 105%. Un valor menor que 100% indica la supresión de la señal, mientras que un valor mayor que 100% indica un aumento de la señal. %EM próximos al 100% indican que la determinación del compuesto estará menos afectada por el efecto matriz. Algunos fármacos mostraron un EM moderado: morfina, metilona, etilcatinona efedrina, etilcatinona, escopolamina, etilona, metilefedrina y metadona presentaron un EM entre 63% y 77%; y por lo tanto, su análisis puede considerarse afectado por las interferencias de la matriz. Todas las drogas restantes no se vieron afectadas por los efectos de la matriz, con valores superiores al 80%; sin embargo, se utilizó el método de adición estándar en la cuantificación de todas las drogas estudiadas.

Tabla 33: Rango lineal, LOD, LOQ y %EM.

Compuesto	Rango lineal (ng/mL)	r^2	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	%EM
Morfina	50-1000	0,9907	25	50	66,7
Naloxona	1-500	0,9916	0,5	1	95,6
Metilona	2,5-500	0,9985	0,25	2,5	63,1
Etilcatinona efedrina	1-500	0,9968	0,5	1	75,6
Etilcatinona	5-500	0,9967	0,25	5	65,1
Escopolamina	1-500	0,9901	0,5	1	77,0
Etilona	0,5-500	0,9975	0,25	0,5	77,4
6AM	2,5-500	0,9972	1	2,5	85,4
Metilefedrina	5-500	0,9981	2,5	5	67,6
Butilona	1-500	0,9938	0,5	1	85,7
Mefedrona	2,5-500	0,9960	1	2,5	85,3
Pentedrona	2,5-500	0,9950	1	2,5	84,9
BEG	0,5-500	0,9907	0,25	0,5	87,0
Cocaína	0,5-500	0,9982	0,25	0,5	91,6
MDPV	0,5-500	0,9977	0,1	0,25	87,5
COCET	0,5-500	0,9995	0,25	0,5	82,4
Pirovalerona	0.5-500	0,9968	0,1	0,25	105,0
EDDP	1-500	0,9965	0.5	1	82,4
Buprenorfina	2,5-500	0,9926	1	2,5	83,4
Metadona	0,5-500	0,9976	0,1	0,25	76,1

La precisión del método y las recuperaciones se calcularon en muestras de control de calidad (QC) adicionadas a tres niveles de concentración (5, 25 y 100 ng/mL, excepto la morfina (50, 100 y 500 ng/mL). La precisión intradía (n = 6) varió entre 1,7% y 14,8% RSD y la precisión interdía (n = 16) varió entre 2,4% y 14,8% RSD (Tabla 34).

Tabla 34: Precisión intradía e interdía.

Compuesto	Precisión intradía %RSD (n=6)			Precisión interdía %RSD (n=16)		
	5 ng/mL	25 ng/mL	100 ng/mL	5 ng/mL	25 ng/mL	100 ng/mL
Morfina *	12,4	10,1	12,3	11,3	10,1	13,5
Naloxona	14,5	9,8	6,3	14,5	12,4	14,1
Metilona	9,3	6,6	9,3	9,7	13,6	13,7
Etilcatinona efedrina	14,3	8,1	7,9	11,1	13,3	10,9
Etilcatinona	13,6	9,0	8,6	13,5	14,7	13,4
Escopolamina	7,7	6,2	7,5	14,5	12,5	10,9
Etilona	9,2	9,2	5,7	12,9	13,7	5,5
6AM	10,1	4,8	10,8	12,3	14,1	12,8
Metilefedrina	8,7	14,3	2,9	14,0	14,2	11,5
Butilona	5,4	14,1	14,6	10,3	13,3	13,0
Mefedrona	7,0	8,7	9,2	13,2	12,9	10,8
Pentedrona	8,5	8,1	6,8	13,5	14,8	11,0
BEG	12,7	10,1	14,8	13,2	13,2	7,9
Cocaína	4,5	2,7	1,7	4,0	2,4	2,4
MDPV	2,4	3,2	3,0	12,9	5,5	9,4
COCET	3,7	4,9	3,4	13,4	6,3	12,6
Pirovalerona	11,8	6,1	8,3	12,5	9,8	7.5
EDDP	8,9	7,3	5,3	13,0	14,8	10,2
Buprenorfina	10,0	4,7	7,5	12,8	9,5	12,8
Metadona	2,5	4,2	3,2	10,2	8,3	7,2

*Niveles para la morfina 50, 100 y 500 ng/mL

La exactitud del método se evaluó mediante el cálculo de la concentración de droga encontrada en la muestra de saliva y la desviación estándar (S) de cinco replicados y recuperaciones absolutas (Tabla 35), y los valores obtenidos indican la buena calidad del método. La mayoría de las recuperaciones de las drogas en muestras QC de niveles bajo y medio (5–25 ng/mL o 50 ng/mL para morfina) estuvieron en el rango de 80–115%, y entre 80 y 110% en niveles altos de muestras QC (100 o 500 ng/mL para morfina), que están en el rango marcado por la FDA "*Guidelines for the Validation of Chemical Methods*" [22] Las recuperaciones de solo seis analitos presentaron desviaciones leves, en los niveles altos de las muestras QC, en comparación con los valores de referencia (entre 1,7% para 6AM y 19% para BEG). Se encontraron pequeñas desviaciones en las muestras QC bajo y medio (6,7% para pirovalerona, 10,3% para EDDP y 14% para naloxona), lo que demuestra que la metodología propuesta está validada adecuadamente.

Tabla 35: Exactitud del método de extracción en saliva.

Droga	[a]QC Bajo		[b]QC Medio		[c]QC Alto	
	Concent. hallada±S (ng/mL)	Recuper. ± RSD (%)	Concent. hallada±S (ng/mL)	Recuper. ± RSD (%)	Concent. hallada±S (ng/mL)	Recuper. ± RSD (%)
Morfina	51,9 ± 6,0	118,2 ±11,9	86,5 ± 12,2	86,5 ± 12,2	554,5 ± 66,8	110,9 ±13,4
Naloxona	6,5 ± 0,4	129,0 ± 7,4	21,5 ± 2,4	85,8 ± 9,7	93,7 ± 3,0	93,7 ± 3,0
Metilona	5,1 ± 0,3	101,5 ± 5,8	25,9 ± 3,2	103,8± 13,0	116,8 ± 16,0	116,8± 16,0
Etilcatinona efedrina	3,7 ± 0,5	74,6 ± 11,4	23,0 ± 3,0	91,9 ± 12,0	100,0 ± 11,4	100,0± 11,4
Etilcatinona	6,1 ± 0,7	122,7± 13,2	21,1 ± 3,6	84,5 ± 10,4	96,3 ± 12,3	96,3 ± 12,3
Escopolamina	3,8 ± 0,5	77,1 ± 9,8	22,9 ± 5,8	91,7 ± 23,1	92,2 ± 5,8	92,2 ± 5,8

Etilona	5,5 ± 1,2	110,6 ± 23,4	20,6 ± 5,4	82,5 ± 10,6	105,2 ± 5,6	105,2 ± 5,6
6AM	5,8 ± 0,8	115,4 ± 13,9	20,2 ± 2,3	80,9 ± 9,4	111,7 ± 13,8	111,7 ± 13,8
Metilefedrina	3,7 ± 0,6	73,8 ± 12,2	28,3 ± 2,3	113,1 ± 9,0	96,0 ± 9,6	96,0 ± 9,6
Butilona	4,9 ± 0,8	98,5 ± 16,2	21,7 ± 2,9	96,8 ± 11,6	113,4 ± 11,6	113,4± 11,6
Mefedrona	3,8 ±0.5	76,6 ± 11,3	21,8 ± 3,0	87,1 ± 12,2	98,3 ± 10,8	98,3 ± 10,8
Pentedrona	5,4 ± 1,1	107,2 ± 1,2	24,5 ± 4,0	98,1 ± 16,0	92,1 ± 10,4	92,1 ± 10,4
BEG	5,1 ± 1,2	102,7± 23,3	19,2 ± 2,8	76,8 ± 11,2	126,2 ± 20,6	126,2± 20,6
Cocaína	5,1 ± 0,2	102,6 ± 4,0	25,4 ± 0,7	101,0 ± 1,7	101,6 ± 2,7	101,6 ± 2,7
MDPV	5,3 ± 0,5	105,5± 10,5	22,7 ± 2,9	96,8 ± 11,6	110,2 ± 10,2	110,2± 10,2
COCET	5,0 ± 0,6	100,7± 11,8	26,6 ± 1,8	106,5 ± 7,3	118,2 ± 13,0	118,2± 13,0
Pirovalerona	6,1 ± 0,4	121,7 ± 8,5	21,4 ± 1,9	85,8 ± 7,4	113,5 ± 8,4	113,5 ± 8,4
EDDP	6,3 ± 0,5	125,3 ± 9,6	23,5 ± 3,1	93,9 ± 12,4	109,5 ± 10,9	109,5± 10,9
Bupre	4,6 ± 0,6	92,3 ± 30,7	22,0 ± 2,1	87,8 ± 8,8	108,9 ± 14,6	108,9± 14,6
Metadona	5,2 ± 0,6	103,9± 11,6	28,3 ± 2,4	113,2 ± 9,4	106,4 ± 11,8	106,4± 11,8

[a]QC Bajo 5 ng/mL (50 ng/mL para morfina)

[b]QC Medio 25 ng/mL (100 ng/mL para morfina)

[c]QC Alto 100 ng/mL (500 ng/mL para morfina)

4.4.3. Aplicación del método a muestras reales.

Tras la validación del método propuesto, se aplicó con éxito para el análisis por duplicado de las drogas estudiadas en 15 muestras de saliva procedentes de pacientes que participan en programas de terapia de sustitución con metadona y buprenorfina/naloxona. Fue necesario diluir algunas muestras positivas que tenían concentraciones más altas que el rango lineal estudiado, para su correcta cuantificación.

Además, debido al pequeño volumen de saliva recogido en los dispositivos Salivette®, las muestras se analizaron por duplicado, excepto aquellas para las cuales se disponía de una cantidad limitada y solo fue posible realizar un único análisis. Los resultados se presentan en la Tabla 36 y los cromatogramas de UPLC-MS/MS, en modo MRM para la muestra nº 9 (positiva a metadona y EDDP) se muestran en la Figura 56.

Como se esperaba, no se detectaron nuevas sustancias psicoactivas (NPS) en las muestras de saliva. Los pacientes que siguen el tratamiento con metadona también tienen concentraciones de su metabolito EDDP, excepto en un caso donde la concentración de metadona era muy baja (0,6 ng/mL). Los casos positivos en estas muestras reales oscilaron entre 875,8 y 8323,7 ng/mL para morfina, 8,0 a 16336,8 ng/mL para 6AM, 2,0 a 12529,3 ng/mL para cocaína, 0,6 a 1554,6 ng/mL para BEG, solo una muestra positiva de 23,3 ng/mL para cocaetileno, 0,6 a 841,1 ng/mL para metadona, 4,4 a 84,0 ng/mL para EDDP, 1,9 a 730,8 ng/mL para naloxona y 20,9 a 3938,3 ng/mL para buprenorfina. Los resultados muestran que el 67% de los sujetos usaron terapia con metadona y el 33% usaron la terapia con buprenorfina/naloxona. Sin embargo, el 47% de estos pacientes consumieron cocaína y presentaron concentraciones de los metabolitos BEG y cocaetileno en el 40% y el 7% de los casos, respectivamente. En algunos pacientes se detectó la presencia de morfina (13% de los casos) y 6AM (33% de los casos), que eran compatibles con un consumo de heroína. El uso de opiáceos y cocaína se demuestra en los casos 3, 4, 10 y 15, tras la detección simultánea de algunos de sus metabolitos.

Tabla 36: Concentraciones de las drogas en muestras de saliva de sujetos consumidores.

Muestra	Morfina	Nalo	6AM	BEG	Cocaína	COCET	EDDP	Bupre	Met
1	n.d.	n.d.	n.d.	0,6±0,1	15,6±0,8	n.d.	13,9±0,2	n.d.	841±255
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,0±0,04	n.d.	84,0±4,0	n.d.	84,0±4,0
3	n.d.	730,8± 48,9	15,9±1,5	n.d.	2,4±0,01	n.d.	n.d.	3938,3±124,9	n.d.
4	875,8± 35,6	n.d.	36,8±13,3	1554,6±168,0	12529,3±260,9	23,3± 8,6	8,8± 0,07	n.d.	8,8±0,07
5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,4± 0,2	n.d.	4,4±0,2
6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15,5±0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7	n.d.	131,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1044,1	n.d.
8	n.d.	21,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	87,2	n.d.
9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	200,3	n.d.	1588,9
10	8323,7±574,3	n.d.	16336,8± 1037,7	n.d.	8323,7± 574,3	n.d.	27,0±1,6	n.d.	310,8
11	n.d.	n.d.	n.d.	565,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9,7

12	n.d.	n.d.	8,0±0,8	n.d.	n.d.	n.d.	16,7±0,4	n.d.	447,0±6,6
13	n.d.	n.d.	n.d.	12,3±0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,6±0,003
14	n.d.	1,9±0,8	n.d.	3,6±1,6	n.d.	n.d.	11,4±1,8	20,9±1,4	33,4±0,1
15	n.d.	69,3	4,5	134,1	23,2	n.d.	n.d.	196,7	n.d.

n.d. no detectado

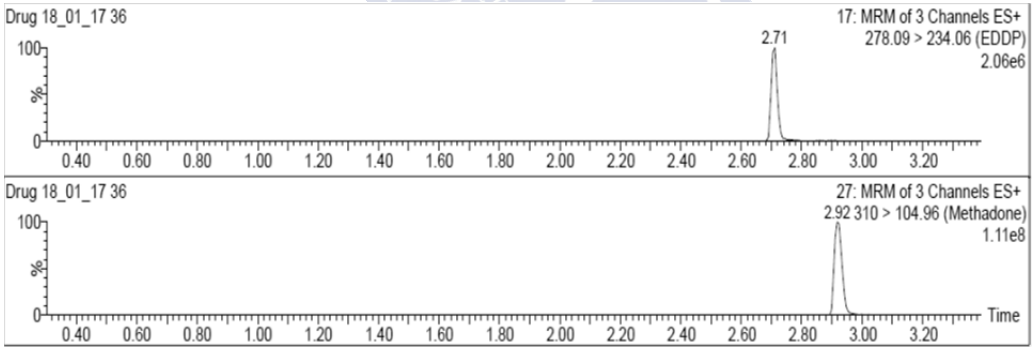


Figura 56: Cromatograma de muestra real (código 9, tabla 30).

4.4.4. Bibliografía.

[1]. 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.

[2]. Miller BI, Stogner JM, Miller JM, Fernandez MI. "The arrest and synthetic novel psychoactive drug relationship: observations from a young adult population" J. Drug Issues 2017; 47: 91–103.

[3]. Rech MA, Donahey E, Cappiello Dziedzic JM, Oh I, Greenhalgh E. "New drugs of abuse" Pharmacotherapy 2015; 35: 189-197.

[4]. Benítez G, March-Salas M, Villa-Kamel A, Cháves-Jiménez U, Hernández J, Montes-Osuna N. "The genus Datura L. (Solanaceae) in Mexico and Spain—ethnobotanical perspective at the interface of medical and illicit uses" J. Ethnopharmacol. 2018; 219: 133–151.

[5] Bosker WM, Huestis MA. "Oral fluid testing for drugs of abuse" Clinical Chem. 2009; 55: 1910–31. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.108670

[6]. Aldlgan AA, Torrance HJ. "Bioanalytical methods for the determination of synthetic cannabinoids and metabolites in biological specimens" TRAC. Trends Anal. Chem. 2016; 80: 444-457.

[7]. 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.

[8]. Amaratunga P, Lemberg BL, Lemberg D. "Quantitative measurement of synthetic cathinones in oral fluid" J. Anal. Toxicol. 2013; 37: 622-628.

[9]. Di Rago M, Chu M, Rodda LN, Jenkins E, Kotsos A, Gerostamoulos D. "Ultra-rapid targeted analysis of 40 drugs of abuse in oral fluid by LC-MS/MS using carbon-13 isotopes of methamphetamine and MDMA to reduce detector saturation" Anal. Bioanal. Chem. 2016; 40: 3737–3749.

[10]. Sergi M, Montesano C, Odoardi S, Rocca LM, Fabrizi G, Compagnone Dea. "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.

[11]. Newmeyer MN, Concheiro M, Huestis MA. "Rapid quantitative chiral amphetamines liquid chromatography-tandem mass spectrometry: method in plasma and oral fluid with a cost-effectivechiral derivatizing reagent" J. Chromatogr. A 2014; 1358: 68–74.

[12]. Montesano C, Simeoni MC, 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

[13]. Liu HC, Lee HT, Hsu YC, Huang MH, Liu RH, Chen TJ. "Direct injection LC-MS-MSanalysis of opiates,methamphetamine, buprenorphine, methadone and their metabolites in oral fluid from substitution therapy patients" J. Anal. Toxicol. 2015; 39: 472-480.

[14]. de Castro A, Lendoiro E, Fernández-Vega H, Steinmeyer S, López-Rivadulla M, Cruz A. "Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of selected synthetic cathinones and two piperazines in oral fluid. Crossreactivity study with an on-site immunoassay device" J. Chromatogr. A 2014; 1374: 93–101.

[15]. Mercolini L, Protti M, Catapano MC, Rudge J, Sberna AE. "LC-MS/MS and volumetric absorptive microsampling for quantitative bioanalysis of cathinone analogs in dried urine, plasma and oral fluid samples" J. Pharm. Biomed. Anal. 2016; 123: 186–194.

[16]. Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini MR, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. "Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction" J. Chromatogr. A 2006; 1116: 1-9.

[17]. Jain R, Singh R. “Applications of dispersive liquid-liquid microextraction in forensic toxicology” TRAC. Trends Anal. Chem. 2016; 75: 2257-237.

[18]. 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 app” Microchem. J. 2015; 123: 33-41.

[19]. Lewis GA, Mathieu D D, Phan-Tan-Luu R. “Pharmaceutical experimental design”. New York: Marcel Dekker; 1999.

[20]. 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. https://www.fda.gov/downloads/Drugs/%20GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf

[21]. U.S. Food and Drug Administration Foods and Veterinary Medicine Science and Research Steering Committee, “Guidelines for the validation of chemical methods, 2015”. https://www.fda.gov/downloads/scienceresearch/fieldscience/ucm273418.pdf

[22]. “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.

[23]. Magnusson B, Örnemark U. “Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods—a laboratory guide to method validation and related topics” 2ª ed. Teddington : Eurachem; 2014.

[24]. Kruve A, Rebane R, Kipper K, Oldekop ML, Evard H, Herodes Kea. “Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: part II” Anal. Chim. Acta 2015; 870: 8-28.

5. CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. CONCLUSIONES

El elevado consumo de psicofármacos y drogas de abuso constituye un problema dinámico y un riesgo para la salud pública y la seguridad vial, porque es la causa de numerosas muertes por sobredosis de etiología accidental y/o suicida. Su control supone un reto tanto desde el punto de vista práctico como de disponibilidad de metodológia bioanalítica. Por estos motivos, en esta tesis han sido desarrollados diferentes métodos que permiten una determinación rápida, con bajo coste y adecuados límites de detección y cuantificación. Se presentan cuatro trabajos de investigación, en los cuales se han optimizado cuatro métodos para la determinación de distintas drogas en diferentes matrices biológicas.

Las técnicas de microextracción utilizadas en estos trabajos (DLLME y MEPS) suponen estrategias analíticas integradoras (miniaturización de la preparación de muestra) han permitido obtener unos resultados satisfactorios, usando cantidades muy pequeñas de muestra (µL) y bajos volúmenes de disolventes; esto disminuye su coste y su duración, frente a una LLE o SPE convencionales. Además, en el caso de los MEPS, el uso del sistema eVol® de control de dispensación digital permite la semiautomatización de la extracción, asegurando resultados precisos y exactos.

Los métodos de cromatografía líquida propuestos muestran la evolución de la técnica desde HPLC a UPLC, en busca de un mayor rendimiento del análisis con una doble vertiente:

- a través de sistemas que utilizan columnas de alta eficacia con partículas de menos de 2 µm
- con diferentes detectores (PDA y MS/MS) que proporcionan mayor selectividad y sensibilidad

Con ello se ha conseguido agilizar el trabajo en el laboratorio al disminuir los tiempos de separación y determinación de los analitos, desde los 20 min necesarios con cinco drogas de abuso clásicas hasta los 3,5 min para 20 drogas de abuso que incluyen catinonas sintéticas. Además, en los casos en los que el detector utilizado es PDA, los resultados se han comparado con éxito con otros técnicas cromatográficas confirmatorias como GC-MS.

La búsqueda de matrices biológicas adecuadas es un reto continuo y actual en Toxicología Forense, ya que, aunque el plasma/sangre y la orina son las matrices analíticas más conocidas y utilizadas, existen limitaciones de disponibilidad de muestra y ciertos casos que propician la búsqueda de otras alternativas como es el fluido oral.

En el primer trabajo se han determinado benzodiacepinas en orina y aguas residuales, utilizando la microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonidos (US-DLLME) como método de preparación de muestra, seguida de la separación y determinación mediante UPLC-PDA.

En el segundo trabajo se estudiaron varias drogas de abuso clásicas en plasma, utilizando también la microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonidos (US-DLLME) como método de preparación de muestra, seguida de la separación y determinación mediante HPLC-PDA.

Posteriormente, a estas drogas convencionales se han incorporado, en el tercer trabajo, nuevas drogas sintéticas, como son las catinonas, por su reciente aparición en el mercado y la escasez de información disponible. En este caso se desarrolló un método de determinación que incluye la microextracción en fase sólida (MEPS), seguida de la separación y cuantificación de los analitos mediante UPLC-PDA.

Finalmente, se amplió el abanico de drogas de abuso a analizar con drogas emergentes y fármacos utilizados en terapias de sustitución en muestras de saliva. Se propuso un método de determinación sencillo y eficaz que combina la DLLME con la determinación sensible y selectiva como UPLC-MS/MS. Además, la muestra biológica es una alternativa interesante puesto que su recogida no es invasiva y no es necesario contar con personal especializado para su obtención y es muy útil en controles de tráfico o de consumidores en período de desintoxicación.

Las metodologías sugeridas ayudan a procesar rápida y sencillamente muestras biológicas para la identificación de diferentes compuestos bioactivos de interés toxicológico en un laboratorio de análisis clínico y/o forense.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXOS

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXOS

Publicaciones derivadas de la tesis.

Fernández P, Regenjo M, Fernández AM, Lorenzo RA, Carro AM. "Optimization of ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for ultra performance liquid chromatography determination of benzodiazepines in urine and hospital wastewater". Anal. Methods 2014; 6: 8239-8246.

Fernández P, Regenjo M, Bermejo AM, Fernández AM, Lorenzo RA, Carro AM. "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.

Fernández P, González M, Regenjo M,. Ares AM,. Fernández AM, Lorenzo RA,. Carro AM. "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.

Fernández P, Regenjo M, Ares A, Fernández AM, Lorenzo RA, Carro AM. "Simultaneous determination of 20 drugs of abuse in oral fluid using ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction" Anal. Bioanal. Chem. 2019; 411(1): 193-203

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaria Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaria 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

Firmado digitalmente por NOMBRE VAZQUEZ LAGO JUAN MANUEL - NIF 44829259M
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, o=FNMT, ou=FNMT Clase 2 CA, ou=[illegible], cn=NOMBRE VAZQUEZ LAGO JUAN MANUEL - NIF 44829259M
Fecha: 2015.10.27 09:54:07 +01'00'

Juan M. Vázquez Lago

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA