



FACULTAD DE MEDICINA Y
ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE A.P. Y
CIENCIAS FORENSES

**APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A
LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS SIMPLE Y EN TANDEM A LA
DETERMINACIÓN DE DERIVADOS ANFETAMÍNICOS Y OTRAS
DROGAS DE ABUSO EN MEDIOS BIOLÓGICOS**

Memoria presentada por

Marta Concheiro Guisán

Para optar al grado de Doctora por
la Universidad de Santiago de Compostela

Santiago de Compostela, Septiembre 2006



FACULTAD DE MEDICINA Y
ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE A.P. Y
CIENCIAS FORENSES

Dña. Angelines Cruz Landeira, Profesora Titular de Toxicología, y **D. Manuel López-Rivadulla Lamas**, Catedrático de Toxicología del Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias Forenses de la Universidad de Santiago de Compostela,

Certifican:

Que la presente memoria, titulada “APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS SIMPLE Y EN TANDEM A LA DETERMINACIÓN DE DERIVADOS ANFETAMÍNICOS Y OTRAS DROGAS DE ABUSO EN MEDIOS BIOLÓGICOS”, que presenta la licenciada **Marta Concheiro Guisán** para optar al grado de Doctora ha sido realizada bajo su dirección en este Departamento y, a su juicio, reúne todos los requisitos exigidos por la normativa vigente para la elaboración y presentación de Tesis Doctorales.

Y para que así conste, firma el presente informe en Santiago de Compostela, a 22 de Septiembre de 2006.

A. Cruz Landeira

M. López-Rivadulla

En un determinado tramo del recorrido, resulta natural echar cuentas, todas ellas: cuánto se ha recibido y cuánto se ha dado; cuánto ha entrado, cuánto ha salido y cuánto queda. Se trata de una necesidad cuya satisfacción puede resultar placentera, y el hecho de pasar por ella representa, asimismo, una señal. Significa que todavía podrán suceder algunas cosas, caer ramas y brotar otras nuevas, aunque nuestras raíces ya se hayan consolidado.

Primo Levi, *La ricerca delle radici*

AGRADECIMIENTOS

A Angelines Cruz y a Manuel López-Rivadulla, directores de este trabajo, que me han enseñando, orientado y apoyado durante estos años, siendo un verdadero ejemplo para mí.

A las profesoras Ana Bermejo y Purificación Fernández, y a la Dra. M^a Jesús Tabernero, por su ayuda, por sus consejos y por crear un agradable ambiente de trabajo.

À Monsieur le Dr. Pascal Kintz, pour la formation rigoureuse dont j'ai pu bénéficier à votre contact pendant mon stage à Strasbourg, et pour l'honneur que vous nous faites en acceptant être membre du Jury de cette Thèse.

Ao Dr. Mário João Rodrigues Dias, pela sua amabilidade e ajuda durante o meu estágio no laboratório de Toxicologia de la Delegação de Lisboa do Instituto Nacional de Medicina Legal.

A Dani, gran compañero y mejor amigo, con el que compartí innumerables “Pico Sacro”, largas noches de ROSITA, y divertidas discusiones.

A Óscar, mi “hermano mayor” del laboratorio, siempre abriéndonos el camino, y a mi inseparable Anita, apoyo fundamental e insustituible en el trabajo y en las “cañas”.

A Rubén, siempre dispuesto a echarnos una mano. A mis chicos portugueses, Mario y Eugenia. A Iván, por el café de las mañanas y organizar todas las cenas, a Palos, a Teresa “Bioquímica”, a José Manuel, a Cristina, a Lorena, a Patricia, a Marta, a Martha, a Caty, a Uxía...por ser muy buenos compañeros.

A Elenita, por ser tan buena amiga y apoyarme en todo momento.

A Rafa, por su gran ayuda como traductor y sus buenas observaciones.

A mis hermanas Ana e Isa, por su cariño, por estar siempre ahí, y por ser además de mis hermanas, mis mejores amigas.

A mi madre, por su siempre eficaz ayuda y por sus sabios consejos.

Y especialmente, a mi padre y maestro, por escucharme, comprenderme y por enseñarme cada día algo nuevo.

ÍNDICE GENERAL

I. ASPECTOS GENERALES.....	1
1. Definición.....	3
2. Clasificación de las drogas de diseño.....	4
3. Introducción histórica.....	8
 II.FARMACOLOGÍA.....	 15
1. Estructura química y propiedades.....	17
2. Farmacocinética.....	20
2.1. Absorción y concentraciones plasmáticas.....	20
2.2. Distribución.....	22
2.3. Metabolismo.....	24
2.4. Excreción.....	27
3. Mecanismo de acción.....	29
4. Farmacodinamia (Efectos farmacológicos y tóxicos).....	33
4.1. Efectos cardiovasculares.....	33
4.2. Efectos sobre el músculo liso.....	33
4.3. Efectos sobre el sistema nerviosos central.....	33
4.4. Otros efectos.....	34
4.5. Efectos tóxicos.....	35
4.5.1. Toxicidad aguda.....	35

4.5.2. Toxicidad crónica.....	36
4.6. Efecto producido por dosis moderadas de MDMA.....	36
5. Tolerancia y dependencia.....	38
5.1. Tolerancia.....	38
5.2. Dependencia.....	38
6. Abuso y uso terapéutico.....	39
6.1. Abuso.....	39
6.2. Uso terapéutico.....	45
III. TOXICOLOGÍA FORENSE.....	47
1. Etapas del diagnóstico de la intoxicación.....	50
1.1. En el sujeto vivo.....	50
1.2. Postmortem.....	50
2. Muestras biológicas para el análisis toxicológico.....	52
2.1. En el sujeto vivo.....	52
2.1.1. Orina.....	52
2.1.2. Plasma/Sangre.....	52
2.1.3. Pelo.....	53
2.1.4. Contenido gástrico.....	53
2.1.5. Sudor.....	53
2.1.6. Saliva.....	53
2.2. Muestras postmortem.....	54
2.2.1. Fluidos biológicos.....	55

2.2.1.1. Orina.....	55
2.2.1.2. Sangre.....	56
2.2.1.3. Humor vítreo.....	56
2.2.1.4. Bilis.....	57
2.2.1.5. Líquido pericárdico.....	57
2.2.1.6. Contenido gástrico.....	57
2.2.2. Órganos y Tejidos.....	57
2.2.2.1. Hígado.....	57
2.2.2.2. Riñón.....	58
2.2.2.3. Pulmón.....	58
2.2.2.4. Cerebro.....	58
2.2.2.5. Músculo esquelético.....	58
2.2.2.6. Pelo.....	59
2.2.2.7. Uñas.....	59
3. Análisis toxicológico de las muestras.....	60
3.1. El análisis toxicológico.....	60
3.2. Revisión bibliográfica de las técnicas empleadas en la detección de anfetaminas.....	65
4. Interpretación de resultados postmortem.....	75
4.1. Interpretación de los hallazgos.....	75
4.2. Aspectos especiales de la toxicología postmortem.....	75
4.2.1. Estabilidad de las drogas en muestras postmortem.....	76
4.2.2. Redistribución postmortem.....	76
4.2.2.1. Definición.....	76
4.2.2.2. Redistribución postmortem de las anfetaminas.....	78

5. Revisión bibliográfica de los casos de muertes relacionados con las anfetaminas.....	80

IV. LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉ À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE DANS LA TOXICOLOGIE MÉDICO-LÉGALE..... 95

1. Le spectromètre de masse dans LC-MS.....	99
1.1. La source d'ions.....	100
1.1.1. L'ionisation chimique à pression atmosphérique: APCI.....	101
1.1.2. L'ionisation par electrospray : ESI.....	102
1.2. L'interface.....	104
1.3. L'analyseur.....	106
1.4. Le détecteur.....	109
1.5. Le vide.....	110
2. Modes de travail en LC-MS et LC-MS/MS.....	111
3. L'application de la LC-MS en la Toxicologie Médico-légale.....	113
3.1. Les méthodes de détermination de stupéfiants.....	113
3.2. Les méthodes de détermination de médicaments.....	114
3.3. L'analyse toxicologique systématique.....	114
3.3.1. Les méthodes de screening de drogues prédéterminés.....	114
3.3.2. Les bibliothèques en LC-MS.....	115

V. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS..... 117

VI. PARTE EXPERIMENTAL..... 123

1. Material y métodos.....	125
1.1. Instrumentación.....	125
1.1.1. Sistema de cromatografía líquida.....	125
1.1.2. Espectrómetro de masas.....	125
1.1.3. Soporte informático.....	125
1.1.4. Instrumentación en la preparación y extracción de muestras.....	127
1.1.5. Otra instrumentación.....	127
1.2. Material de laboratorio.....	127
1.3. Reactivos.....	128
1.4. Preparación de tampones y soluciones.....	128
1.5. Preparación de las disoluciones madre.....	129
1.6. Preparación de las disoluciones de trabajo.....	129
1.7. Condiciones de la cromatografía líquida de alta resolución.....	130
1.8. Condiciones del espectrómetro de masas.....	132
1.8.1. Condiciones del espectrómetro de masas ZMD 2000.....	132
1.8.2. Condiciones del espectrómetro de masas Quattro Micro™.....	133
1.9. Recepción y preparación de las muestras.....	135
1.10. Métodos de extracción aplicados a las muestras biológicas.....	136
1.10.1. Extracción de drogas básicas de muestras de plasma.....	136
1.10.2. Extracción de las anfetaminas de muestras de sangre, orina e hígado.....	137
1.11. Validación de los métodos analíticos.....	138
1.11.1. Especificidad (Selectividad).....	139
1.11.2. Modelo de calibración (Linealidad).....	139
1.11.3. Precisión.....	140

1.11.4. Exactitud.....	141
1.11.5. Límites.....	141
1.11.5.1. Límite de detección.....	141
1.11.5.2. Límites de cuantificación.....	142
1.11.6. Rendimiento.....	142
1.11.7. Efecto matriz.....	142
1.11.8. Intensidad relativa de los iones.....	144
1.11.9. Estabilidad.....	145
1.11.10. Aplicación a casos reales.....	146
1.11.10.1. Aplicación a casos reales del Instituto Universitario de Medicina Legal de Santiago de Compostela.....	146
1.11.10.2. Aplicación a casos reales de la Delegación en Lisboa del Instituto Nacional de Medicina Legal.....	146
2. Resultados.....	149
2.1. Condiciones del espectrómetro de masas.....	149
2.1.1. Condiciones del espectrómetro de masas simple ZMD 2000.....	149
2.1.2. Condiciones del espectrómetro de masas en tandem Quattro Micro TM	167
2.2. La separación cromatográfica.....	178
2.2.1. La separación cromatográficas en el método de determinación de morfina, 6-monoacetilmorfina, benzoilecgonina, cocaína, anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA y MBDB en plasma.....	178
2.2.2. La separación cromatográfica en el método de determinación de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB y PMA en sangre.....	180

2.2.3. La separación cromatográfica en el método de determinación de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB y PMA en hígado.....	181
2.2.4. La separación cromatográfica en el método de determinación de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB y PMA en orina.....	183
2.3. Resultados de la validación de los métodos analíticos.....	184
2.3.1. Especificidad (Selectividad).....	184
2.3.2. Linealidad, precisión, exactitud, rendimiento e intensidad relativa de los iones.....	187
2.3.3. Límites.....	197
2.3.4. Efecto matriz.....	197
2.3.5. Estabilidad.....	201
2.3.6. Aplicación a casos reales.....	203
2.3.6.1. Aplicación a casos reales del Instituto Universitario de Medicina Legal de Santiago de Compostela.....	203
2.3.6.2. Aplicación a casos reales de la Delegación en Lisboa del Instituto Nacional de Medicina Legal.....	212
VII. DISCUSIÓN.....	219
1. Método de determinación de anfetaminas, cocaína y opiáceos en plasma.....	221
2. Método de determinación de 7 derivados anfetamínicos en sangre, hígado y orina.....	225

3. Aplicación a casos reales del Instituto Universitario de Medicina Legal de Santiago de Compostela.....	229
4. Aplicación a casos reales de la Delegación en Lisboa del Instituto Nacional de Medicina Legal.....	231
VIII. CONCLUSIONES.....	235
IX. PERSPECTIVAS.....	239
X. BIBLIOGRAFÍA.....	243

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la feniletilamina.....	4
Figura 2. Estructura química del fentanilo	5
Figura 3. Estructura química de la meperidina.....	6
Figura 4. Estructura química de la fenciclidina (PCP).....	6
Figura 5. Estructura química de la metacualona.....	7
Figura 6. Cómic de la campaña contra el consumo de éxtasis en EE.UU. “Just say No” (1988). El famoso héroe Batman lucha contra el malvado villano, traficante de éxtasis.....	11
Figura 7. Estructura química, fórmula química y peso molecular (PM) de la anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB y PMA.....	17
Figura 8. Estructura química de la mescalina.....	18
Figura 9. Esquema de las distintas etapas de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de un fármaco en el organismo.....	20
Figura 10. Ejemplo de pastillas de éxtasis con el logotipo “Motorola”.....	21
Figura 11. Pipa de cristal utilizada para el consumo de metanfetamina.....	21
Figura 12. Diagrama del metabolismo de los xenobióticos.....	25
Figura 13. Reacciones de demetilación y de N-dealquilación para MDMA, MDA, MDEA y MBDB, y los isoenzimas responsables en humanos (H) y ratas (R).....	26
Figura 14. Esquema del sistema nervioso vegetativo simpático y parasimpático.....	30
Figura 15. Estructura química de los neurotransmisores noradrenalina, dopamina y serotonina.....	30
Figura 16. Sinapsis. En rojo está marcado el mecanismo de acción facilitando la liberación de neurotransmisores, y en negro el mecanismo de falso neurotransmisor.....	31
Figura 17. Hemorragia cerebral con afectación de los núcleos basales.....	35
Figura 18. Hipertrofia cardíaca, con afectación del ventrículo izquierdo.....	36

Figura 19. Prevalencias de consumo de éxtasis entre la población de 15-64 años en España de 1995-2003.....	40
Figura 20. Evolución del número de tratados por abuso o dependencia de anfetaminas, éxtasis y alucinógenos (números absolutos) en España, 1996-2002.....	42
Figura 21. Consumo reciente (último año) de anfetamina entre adultos jóvenes de edades seleccionadas (15-34 años y 15-24años), medido a través de encuestas de población.....	43
Figura 22. Prevalencia a lo largo de la vida y consumo reciente (último año) de éxtasis entre adultos jóvenes de edades seleccionadas (15-34 años y 15-24 años), medido a través de encuestas de población.....	43
Figura 23. Ejemplos de distintos tipos de pastillas de éxtasis.....	45
Figura 24. Equipo de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	62
Figura 25. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (izquierda) acoplada a espectrometría de masas (derecha).....	62
Figura 26. Sistema manual de extracción en fase sólida.....	64
Figura 27. Vista frontal del tórax y el abdomen. Las flechas muestran la dirección de la redistribución entre los principales órganos (RL, pulmón derecho; LL, pulmón izquierdo; AO, aorta; RV, ventrículo derecho; LV, ventrículo izquierdo; ST, estómago; LLL, lóbulo izquierdo del hígado).....	78
Figure 28. Les différentes parties de la chromatographie liquide (flèche bleu) couplée à la spectrométrie de masse (carré vert).....	100
Figure 29. Dessin du flash volatilisation.....	101
Figure 30. Dessin de la ionisation par APCI.....	102
Figure 31. Production de gouttelettes chargées.....	102
Figure 32. Fission de gouttelettes chargées.....	103
Figure 33. Extraction directe des ions à partir d'une gouttelette de moins de 10 nm de rayon, selon le modèle d'Iribarne et Thomson.....	103
Figure 34. La source (en rose) ESI., et le premier (en vert foncé) et le deuxième (en vert claire) étage de l'interface, des appareils de Micromass.....	104

Figure 35. Comparaison entre la disposition linéaire et en « Z » de la interface.....	105
Figure 36. Photographie d'un analyseur quadripolaire.....	107
Figure 37. Dessin d'un analyseur quadripolaire. Seulement une m/z arrive jusqu'à le détecteur (ion résonant, ligne bleue), tandis que l'ion non-résonant n'arrive pas (ligne rouge).....	107
Figure 38. Spectromètre de masse simple quadripôle (Q).....	108
Figure 39. Spectromètre de masse en tandem quadripôle-quadripôle. Dans le cas du spectromètre de masse QqQ, entre les deux analyseurs se trouve la cellule de collision (hexapole collision cell dans la figure), et c'est pour cela que ce type de analyseur est appelé triple quadripôle.....	109
Figure 40. Dessin d'un détecteur photomultiplicateur.....	109
Figure 41. Cette figure montre l'emplacement des pompes par rapport au spectromètre de masse. Les pompes turbomoléculaires travaillent au niveau de l'interface et de l'analyseur, et la pompe à palettes au niveau de l'interface et à la sortie des pompes turbomoléculaires.....	110
Figure 42. Les quatre modes de travail en MS/MS. On représente le premier analyseur (carré rouge), la chambre de collision (ellipse verte) et le deuxième analyseur (carré bleu).....	112
Figura 43. Fotografía del LC-MS utilizado en la elaboración de este trabajo. La figura muestra el cromatógrafo de líquidos Waters Alliance 2795 Separation Module (izquierda) y el espectrómetro de masas ZMD 2000 (derecha).....	126
Figura 44. Fotografía de un equipo LC-MS/MS semejante al utilizado en la elaboración de este trabajo. La figura muestra el espectrómetro de masas Quattro Micro™ (izquierda), el cromatógrafo de líquidos Waters Alliance 2795 Separation Module (centro) y el PC del equipo (derecha).....	126
Figura 45. Representación esquemática del método de infusión continua en "T".....	133
Figura 46. Fotografías de la centrífuga Minispin (izquierda) y del homogeneizador de tejidos UltraTurrax T8 (derecha), utilizados en la elaboración de este trabajo.....	136

Figura 47. Fotografía del sistema automático de extracción en fase sólida ASPEC XL (Gilson).....	137
Figura 48. Representación esquemática del método de infusión postcolumna.....	144
Figura 49. En la parte superior de la figura aparecen representadas las estructuras químicas de la anfetamina, de la anfetamina protonada y del fragmento de confirmación elegido. En la parte inferior de la figura aparecen representados los espectros de masas de la anfetamina obtenidos aplicando distintos voltajes de cono ($V_c = 10V$, $V_c = 15V$ y $V_c = 20V$).....	150
Figura 50. En la parte superior de la figura aparecen representadas las estructuras químicas de la metanfetamina, de la metanfetamina protonada y del fragmento de confirmación elegido. En la parte inferior de la figura aparecen representados los espectros de masas de la metanfetamina obtenidos aplicando distintos voltajes de cono ($V_c = 15V$, $V_c = 20V$ y $V_c = 25V$).....	151
Figura 51. En la parte superior de la figura aparecen representadas las estructuras químicas de la MDA, de la MDA protonada y del fragmento de confirmación elegido. En la parte inferior de la figura aparecen representados los espectros de masas de la MDA obtenidos aplicando distintos voltajes de cono ($V_c = 10V$, $V_c = 15V$ y $V_c = 20V$).....	152
Figura 52. En la parte superior de la figura aparecen representadas las estructuras químicas de la MDMA, de la MDMA protonada y del fragmento de confirmación elegido. En la parte inferior de la figura aparecen representados los espectros de masas de la MDMA obtenidos aplicando distintos voltajes de cono ($V_c = 10V$, $V_c = 15V$ y $V_c = 20V$).....	153
Figura 53. En la parte superior de la figura aparecen representadas las estructuras químicas de la MDEA, de la MDEA protonada y del fragmento de confirmación elegido. En la parte inferior de la figura aparecen representados los espectros de masas de la MDEA obtenidos aplicando distintos voltajes de cono ($V_c = 15V$, $V_c = 20V$ y $V_c = 25V$).....	154
Figura 54. En la parte superior de la figura aparecen representadas las estructuras químicas de la MBDB, de la MBDB protonada y del fragmento de confirmación elegido. En la parte inferior de la figura aparecen representados los espectros de masas de la MBDB obtenidos aplicando distintos voltajes de cono	

(Vc = 20V, Vc =25V y Vc = 30V).....	155
Figura 55. En la parte superior de la figura aparecen representadas las estructuras químicas de la PMA, de la PMA protonada y del fragmento de confirmación elegido. En la parte inferior de la figura aparecen representados los espectros de masas de la PMA obtenidos aplicando distintos voltajes de cono (Vc = 10V, Vc =15V y Vc = 20V).....	156
Figura 56. En la parte superior de la figura aparecen representadas las estructuras químicas de la benzoilecgonina, de la benzoilecgonina protonada y del fragmento de confirmación elegido. En la parte inferior de la figura aparecen representados los espectros de masas de la benzoilecgonina obtenidos aplicando distintos voltajes de cono (Vc = 20V, Vc =25V y Vc = 30V).....	157
Figura 57. En la parte superior de la figura aparecen representadas las estructuras químicas de la cocaína, de la cocaína protonada y del fragmento de confirmación elegido. En la parte inferior de la figura aparecen representados los espectros de masas de la cocaína obtenidos aplicando distintos voltajes de cono (Vc = 20V, Vc =25V y Vc = 30V).....	158
Figura 58. En la parte superior se recoge el espectro de masas de la morfina obtenido a distintos voltajes (Vc = 40V, Vc = 55V y Vc = 60V), y su estructura química, y en la parte inferior el compuesto representado es el de la 6-monoacetilmorfina.....	159
Figura 59. Estructura química y espectro de masas obtenido a distintos voltajes de la metanfetamina-d ₅ . En la estructura química enmarcada por de un círculo rojo, aparece indicado la parte de la molécula que se pierde en la fragmentación.....	160
Figura 60. Estructura química y espectro de masas obtenido a distintos voltajes para la MDMA-d ₅ . En la estructura química enmarcada por un círculo rojo, aparece indicado la parte de la molécula que se pierde en la fragmentación.....	160
Figura 61. Estructura química y espectro de masas obtenido a distintos voltajes para la MBDB-d ₅ . En la estructura química enmarcado por un círculo rojo, aparece indicado la parte de la molécula que se pierde en la fragmentación.....	161

Figura 62. Estructura química y espectro de masas obtenido a distintos voltajes para la benzoilecgonina-d ₃ . En la estructura química enmarcada por un círculo rojo, aparece indicado la parte de la molécula que se pierde en la fragmentación.....	161
Figura 63. Estructura química y espectro de masas obtenido a distintos voltajes para la cocaína-d ₃ . En la estructura química enmarcada por un círculo rojo, aparece indicado la parte de la molécula que se pierde en la fragmentación.....	162
Figura 64. Ejemplo de método de masas del espectrómetro de masas ZMD, dividido en 4 funciones de masas a lo largo de los 18 minutos del método.....	163
Figura 65. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la anfetamina. Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.....	168
Figura 66. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la metanfetamina. Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.....	169
Figura 67. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la MDA. Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.....	170
Figura 68. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la MDMA. Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.....	171
Figura 69. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la MDEA. Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión	

(Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.....	172
Figura 70. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la MBDB. Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.....	173
Figura 71. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la PMA. Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.....	174
Figura 72. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la anfetamina-d ₆ . Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.....	175
Figura 73. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la MDA-d ₅ . Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.....	175
Figura 74. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la MDMA-d ₅ . Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.....	176
Figura 75. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la MBDB-d ₅ . Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.....	176

Figura 76. Muestra de plasma preparada a 2 ng/mL. Se muestran los cromatogramas en modo SIM del ión de cuantificación de cada uno de los compuestos detectados.....	179
Figura 77. Muestra de plasma preparada a 50 ng/mL. Se muestran los cromatogramas en modo SIM del ión de cuantificación de cada uno de los compuestos detectados.....	179
Figura 78. Imagen superpuesta de los cromatogramas en modo SIM del ión de cuantificación de la anfetamina, la MDA, la metanfetamina, la PMA, la MDMA, la MDEA y la MBDB, de una muestra de sangre preparada a 5 ng/mL.....	180
Figura 79. Imagen superpuesta de los cromatogramas en modo SIM del ión de cuantificación de la anfetamina, la MDA, la metanfetamina, la PMA, la MDMA, la MDEA y la MBDB, de una muestra de sangre preparada a 50 ng/mL.....	181
Figura 80. Imagen superpuesta de los cromatogramas en modo SIM del ión de cuantificación de la anfetamina, el MDA, la metanfetamina, el PMA, el MDMA, el MDEA y el MBDB, de una muestra de hígado preparada a 8 ng/g.....	182
Figura 81. Imagen superpuesta de los cromatogramas en modo SIM del ión de cuantificación de la anfetamina, el MDA, la metanfetamina, el PMA, el MDMA, el MDEA y el MBDB, de una muestra de hígado preparada a 200 ng/g.....	182
Figura 82. Imagen superpuesta de los cromatogramas en modo MRM de la transición de cuantificación de la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la PMA, la MDMA, la MDEA y la MBDB, de una muestra de orina preparada a 2 ng/mL.....	183
Figura 83. Imagen superpuesta de los cromatogramas en modo MRM de la transición de cuantificación de la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la PMA, la MDMA, la MDEA y la MBDB, de una muestra de orina preparada a 200 ng/mL.....	184
Figura 84. Cromatogramas en modo SIM de los iones de cuantificación de la morfina, la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la MDMA, la 6-monoacetilmorfina, la MDEA, la MBDB, la benzoilecgonina y la cocaína (en	

orden ascendente), de una muestra de plasma blanco. Se observa que no existe ninguna interferencia con los analitos estudiados.....	185
Figura 85. Cromatogramas superpuestos en modo SIM de los iones de cuantificación de la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la PMA, la MDMA, la MDEA y la MBDB, de una muestra de sangre blanco. Se observa que no existe ninguna interferencia con los analitos estudiados.....	185
Figura 86. Cromatogramas superpuestos en modo SIM de los iones de cuantificación de la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la PMA, la MDMA, la MDEA y la MBDB, de una muestra de hígado blanco.....	186
Figura 87. Cromatogramas superpuestos en modo MRM de las transiciones de cuantificación de la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la PMA, la MDMA, la MDEA y la MBDB, de una muestra de orina blanco. Se observa que no existen interferencias con ninguno de los analitos estudiados.....	186
Figura 88. Evaluación del efecto matriz para la morfina, la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la MDMA y la cocaína en el ensayo de infusión postcolumna tras la inyección de fase móvil (a, cromatograma verde) y de un plasma blanco previamente extraído (b, cromatograma rojo). El recuadro negro indica el tiempo de retención del compuesto correspondiente.....	199
Figura 89. Evaluación del efecto matriz para la anfetamina, la MDA, la PMA y la MDEA en el ensayo de infusión postcolumna tras la inyección de fase móvil (a, cromatograma verde) y de una sangre blanco previamente extraída (b, cromatograma rojo). El recuadro negro indica el tiempo de retención del compuesto correspondiente.....	200
Figura 90. Evaluación del efecto matriz para la metanfetamina, la MDA, la MDMA y la MBDB en el ensayo de infusión postcolumna tras la inyección de fase móvil (a, cromatograma verde) y de un hígado blanco previamente extraído (b, cromatograma rojo). El recuadro negro indica el tiempo de retención del compuesto correspondiente.....	200
Figura 91. Cromatogramas de los iones de cuantificación y de confirmación de la morfina (<i>m/z</i> 286 y 201) y de la benzoilecgonina (<i>m/z</i> 290 y 168.2), del caso 980/05.....	209

Figura 92. Cromatogramas de los iones de cuantificación y de confirmación de la morfina (<i>m/z</i> 286 y 201), la 6-monoacetilmorfina (<i>m/z</i> 328.1 y 211), la benzoilecgonina (<i>m/z</i> 290 y 168.2), y la cocaína (<i>m/z</i> 304.2 y 182.1), del caso 1655/05.....	210
Figura 93. Cromatogramas de los iones de cuantificación y de confirmación de la morfina (<i>m/z</i> 286 y 201), la MDA (<i>m/z</i> 180.2 y 163.2), la MDMA (<i>m/z</i> 194.2 y 163.2), y la benzoilecgonina (<i>m/z</i> 290 y 168.2), del caso 935/06.....	210
Figura 94. Cromatogramas de los iones de cuantificación y de confirmación de la benzoilecgonina (<i>m/z</i> 290 y 168.2), y la cocaína (<i>m/z</i> 304.2 y 182.1), del caso 1064/06.....	211
Figura 95. Cromatogramas de los iones de cuantificación y de confirmación de la anfetamina (<i>m/z</i> 136.1 y 119), la MDA (<i>m/z</i> 180.2 y 163.2), la MDMA (<i>m/z</i> 194.2 y 163.2), y la benzoilecgonina (<i>m/z</i> 290 y 168.2), del caso 750/06.....	211
Figura 96. Cromatogramas en modo SIM de los iones de cuantificación y de confirmación de la MDA, la MDMA y la MBDB correspondientes a la muestra de sangre del caso STF05-00660. Las concentraciones halladas fueron MDA = 16.3 ng/mL, MDMA = 398.7 ng/mL y MDEA = 2.1 ng/mL.....	216
Figura 97. Cromatogramas en modo SIM de los iones de cuantificación y de confirmación de la MDA y la MDMA, correspondientes a la muestra de sangre periférica del caso STF04-02378. Las concentraciones halladas fueron MDA = 45.7 ng/mL y MDMA = 764.6 ng/mL.....	216
Figura 98. Cromatogramas en modo SIM de los iones de cuantificación y de confirmación de la metanfetamina, la MDA y la MDMA, correspondientes a la muestra de hígado del caso STF04-02378. Las concentraciones halladas fueron metanfetamina < 8 ng/g (LOQ), MDA = 549.2 ng/g y MDMA = 5962 ng/g.....	217

Figura 99. Cromatogramas en modo MRM de las transiciones de cuantificación y de confirmación de la MDA, la MDMA y la MDEA, correspondientes a la dilución 1:100 de la muestra de orina del caso STF03-00014. Las concentraciones halladas fueron MDA = 3050 ng/mL, MDMA = 59990 ng/mL y MDEA = 10210 ng/mL..... 217

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de los principales parámetros farmacocinéticos tras el consumo de las dosis habitualmente utilizadas para la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la MDMA, la MDEA y la PMA.....	22
Tabla 2. Resumen de las ventajas e inconvenientes de las principales muestras biológicas de la persona viva.....	54
Tabla 3. Revisión bibliográfica de los métodos para la determinación de anfetaminas mediante LC-MS en las principales matrices biológicas.....	67
Tabla 4. Revisión bibliográfica de los métodos para la determinación simultánea de anfetaminas y otras drogas mediante LC-MS en las principales matrices biológicas.....	72
Tabla 5. Principales órganos que actúan como reservorios de las drogas y tejidos a los que afecta su difusión.....	78
Tabla 6. Revisión de las concentraciones halladas en casos de muertes relacionadas con la anfetamina.....	82
Tabla 7. Revisión de las concentraciones halladas en casos de muertes relacionados con la metanfetamina.....	84
Tabla 8. Revisión bibliográfica de las concentraciones halladas en los casos de muertes relacionados con MDMA.....	86
Tabla 9. Revisión bibliográfica de las concentraciones halladas en los casos de muertes relacionadas con MDA.....	89
Tabla 10. Revisión bibliográfica de las concentraciones halladas en los casos de muertes relacionadas con MDEA.....	89
Tabla 11. Revisión bibliográfica de las concentraciones halladas en los casos de muertes relacionadas con MBDB.....	90
Tabla 12. Revisión bibliográfica de las concentraciones halladas en los casos de muertes relacionadas con PMA.....	90
Tabla 13. Revisión bibliográfica de las concentraciones halladas en los casos de muertes relacionadas con el consumo de una combinación de anfetaminas.....	91

Tabla 14. Gradiente utilizado en el método de determinación de drogas básicas en plasma. La columna empleada fue Atlantis dC18, 3µm, 2.1x100mm, a una temperatura de 26°C.....	131
Tabla 15. Gradiente utilizado en el método de determinación de siete anfetaminas en hígado. La columna empleada fue Atlantis dC18 3µm 2.1x100mm, a una temperatura de 26°C.....	131
Tabla 16. Gradiente utilizado en el método de determinación de siete anfetaminas en orina. La columna empleada fue Atlantis dC18, 3µm 2.1x20mm IS a una temperatura de 22°C.....	131
Tabla 17. Tabla de las máximas desviaciones toleradas de las intensidades relativas de iones para asegurar una correcta identificación.....	145
Tabla 18. Principales parámetros del espectrómetro de masas, el tiempo de retención y el patrón interno seleccionado en cada caso, en el método de determinación de opiáceos, cocaína y anfetaminas en plasma.....	164
Tabla 19. Principales parámetros del espectrómetro de masas, el tiempo de retención y el patrón interno seleccionado en cada caso, en el método de determinación de los siete derivados anfetamínicos en sangre.....	165
Tabla 20. Principales parámetros del espectrómetro de masas, el tiempo de retención y el patrón interno seleccionado en cada caso, en el método de determinación de los siete derivados anfetamínicos en hígado.....	166
Tabla 21. Principales parámetros del espectrómetro de masas-masas, el tiempo de retención y el patrón interno seleccionado en cada caso, en el método de determinación de los siete derivados anfetamínicos en orina.....	177
Tabla 22. Principales parámetros de validación para el método de determinación de las drogas básicas en plasma.....	188
Tabla 23. Principales parámetros de validación para el método de determinación de los siete derivados anfetamínicos en sangre.....	191
Tabla 24. Principales parámetros de validación para el método de determinación de los siete derivados anfetamínicos en hígado.....	193

Tabla 25. Principales parámetros de validación para el método de determinación de los siete derivados anfetamínicos en orina.....	195
Tabla 26. Efecto matriz de la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la PMA, la MDMA, la MDEA, la MBDB, la anfetamina-d ₆ , la MDA-d ₅ , la MDMA-d ₅ y la MBDB-d ₅ en el método de determinación de estos compuestos en orina.....	198
Tabla 27. Estabilidad de las drogas básicas en plasma a 5 y 50 ng/mL tras tres ciclos de congelación/descongelación.....	201
Tabla 28. Estabilidad de los siete derivados anfetamínicos en sangre a 5 y 50 ng/mL tras tres ciclos de congelación/descongelación.....	201
Tabla 29. Estabilidad de los siete derivados anfetamínicos en orina a 5 y 50 ng/mL tras tres ciclos de congelación/descongelación.....	202
Tabla 30. Resultados analíticos de los casos clínico/judiciales del IUML positivos, indicando el lugar de procedencia del mismo, la edad/sexo del sujeto, el resultado cuantitativo en plasma de las sustancias estudiadas, y otros hallazgos, como alcohol y otras sustancias presentes.....	203
Tabla 31. Resultados cuantitativos de los casos de muertes en accidentes de tráfico del IUML positivos a alguna de las drogas investigadas, indicando además la edad, el sexo, y otros hallazgos del laboratorio.....	208
Tabla 32. Resultados cuantitativos de las anfetaminas presentes en las muestras procedentes de sujetos vivos de la Delegación de Lisboa del INML, indicando además para cada caso la edad, el sexo, información del caso, y otros hallazgos del laboratorio.....	213
Tabla 33. Resultados cuantitativos de las anfetaminas presentes en las muestras postmortem de la Delegación de Lisboa del INML, indicando además para cada caso la edad, el sexo, información del caso, y otros hallazgos del laboratorio.....	215

ABREVIATURAS

A	Anfetamina
ACN	Acetonitrilo
Alpra	Alprazolam
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APCI+	Atmospheric Pressure Chemical Ionization modo positivo
APCI-	Atmospheric Pressure Chemical Ionization modo negativo
API	Atmospheric Pressure Ionization
BDB	3,4-(metilenedioxifenil)-2-butanamina
Beg	Benzoilecgonina
CID	Collision Induced Dissociation
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
C _{max}	Pico de concentración plasmática
Coca	Cocaína
COHb	Carboxihemoglobina
CV	Coeficiente de variación
DEA	Drug Enforcement Agency
Dia	Diazepam
Ec	Energía de colisión
EMCDDA	Observatorio Europeo de Drogas y Toxicomanías
ESI	Electrospray
ESI+	Electrospray modo positivo
ESI-	Electrospray modo negativo
F	Flujo
FDA	Food and Drug Administration
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases-Espectrometría de masas Chromatographie gazeuse-Spectrométrie de masse
GHB	Gammahidroxibutírico
HHA	3,4-dihidroxianfetamina
HHEA	3,4-dihidroxietilamfetamina
HHMA	3,4-dihidroximetamfetamina

HMMA	4-hidroxi-3-metoximetanfetamina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta resolución con detector barrido de diodos
HPLC-FD	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia
ICH	Internacional Conference Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
INML	Instituto Nacional de Medicina Legal
IUML	Instituto Universitario de Medicina Legal de Santiago de Compostela
LC-MS	Cromatografía de líquidos-Espectrometría de masas Chromatographie liquide-Spectrométrie de masse
LC-MS/MS	Cromatografía de líquidos-Espectrometría de masas en tandem Chromatographie liquide-Spectrométrie de masse en tandem
LLOQ	Límite inferior de cuantificación
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LSD	Dietilamida del ácido lisérgico
MA	Metanfetamina
6-MAM	6-monoacetilmorfina
MBDB	N-metil-1-(3,4-metilendioxfenil)-2-butanamina
MDA	3,4- metilendioxfanfetamina
MDEA	3,4-metilendioxiétanfetamina
MDMA	3,4-metilendioximetanfetamina
MeOH	Metanol
MRE	Error medio relativo
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Espectrómetro de masas Spectromètre de masse
MS-MS	Espectrómetro de masas en tandem Spectromètre de masse en tandem

m/z	Relación masa/carga Rapport masse/charge
Nordia	Nordiazepam
OED	Observatorio Español sobre Droga
11-OH-THC	11-Hidroxi- Δ^9 -Tetrahidrocannabinol
ONUDD	Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el delito
Opi	Opiáceos
PI	Patrón interno
PM	Peso molecular
PMA	Parametoxianfetamina
Q	Quadrupolo Quadripôle
QqQ	Triple-quadrupolo Triple-quadrpôle
r^2	Coeficiente de determinación
SACI	Surface-Activated Chemical Ionization
SACI+	Surface-Activated Chemical Ionization modo positivo
SD	Desviación estándar
SIM	Selected Ion Monitoring
S/N	Relación señal/ruido
SNC	Sistema nervioso central
SNV	Sistema nervioso vegetativo
SSI	Sonic Spray Ionisation
SSI+	Sonic Spray Ionisation modo positivo
$t_{1/2}$	Vida media
THC	Δ^9 -Tetrahidrocannabinol
THC-COOH	Carboxi- Δ^9 -Tetrahidrocannabinol
TIAFT	The International Association of Forensic Toxicologist
$t_{\max}$	Tiempo necesario para alcanzar $C_{\max}$
TR	Tiempo de retención
TS	Thermospray
TS+	Thermospray modo positivo
ULOQ	Límite superior de cuantificación

uma	Unidad de masa atómica Unité de masse atomique
V _c	Voltaje de cono Voltage de cône
V _D	Volumen de distribución

I. ASPECTOS GENERALES

1. DEFINICIÓN

La expresión “drogas de diseño” proviene del término inglés *designer drugs*, que también puede ser traducido por *drogas a medida* o *drogas a escala* [1]. Las drogas de diseño son, según la definición dada por Gary Henderson de la Universidad de California en los años sesenta, “aquellas sustancias psicoactivas obtenidas sintéticamente, con propiedades farmacológicas y estructura química similar a otras ya existentes, pero con modificaciones que permiten evitar su control legal” [2].

Es decir, serían drogas de diseño aquellas sustancias sintetizadas sin propósito terapéutico con el objetivo de surtir el mercado ilegal, sustancias sintetizadas por la industria farmacéutica que pasan al mercado ilegal sin ser comercializadas como medicamentos y, también los psicotropos sintéticos utilizados actualmente en terapéutica, que se desvían al mercado ilegal.

No deben considerarse drogas de diseño las nuevas formas de presentación o nuevas vías de administración de drogas ya existentes, como puede ser el *crack* (cocaína base fumada) o el *ice* (anfetamina base fumada). Tampoco deben considerarse como tales, combinaciones de distintas drogas, como el *speed ball* que es la combinación de cocaína y anfetamina, los *cañones o dragones*, de cocaína y heroína, o el *calvin klein* o *CK*, una mezcla de cocaína y ketamina.

2. CLASIFICACIÓN DE LAS DROGAS DE DISEÑO

Las drogas de diseño pueden clasificarse en distintos grupos según la molécula de la que deriven [3]. En consecuencia se pueden establecer los siguientes:

- **Derivados de feniletilamina**

Los compuestos pertenecientes a este grupo comparten como estructura base la feniletilamina (fig. 1).

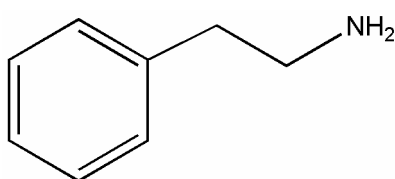


Figura 1. Estructura química de la feniletilamina.

Sus principales representantes son: la metanfetamina, la MDA (3,4-metilendioxfanfetamina), la MDMA (3,4-metilendioxi metanfetamina), la MDEA (3,4-metilendioxi etil anfetamina), la MBDB (N-metil-1-(3,4-metilendioxi fenil)-2-butanamina), la PMA (parametoxianfetamina), la TMA-2 (2,4,5-trimetoxianfetamina), la DOM (4-metil-2,5-dimetoxianfetamina), la DOB (4-bromo-2,5-dimetoxianfetamina), la 2-CB-MFT (4-bromo-2,5-dimetoxifenil anfetamina), la 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina, la 2,4,5-MEM (4-etoxi-2,5-dimetoxianfetamina), el 4-metilaminorex (4,5-dihidro-4-metil-5-fenil-2-oxazolamina), la N,N-dimetilMDA (3,4-metilendioxi-N,N-dimetil anfetamina), la N,N-DMA (N,N-dimetil anfetamina), la para-DOT (4-tiometil-2,5-dimetoxianfetamina), la PMMA (parametoxi metanfetamina).

La más popular de estas sustancias es la MDMA, conocida popularmente con el nombre de *éxtasis*, aunque también ha recibido otras denominaciones como *XTC*, *X-X*, *M&M*, *MDM*, *E*, *Doctor*, *Disco Biscuit*, etc. [3,4]. El nombre de *ADAM* es el más frecuente en el ámbito de la psicología clínica [5]. Los demás derivados también tienen sus correspondientes nombres en el argot callejero. Así, la metanfetamina recibe los nombres de *speed*, *crack*,

meth, o *ice*, *crystal*, en el caso de su variante fumada [4], la MDA es más conocida como la *píldora del amor*, y MDEA como *Eva* [6].

Se debe tener en cuenta que estas denominaciones cambian entre los países, y a lo largo del tiempo. Además, existe una gran variabilidad en la composición de las pastillas, pudiendo contener éstas además de los distintos derivados de feniletilamina, otras sustancias como efedrina, cocaína, fentanilo, etc. Los nombres empleados por los consumidores para diferenciar las pastillas se refieren generalmente al logo que aparece en las mismas (Mitsubishi, Superman, etc.), pero no indica su composición química [7].

▪ Derivados del fentanilo

El fentanilo (fig. 2) es un opiáceo sintético, de 50 a 100 veces más potente que la morfina, empleado como anestésico [6]. Existen numerosos derivados, como el AMF (alfametilfentanilo), el 3MF (3-metilfentanilo), el PFF (parafluorofentanilo), el AMAF (alfametilacetilfentanilo) [3]. El AMF, o *china white*, apareció hacia 1980 en Estados Unidos, y se le atribuyeron setenta muertes y varios casos de lesiones cerebrales graves en California [8].

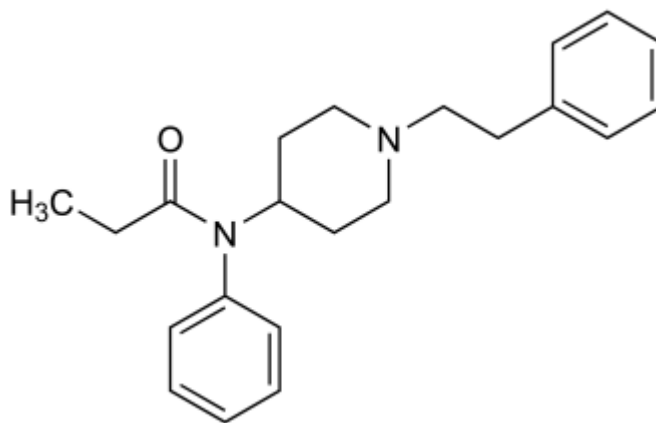


Figura 2. Estructura química del fentanilo [9].

▪ Derivados de la meperidina

La meperidina o petidina (fig. 3), es un potente analgésico narcótico de acción corta, utilizado en el tratamiento del dolor moderado a severo, y como coadyuvante en la anestesia [6]. Como derivados encontramos la MPPP (1-

metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina) y la MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) [3].

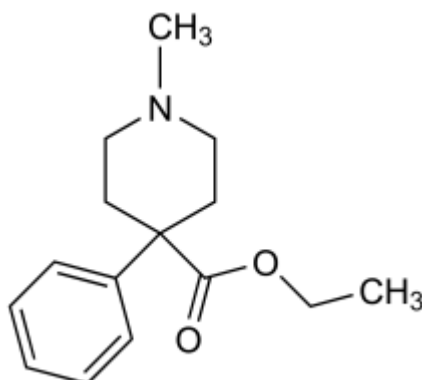


Figura 3. Estructura química de la meperidina [9].

▪ Arilhexilaminas

Dentro de los derivados de la arilhexilamina (fig. 4), el más importante es la fenciclidina o PCP. La PCP fue utilizada como anestésico hasta 1963, produciendo en los pacientes alucinaciones y síntomas de disociación [6]. Análogos de la PCP son el PCC (piperidino ciclohexano carbonitrilo), la TCP (tiofenofenciclidina), la PCE (N-etilfenciclidina) y la PHP (fenilciclohexilpirrolidina) [3].

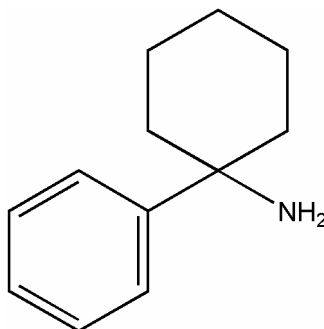


Figura 4. Estructura química de la fenciclidina (PCP) [9].

▪ Derivados de la metacualona

La metacualona (fig. 5) es un hipnótico, sintetizada en la India en 1955 para luchar contra la Malaria, derivado de la quinazolina (o quinazolona). Produce efectos que se asemejan a los de los barbitúricos de acción rápida. Fue comercializada en Europa, en los Estados Unidos y en el Japón desde 1965. Pero desde 1972, una reglamentación estricta se aplica en los diferentes

países. De entre sus derivados destacamos la meclocualona y la nitrometacualona [3].

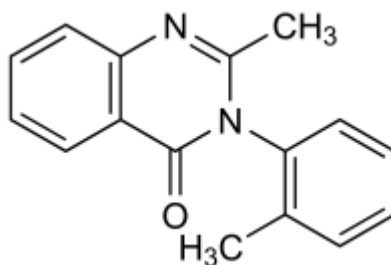


Figura 5. Estructura química de la metacualona [9].

Según la definición dada, bajo el término “drogas de diseño” se engloba pues un amplio y heterogéneo grupo de sustancias, dentro de las que se hallan los derivados de feniletilamina, que serán las sustancias objeto de estudio, en la presente tesis doctoral.

3. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA

La anfetamina es un sucedáneo sintético de un alcaloide de la *Ephedra vulgaris*, usada durante milenios por los herbolarios chinos como antiasmáticos. En 1885 el japonés Nagai aisló la efedrina, y en 1926 el chino Chen estudió su empleo clínico. La producción y comercialización de la primera anfetamina, la *bencedrina*, comienza en los Estados Unidos hacia 1930, cuando todavía está en vigor la Ley Seca, para mantener despiertos a sujetos que abusaban de los hipnóticos o los sedantes. Poco después aparecen en las farmacias unos inhaladores recomendados para todo tipo de congestiones nasales. Algo más tarde se comercializa en forma de píldoras contra el mareo y la obesidad, para luego emplearse en clínica como antidepresivos. Otras de sus aplicaciones han sido el tratamiento de la narcolepsia y del síndrome de hiperactividad en niños [6]. Tras la *bencedrina*, aparece en el mercado uno de sus isómeros, la dexanfetamina o *dexedrina*, y en 1938 la metanfetamina [8].

Su potencial como droga de abuso fue puesto de manifiesto durante la Segunda Guerra Mundial. A pesar de esto, el ejército alemán, japonés, así como los aliados, utilizaron las anfetaminas para mantener a los soldados en estado de alerta y evitar la fatiga [6], siendo el primer banco de pruebas de estos usos la guerra civil española [8]. Incluso, se conoce que el propio Führer era un consumidor habitual de estas sustancias.

Junto a estos usos bélicos, las anfetaminas inauguraron el doping, siendo el ciclismo el deporte dónde gozaron de mayor popularidad [8].

En la actualidad, la anfetamina está clasificada como droga de abuso con limitado uso terapéutico [6]. En España, ahora no existe ningún medicamento comercializado que contenga como principio activo la anfetamina.

La MDA fue sintetizada en 1910 por dos químicos de la compañía farmacéutica Merck de Darmstadt (Alemania), G. Mannish y W. Jacobsen. En 1914 fue patentada con la intención de introducirla en el mercado como fármaco anorexígeno, derivado de la anfetamina, pero sin sus efectos estimulantes. Sin embargo, nunca llegó a ser comercializada [5].

Con esta misma finalidad de encontrar un nuevo y mejor fármaco anorexígeno, la misma compañía farmacéutica sintetizó la MDMA en 1912,

pero ésta ya ni siquiera llegó a patentarse, y poco después de haber sido sintetizada cayó en el olvido. No sería hasta la década de los cincuenta, cuando el ejército americano la utilizó, junto con otras sustancias, bajo la codificación de “agente experimental nº 1475”, en estudios toxicológicos en animales. En aquella época la armada americana, estaba sumamente interesada en hallar nuevas armas químicas que fuesen aplicables en el contraespionaje, y los psicodélicos parecían constituir unos agentes muy adecuados para los interrogatorios de los sospechosos. No obstante, no existen datos de que la MDMA fuese utilizada para tales fines [3].

Años más tarde, en 1965, el químico californiano Alexander Shulgin, sintetiza de nuevo la MDMA, y a partir de entonces comienza a ensayar con ella, y a difundirla entre personas cercanas a él. Shulgin representó para este tipo de compuestos, lo que Hoffmann décadas antes para LSD y afines. Diez años más tarde, en 1976, Shulgin y Nichols publican el primer informe sobre los efectos psicoactivos de la MDMA. Este hermetismo alrededor de la MDMA, se debió probablemente a que los profesionales que la utilizaban con fines terapéuticos, sentían temor a que sucediera algo semejante a lo que había ocurrido con el LSD, el cual, tras la difusión pública de sus efectos psicoactivos, pasó de ser un instrumento de ayuda para psicoterapeutas a ser una droga ampliamente difundida, gozando de gran popularidad entre los integrantes del movimiento *Hippy*, y a partir de ese momento, fue muy pronto ilegalizada [10].

El tráfico ilegal de la MDMA comenzó en los años setenta, cuando un grupo de químicos y empresarios comenzaron a producirla en un laboratorio de California [11]. En un primer momento, la MDMA se distribuía acompañada de folletos en los que se informaba acerca del modo de consumirla sin riesgos, y otra serie de recomendaciones [12]. Este laboratorio californiano llegó a producir 500.000 dosis al mes en 1985, y la droga estaba disponible en 22 estados norteamericanos, y en Canadá. Es por esta época, en los años ochenta, cuando se inicia su distribución en Europa [13].

Desde el año 1967 hasta su muerte en 1977, el psicólogo Leo Zoff tras una entrevista con Shulgin, se dedicó a viajar por Estados Unidos, aconsejando la MDMA a otros terapeutas y enseñándoles como usarla para su trabajo [5].

El período comprendido entre los años 1977 y 1985 puede considerarse como la edad de oro de la MDMA. Durante esta época los usuarios se

restringen a círculos terapéuticos, y a los integrantes del movimiento *Nueva Era* (*New Age*), los *neoeristas*, que lo utilizaban por sus propiedades expansoras de la mente [3]. Este movimiento es un agregado de creencias y prácticas relacionadas con la exploración espiritual, la medicina holística y el misticismo. A finales de 1984, siendo todavía una droga completamente legal, comienza a introducirse en ambientes estudiantiles y en los ambientes frecuentados por los *young urban professional people*, o más conocidos con *yuppies*, que si bien utilizaban en más cuantía la cocaína, no desdeñaban en absoluto las posibilidades de esta sustancia [14]. Los *yuppies* introdujeron el éxtasis en los clubs más exclusivos de Chicago, Nueva York, San Francisco y Detroit [3].

El conocido psiquiatra estadounidense Timothy Leary, profesor de Harvard y expulsado en 1965 de esta universidad por sus experimentos psicodélicos y considerado uno de los propulsores de la contracultura hippie [1], consideraba a la MDMA como “la droga de la década” de los ochenta. El mayor inconveniente de la sustancia residía, según él, en el “síndrome del matrimonio instantáneo”, ya que la fuerza emocional de algunas experiencias con MDMA, podían potenciar relaciones tan intensas que llevasen casi de forma inmediata al altar. Por aquella época, comenzaron a aparecer en los campus de algunas universidades americanas camisetas con el slogan “Don’t get married for 6 weeks after XTC” [15].

De este modo, el consumo tranquilo y más o menos hermético de MDMA se estaba convirtiendo en la última moda en materia de drogas que seducía a *yuppies*, *gays*, estudiantes, y cada vez más, a todo tipo de gente [1]. La expansión del uso-abuso del MDMA está muy relacionada con movimientos musicales, como los denominados *acid house* y *techno*. Estos movimientos musicales surgieron en Estados Unidos, en los clubs dónde se utilizaba esta sustancia. La popularidad de la MDMA era cada vez mayor, por lo que su ilegalización parecía inevitable.



Figura 6. Cómic de la campaña contra el consumo de éxtasis en EE.UU. “Just say No” (1988). El famoso héroe Batman lucha contra el malvado villano, traficante de éxtasis.

En el año 1984, ante los datos referidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que ponían de manifiesto que la MDMA era la única feniletilamina incautada de modo reiterado, la *Drug Enforcement Agency* (DEA) propone incluir la MDMA en la Lista I de la *Comprehensive Substances Act*, lo que implica que se considera que esta sustancia tiene un alto potencial de abuso, carece de uso médico conocido e incumple las normas de seguridad exigidas por la *Food and Drug Administration* (FDA) [3]. La lista I incluye las sustancias cuya venta está prohibida. En ella se encuentran, entre otras, la heroína, el LSD y la cocaína. En la lista II se agrupan sustancias estimulantes del sistema nervioso central (SNC) con uso médico, como la anfetamina. En la

lista III se incluyen sustancias juzgadas del mismo modo, pero que son depresoras del SNC. Por último en la lista IV, se incluyen tanto las excitantes como las depresoras del SNC. La finalidad de estas listas es establecer un baremo que juzgue tanto la utilidad terapéutica como el riesgo de abuso de una determinada droga. Las sustancias con un peligro mayor se colocan preferentemente en la lista I, y las de un mayor potencial sanitario en la IV. La colocación en una u otra lista depende de ambos factores [1].

Esta proposición de la DEA desencadenó una gran polémica, que llevó a una lucha entre los detractores de esta sustancia y sus defensores, entre los que estaban Shulgin y Nichols.

Gracias a los poderes especiales concedidos a la DEA por el Congreso de los Estados Unidos, mediante el *Comprehensive Crime Control Act* de 1984, tras las muertes y graves lesiones neurológicas producidas en algunos consumidores de *China White*, aquélla tiene capacidad para incluir por el procedimiento urgente cualquier sustancia en la Lista I durante 1 año, y esto es lo que hace. La inclusión definitiva del MDMA en esta Lista ocurre en 1986. A partir de este momento, los acontecimientos se desencadenan de un modo rápido, y la MDMA es considerada ilegal en ese mismo año, en Suiza, Alemania y España [3]. La MDA ya había sido incorporada a la lista I en 1970 [1].

Los otros derivados anfetamínicos (MDEA, MBDB, PMA), surgieron a partir de este momento, buscando derivados permitidos tras la ilegalización de la MDA y la MDMA, y buscando derivados más potentes.

Durante los años noventa uno de los principales defensores del consumo de la MDMA fue el británico Nicholas Saunders, el cual escribió numerosos libros relatando sus experiencias con esta sustancia [16]

La escena Rave

La palabra *rave*, término inglés que puede traducirse por “delirio”, se utiliza para referirse a un tipo de fiestas celebradas en espacios cerrados, con música fuerte y repetitiva, y con juegos escénicos de luces. Las *raves* se han relacionado con el *éxtasis* en repetidas ocasiones, pues sus rasgos están profundamente influenciados por él, del mismo modo que los *love-in*, *be-in* o *acid test*, *fiestas hippies*, lo fueron por el LSD.

A finales de los ochenta, *acid house*, *techno* y *éxtasis* atraviesan el océano desde América, y penetran en el viejo continente. En Ibiza empiezan a hacer furor en dos de las más famosas discotecas a nivel europeo de la época, Amnesia y Pachá, comenzando así la *escena rave* en 1987 [1,3].

En 1988 la juventud inglesa que veraneaba en Ibiza, importó estas fiestas a su país, donde en poco tiempo se convirtieron, junto con el consumo de *éxtasis*, en un fenómeno con importantes repercusiones sociales. Ante el acoso por parte de la policía, las *raves* pasaron de celebrarse en bares nocturnos, hacia localizaciones menos previsibles, como almacenes vacíos y campos abiertos al lado del *Orbital*, la autopista de circunvalación de Londres. Para hacer más difíciles las incursiones policiales, se mantenía en secreto el lugar donde se celebraría la fiesta hasta el último momento. Sin embargo, a veces, la gran concurrencia de las fiestas, de hasta 30.000 personas, facilitaba mucho su localización [1].

Ante las presiones de las autoridades inglesas, algunos promotores y *discjockeys* de las *raves* se desplazaron a California a principios de los noventa, comenzando su expansión en los Estados Unidos [3].

En España el *éxtasis* fue expandiéndose rápidamente por toda la península. A principios de los noventa se hizo muy popular la denominada *ruta del bacalao* en Valencia, una especie de peregrinaje entre discotecas, en dónde la música *techno* y el *éxtasis* eran los principales protagonistas.

Actualmente el uso de las drogas de diseño se está extendiendo a sectores cada vez más jóvenes de la sociedad, y asociado a distintos tipos de actos, ya no sólo musicales, sino también a encuentros de fútbol en el Reino Unido e Italia [3], a reuniones en locales de ocio nocturnos, en *afterhours*, etc.

II. FARMACOLOGÍA

1. ESTRUCTURA QUÍMICA Y PROPIEDADES

Las anfetaminas tienen como estructura base la feniletilamina. Los distintos derivados presentan sustituciones en el grupo amino o en el anillo bencénico [4]. Esta relación estructural entre los distintos derivados anfetamínicos se observa claramente en la figura 7.

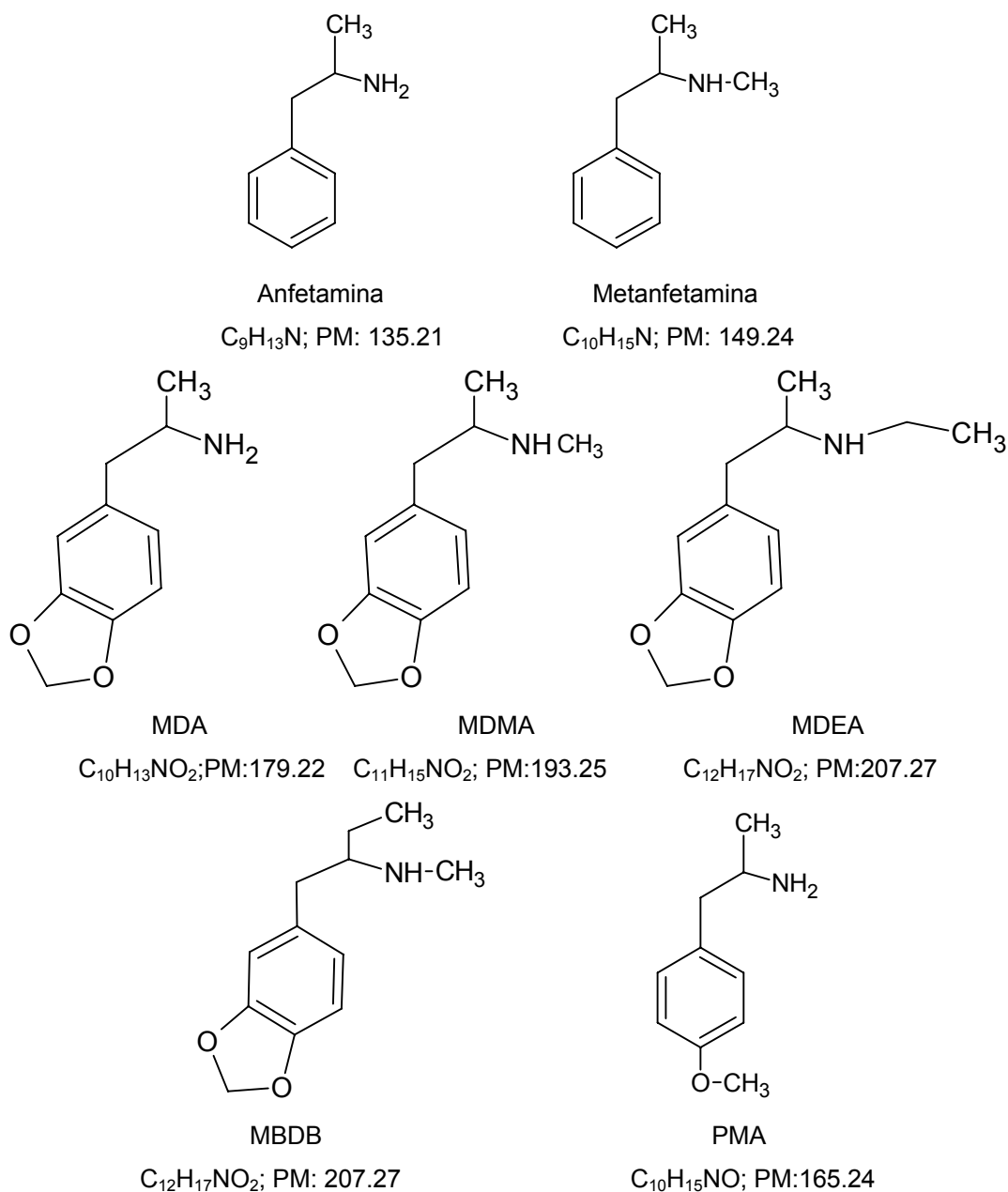


Figura 7. Estructura química, fórmula química y peso molecular (PM) de la anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB y PMA.

Estos compuestos también se hallan relacionados estructuralmente con la mescalina (fig. 8) [8], que es un alcaloide del cactus peyote (*Lophophora williamsii*) con propiedades alucinógenas [6].

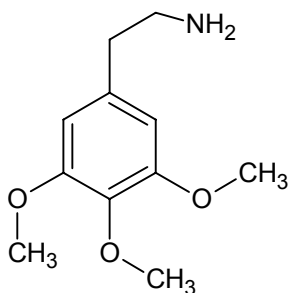


Figura 8. Estructura química de la mescalina.

La cadena lateral es muy importante en su mecanismo de acción. Así, por ejemplo, la presencia de un grupo etil en la posición α en el caso del MBDB, convierte al compuesto en un agente serotoninérgico, con baja o nulo efecto dopaminérgico y sin propiedades alucinógenas [17]. Tanto la α -etilación, como la N-alquilación, disminuyen la actividad alucinógena de los derivados anfetamínicos [18].

Los derivados anfetamínicos objeto de estudio, presentan un centro quiral en el carbono- α , es decir, el carbono adyacente al grupo amino, lo que implica la existencia de un par de enantiómeros [19]. Los enantiómeros de un determinado compuesto pueden presentar distintas actividades farmacológicas y diferentes características farmacocinéticas y farmacodinámicas [20]. En este caso, el S-isómero de la anfetamina es más potente como estimulante del sistema nervioso central (SNC) que el R-isómero, y el S-isómero de MDMA y de MDEA es el responsable de los efectos psicoestimulantes y favorecedores de las relaciones interpersonales o entactógenos [18], mientras que el R-isómero es el responsable de los efectos alucinógenos [17]. Normalmente se consume la mezcla racémica.

Las anfetaminas son bases débiles (con un pK_a alrededor de 9.9), de peso molecular bajo (entre 135 y 208 Daltons), con un bajo porcentaje de unión a proteínas (aproximadamente un 20%), y un elevado volumen de distribución (4 L/Kg) [9, 21-27]. Estas propiedades hacen que difundan fácilmente a través de las membranas celulares y capas lipídicas, y que se

acumulen en tejidos y matrices biológicas, como la saliva, que tengan un pH más ácido que el de la sangre (fenómeno del ión atrapado) [28].

Los metoxiderivados (MDA, MDMA, MDEA y MBDB), presentan un anillo sustituido, lo que hace que exhiban una fuerte fluorescencia con un máximo de excitación a 285nm. En efecto, al irradiar estos compuestos con una longitud de onda (λ) de 285nm se registra un máximo de emisión a 320nm. No existen diferencias apreciables en el espectro de estos cuatro compuestos [29].

2. FARMACOCINÉTICA

La farmacocinética estudia los procesos de absorción de la droga, su distribución en los tejidos del organismo, su metabolismo y su excreción. La farmacocinética nos sirve para conocer la duración de acción de una droga y la velocidad de su inactivación y eliminación [6].

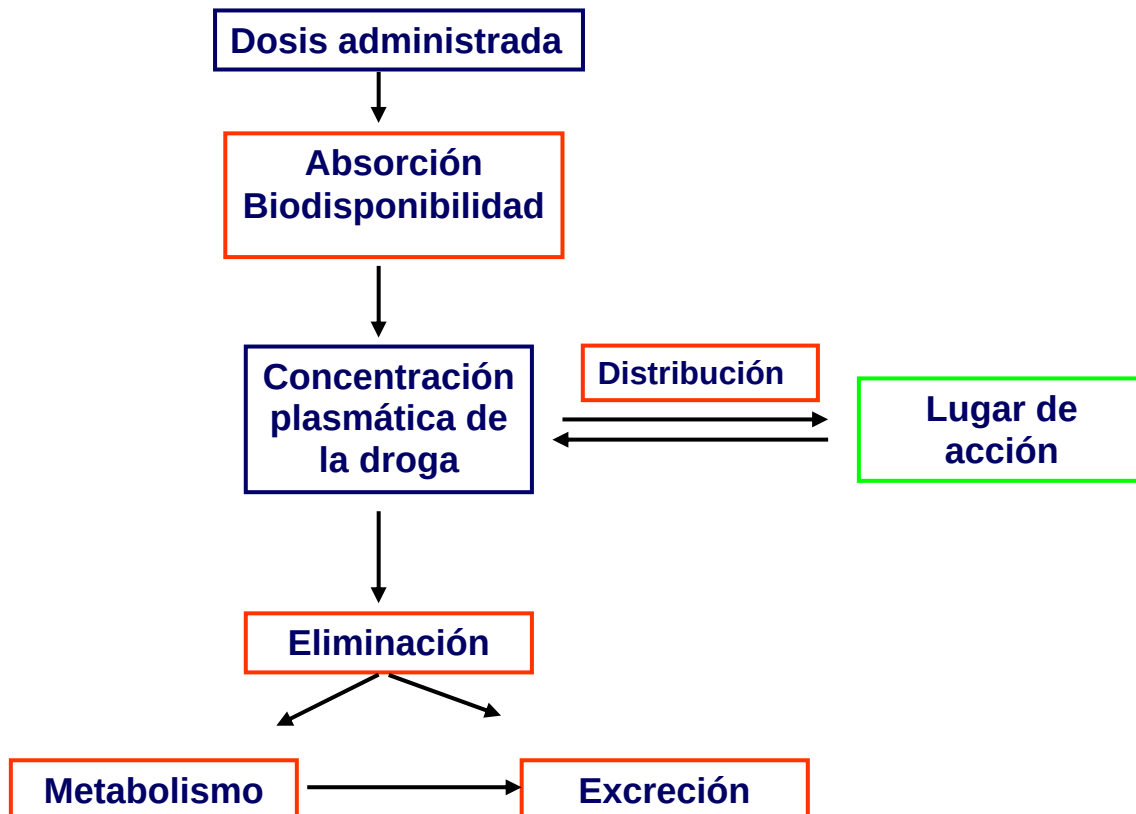


Figura 9. Esquema de las distintas etapas de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de un fármaco en el organismo.

2.1. ABSORCIÓN Y CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS

Las anfetaminas se absorben bien por vía oral, que suele ser la vía de administración más empleada en forma de pastillas (fig. 10), presentando buena biodisponibilidad (capacidad de la sustancia de llegar activa al torrente sanguíneo). Estas sustancias retrasan el vaciado gástrico y disminuyen la motilidad intestinal, retrasando así su propia absorción y la absorción de otras drogas consumidas con ellas. Esto también podría tener repercusión en la estimación de la data de la muerte en casos de sobredosis y cuando se utilice

el vaciamiento gástrico para la estimación de aquélla. El pico de concentración plasmática se alcanza, por término medio, entre 1-2h post-ingesta [6].

Otras vías de administración empleadas son: la inyección intravenosa, la inhalación (fumada) y la administración nasal (esnifada). La vía intravenosa es la vía de administración más eficaz y rápida, que produce una distribución inmediata de la droga en el organismo. El uso de esta vía responde a un deseo de intensificar la sensación de euforia que produce el consumo de este tipo de drogas [30]. La inhalación es utilizada en el caso de la metanfetamina. La metanfetamina suele fumarse en forma de hidrocloreto, inhalando el vapor de una pipa de cristal (fig. 11) calentada a unos 300°C. La rapidez de la absorción es elevada, alcanzándose el pico de concentración plasmática en minutos [6].



Figura 10. Ejemplo de pastillas de éxtasis con el logotipo “Motorola”.



Figura 11. Pipa de cristal utilizada para el consumo de metanfetamina.

La tabla 1 resume el pico de concentración plasmática ($C_{\max}$) y tiempo en el que se alcanza ($t_{\max}$), para cada una de las anfetaminas tras el consumo de la dosis indicada.

Tabla 1. Resumen de los principales parámetros farmacocinéticos tras el consumo de las dosis habitualmente utilizadas para la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la MDMA, la MDEA y la PMA.

Compuesto	Dosis (mg)	Vía de administración	C _{max} (ng/mL)	t _{max} (h)	Referencia bibliográfica
Anfetamina	40	Oral	69.1±5.7 (n=11)	2.2±1	31
Metanfetamina	50	Intranasal	113.0±23.1 (n=8)	2.7±1.2	32
	40	Fumada	50.9±24.7 (n=8)	2.5±3.9	32
	20	Oral	32.4±7.7	7.5±3.4	33
MDA	100	Oral	< 400		6
MDMA	150	Oral	441.9-486.9 (n=2)	1.5-2	34
MDEA	118.6	Oral	260.0±45.2 (n=6)	2.1±0.5	35
PMA	50-100	Oral	200-400		21, 36

2.2. DISTRIBUCIÓN

Las anfetaminas se distribuyen rápidamente en el organismo. Su bajo porcentaje de unión a proteínas (<20%) hace que la mayor parte de la droga esté libre en el plasma y pueda difundir al espacio extracelular. Además son bases débiles y de bajo peso molecular, por lo que difunden fácilmente a través de las membranas celulares y de las distintas barreras, como la barrera hematoencefálica. Esto explica sus importantes efectos a nivel del SNC [6]. Al tratarse de drogas básicas, quedarán atrapadas en tejidos donde el pH es menor que el pH sanguíneo (fenómeno del ión atrapado).

Con respecto a las diferencias entre los dos enantiómeros de la anfetamina, la unión a proteínas y el volumen de distribución de la S y R-anfetamina es semejante [37], mientras que la vida media de la S-anfetamina es más corta que la de la R-anfetamina, debido a que su metabolismo es más rápido [38].

El volumen de distribución de la metanfetamina es semejante al de la anfetamina (4 L/Kg), y no se ve afectado por la vía de administración utilizada [39, 40]. El uso conjunto con etanol reduce significativamente el volumen de distribución de la metanfetamina, debido a que el etanol desplaza a la metanfetamina de sus lugares de unión [40].

La información sobre los parámetros de distribución de la MDMA y sus análogos en humanos, tras una administración controlada, es muy limitada. Según los datos suministrados por de la Torre et al. [34], el volumen de distribución de MDMA es de 6.4 L/Kg. En lo que respecta a sus enantiómeros, Fallon et al. indican una distribución mayor para el S-isómero que para el R-isómero [41].

El elevado volumen de distribución (V_D) de las anfetaminas implica que tienen afinidad por los tejidos. El volumen de distribución se define como el hipotético volumen en el que se distribuye una droga en el organismo, y se calcula conociendo la cantidad total de droga absorbida y la concentración plasmática a tiempo cero. Se expresa en litro por kilogramo de peso corporal (L/Kg). Las drogas que no se distribuyen por los tejidos o por el espacio extracelular tienen un V_D de aproximadamente entre 0.05 L/Kg y 0.2 L/Kg. El contenido total de agua en el organismo es de 0.5 L/Kg, por lo que valores de $V_D > 0.5$ L/Kg son elevados e implican altos valores relacionados con una alta afinidad de la droga por acumularse en los tejidos, como ocurre en el caso de las anfetaminas [6]. Además las drogas con $V_D > 3$ L/Kg tienen más probabilidad de sufrir fenómenos de redistribución postmortem [42].

El paso de compuestos liposolubles desde la sangre a otros fluidos o matrices está regulado por el pK_a del compuesto y el pH del fluido biológico, relacionados mediante una versión modificada de la ecuación de Henderson-Hasselbach, que permitiría el cálculo teórico de la relación de concentraciones en el fluido y en el plasma (concentración en fluido/concentración en plasma) [43]. Debido a que las anfetaminas son bases débiles con bajo porcentaje de unión a proteínas, tienen tendencia a acumularse en fluidos y matrices de pH menor que el pH sanguíneo (pH sanguíneo = 7.4). Este fenómeno se denomina “ión atrapado” [18], ya que al pasar a través de una barrera lipídica del plasma a tejidos de pH < 7.4, los compuestos básicos que se encontraban en estado

neutro pasan a su forma ionizada, y bajo esta forma no son capaces de atravesar de nuevo la barrera, quedándose atrapados en los tejidos.

2.3. METABOLISMO

El metabolismo de las sustancias tiene por finalidad posibilitar su eliminación del organismo, mediante la formación de derivados hidrosolubles e inactivos. Sin embargo, las reacciones metabólicas pueden originar también metabolitos activos, e incluso más tóxicos que la sustancia que se pretende eliminar.

En el metabolismo se distinguen dos fases [6]:

- **Fase 1:** La molécula es modificada por oxidación, reducción e hidrólisis. El sistema enzimático responsable de realizar estas reacciones es el citocromo P450, conjunto de enzimas localizados principalmente en el hígado. Los metabolitos formados pueden ser activos o inactivos.
- **Fase 2:** Conjugación de la molécula o de sus metabolitos con moléculas endógenas muy hidrosolubles (glucurónidos, sulfatos, acetatos), formando ésteres. Para que se produzca esta reacción se requiere la presencia de grupos $-OH$, $-NH_2$ o $-SH_2$. El glucurónido es el conjugado más común en el caso de los metabolitos hidroxilados de las anfetaminas. El enzima responsable de la formación de los glucurónidos se localiza principalmente en el hígado. Los glucurónidos son inactivos.

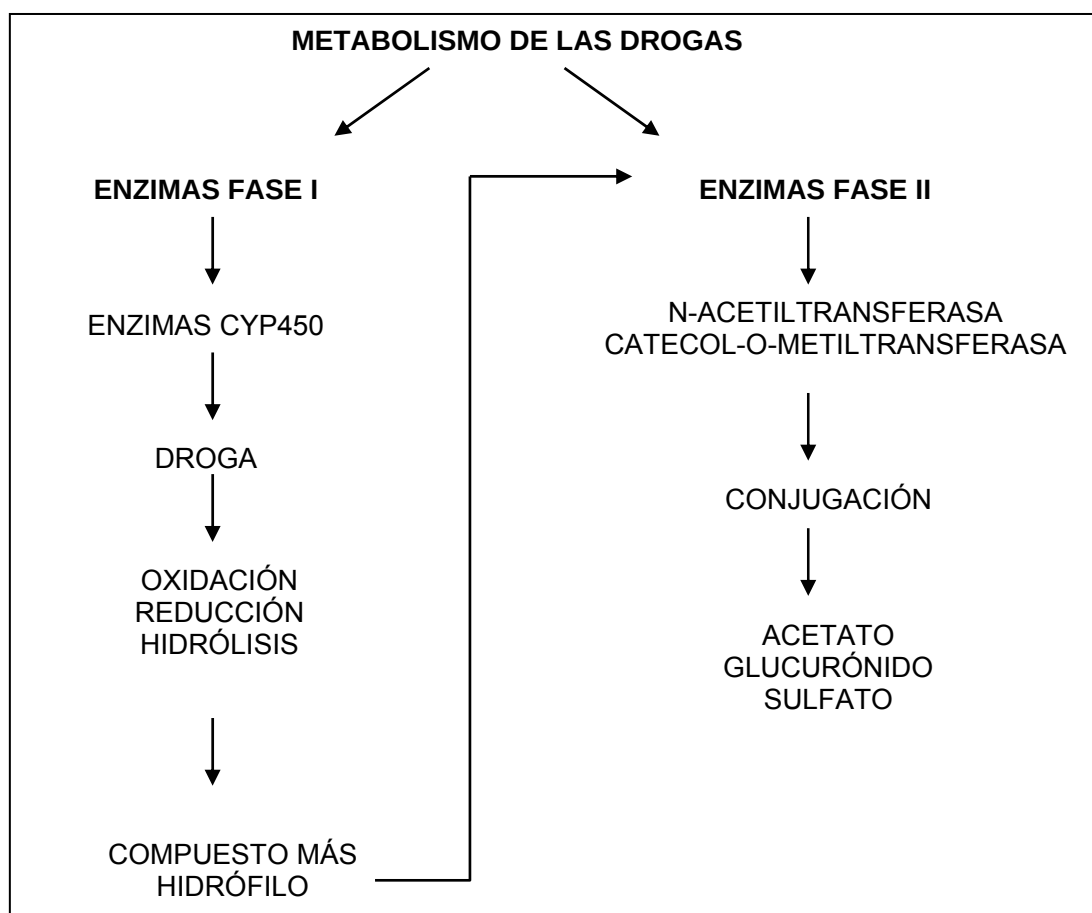


Figura 12. Diagrama del metabolismo de los xenobióticos [44].

Las principales reacciones de modificación de las anfetaminas en la fase 1 del metabolismo son la demetilación, la N-dealquilación y la hidroxilación aromática [45].

La demetilación consiste en la apertura del anillo metilendioxi, transformando a los derivados anfetamínicos en compuestos dihidroxilados denominados catecoles. Estos catecoles son metabolitos tóxicos, que continúan a su vez metabolizándose por glucuronidación y sulfatación. Estos metabolitos aparecen en la fase final de la excreción [46].

La N-dealquilación produce la formación de aminas primarias, que son oxidativamente deaminadas a los correspondientes derivados del ácido benzoico.

Por último, la hidroxilación aromática, que es la ruta menos importante, produce trihidroxianfetaminas, las cuales son neurotóxicas.

El metabolismo tiene lugar en los microsomas hepáticos, mediante distintos isoenzimas del citocromo P450. Los principales isoenzimas implicados

son CYP2D6, CYP3A4 y CYP1A2 [47]. Es importante conocer los enzimas que intervienen en el metabolismo, ya que el polimorfismo genético de los isoenzimas (metabolizadores lentos), o las interacciones con otras drogas que utilicen los mismos isoenzimas, puede explicar una respuesta individualizada a la droga.

Los metabolizadores lentos carecen del isoenzima CYP2D6, principal responsable de la reacción de demetilación. De todos modos, es difícil predecir los efectos según el tipo de metabolizador por dos razones: primero, hay más enzimas implicados en la demetilación de los derivados anfetamínicos e, incluso, mecanismos CYP-independientes [47], ya que los metabolizadores lentos también los metabolizan [48]; y segundo, la demetilación de estos derivados produce metabolitos catecoles que son tóxicos, por lo que, en tal caso, los metabolizadores lentos se verían favorecidos [45].

La figura 13 muestra las principales reacciones de metabolización (demetilación y N-dealquilación) indicando los isoenzimas implicados, para MDMA, MDA, MDEA y MBDB. En ningún caso la racemización de estos compuestos puede ocurrir en el metabolismo.

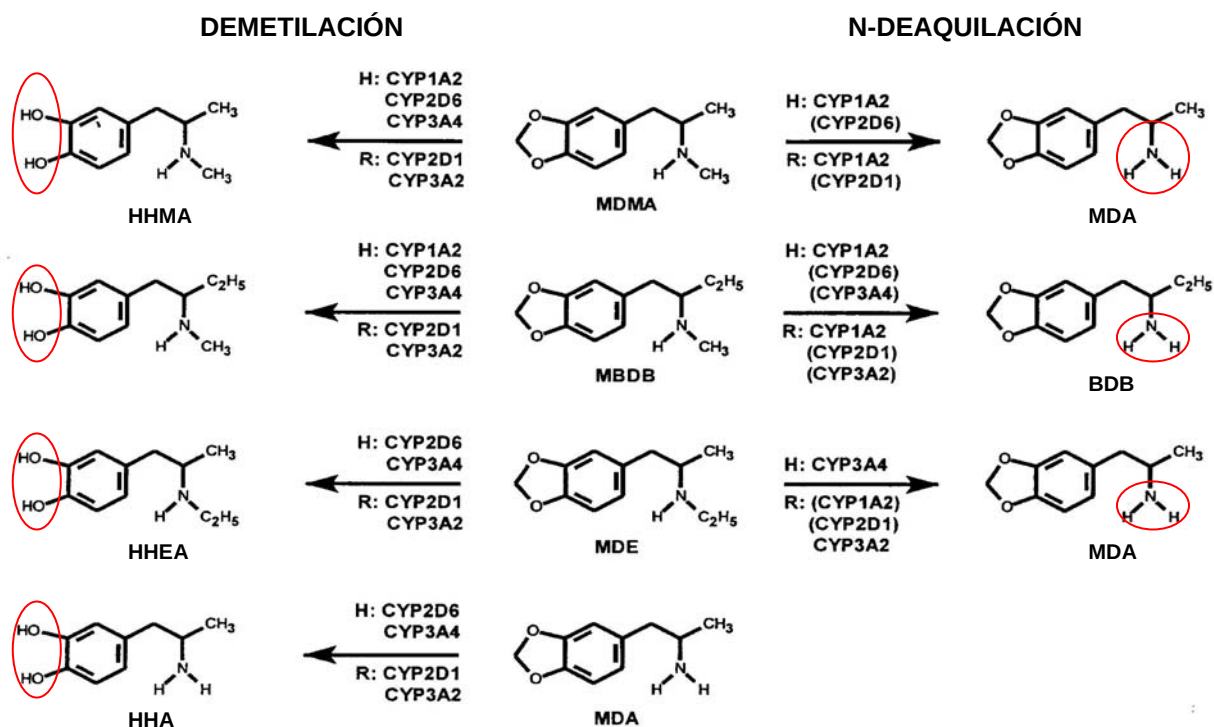


Figura 13. Reacciones de demetilación y de N-dealquilación para MDMA, MDA, MDEA y MBDB, y los isoenzimas responsables en humanos (H) y ratas (R) [47].

En el metabolismo de ciertas anfetaminas se originan otros derivados que son también principios activos. Tal es el caso del metabolismo de la metanfetamina que origina la anfetamina, y de la MDMA y la MDEA formando la MDA. Los medicamentos N-alquil derivados como la selegilina, la benzfetamina, la fenproporex, la clobenzorex, la famprofazona y la prenilarmina, en su metabolismo originan la anfetamina y la metanfetamina. En la fase final de excreción de estos medicamentos, no siempre es posible diferenciar entre el consumo ilícito de la anfetamina y la metanfetamina, del consumo legal de estos medicamentos, al no detectarse ni el principio activo ni ningún otro metabolito, que permita establecer la diferente procedencia de los metabolitos detectados.

2.4. EXCRECIÓN

La excreción de las anfetaminas ocurre principalmente por vía renal [49], siendo eliminada de forma inalterada una gran cantidad de la droga. Sin embargo, el pH de la orina va influir de forma importante en el porcentaje de la droga que se elimina de manera inalterada. Las anfetaminas son sustancias básicas por lo que a pH ácido serán hidrosolubles, lo que favorece su eliminación en la orina, y a pH básico serán liposolubles, lo que dificulta su eliminación y favorece su reabsorción a nivel renal. De esto se deduce que en orinas de pH ácido aparecerá un alto porcentaje de la droga en forma inalterada, y que en orinas de pH básico el porcentaje de la droga inalterada será bajo, ya que en estas condiciones la eliminación será mucho más lenta, por lo que podrían tener lugar las reacciones de metabolización en mucha mayor cuantía, y consecuentemente la cantidad de droga inalterada en la orina será menor [50]. El pH urinario depende de la dieta y del consumo de otras drogas, incluso algunos consumidores modifican el pH de la orina haciéndolo básico, mediante la ingesta de, por ejemplo, bicarbonato, en un intento de prolongar los efectos de estas sustancias.

La vida media $t_{1/2}$ (tiempo que tarda el organismo en eliminar del plasma la mitad de la droga absorbida) de la anfetamina es de 4-8 h en el caso de que la orina sea ácida, y de 12 h en el caso de orina básica. La vida media de la metanfetamina es, como media, 9 h. El porcentaje de anfetamina y metanfetamina que se elimina de forma inalterada en la orina varían entre 3-

55.5% y 15-55%, respectivamente, dentro de un rango de pH de 5 a 8 [50, 51], correspondiéndose los menores porcentajes con pH básicos, y los más altos con pH ácidos.

En el caso del consumo de metanfetamina, la anfetamina es detectable en orina como metabolito, y la relación de concentraciones urinarias de anfetamina/metanfetamina es normalmente menor o igual a 0.1 [6]. Tras la ingesta de una dosis de 30mg de metanfetamina, la concentración máxima de orina alcanzada es del orden de 5 µg/mL, y es detectable durante 2 días [6].

Los metilendioxi derivados experimentan la transformación metabólica en mayor medida que la anfetamina y la metanfetamina, por lo que la cantidad de droga inalterada en la orina será menor. Después de una administración de MDMA, el porcentaje de droga inalterada eliminada en la orina es de un 20%. El principal metabolito presente en la orina es la 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA), más de un 20%, seguido de 3,4-dihidroximetanfetamina (HHMA), sobre un 15%, y MDA, menos de un 2% [34, 52, 53].

Si la concentración en orina de MDA es aproximadamente un 10-15% de la concentración en orina de MDMA, debe interpretarse que el individuo ha consumido la MDMA, y que la MDA presente es un metabolito de ésta. Si la concentración de MDA es mayor al 10-15% de la concentración de MDMA, debe considerarse que el individuo ha consumido ambas drogas [54]. La vida media de la MDMA es de 6-7 h [9], inferior a la de la anfetamina y la metanfetamina. Tras una administración controlada de 100 mg de MDMA, la concentración máxima detectada en orina fue de 28.1 µg/mL, y de MDA, como metabolito, de 2.3 µg/mL [52]. La MDMA es detectable en la orina durante 3 días.

En el caso de la MDEA, tras la administración de una dosis de 140 mg, la concentración máxima detectada en orina de la droga inalterada fue de 24.9 µg/mL. La MDA fue hallada como metabolito [35, 55]. Tras una dosis de 100 mg de MBDB, la concentración máxima alcanzada fue de 18.6 µg/mL, y el de su metabolito BDB fue de 0.75 µg/mL. Ambas fueron detectables durante 36 h en orina [56].

Entre un 49% y un 83% de una determinada dosis de PMA se elimina en orina en 24 h, siendo un 15% eliminado en la forma inalterada [57].

3. MECANISMO DE ACCIÓN

El sistema nervioso tiene dos partes, el sistema nervioso periférico y el sistema nervioso central. Ambos tienen dos componentes funcionales interrelacionados: el sistema nervioso somático o de la vida de relación y el sistema nervioso vegetativo o autónomo.

El sistema nervioso vegetativo tiene la función de regular los aspectos vegetativos o viscerales del organismo. Inerva sin control voluntario estructuras glandulares, músculo cardíaco y liso. Dispone de centros situados en el propio sistema nervioso central (vías y núcleos), fibras aferentes, eferentes y ganglios que forman parte del sistema nervioso periférico. En el sistema nervioso vegetativo se consideran dos partes: sistema simpático y parasimpático.

El sistema nervioso vegetativo simpático prepara al organismo para defenderse en una situación de emergencia utilizando la energía: redistribuye la sangre favoreciendo los territorios de las vísceras, cerebro y músculos, mientras causa la constricción de los vasos sanguíneos periféricos cutáneos y del tubo digestivo; acelera el ritmo de los latidos cardíacos, aumenta la presión arterial y eleva la liberación de hormonas de la glándula adrenal; inhibe el peristaltismo intestinal y cierra los esfínteres. Puede actuar en todo el organismo y su neurotransmisor noradrenalina (y la adrenalina, de ahí la denominación de sistema adrenérgico) tiene una acción prolongada y difusa.

El sistema nervioso vegetativo parasimpático tiende a restaurar y conservar los niveles de energía: aumenta la absorción, secreción glandular y peristaltismo intestinal, abre los esfínteres, reduce la intensidad y frecuencia de los latidos cardíacos y del ritmo respiratorio. El parasimpático no suele presentar descargas masivas. Además, su neurotransmisor es la acetilcolina (sistema colinérgico) que puede ser rápidamente inactivado.

El sistema nervioso somático hace referencia a la vida en relación con el entorno, inervación de los músculos esqueléticos y a la sensibilidad general procedente de la piel (exteroceptiva), de los tendones, músculos y articulaciones (propioceptiva). Suele haber un control voluntario y una apreciación consciente de su funcionamiento [58].

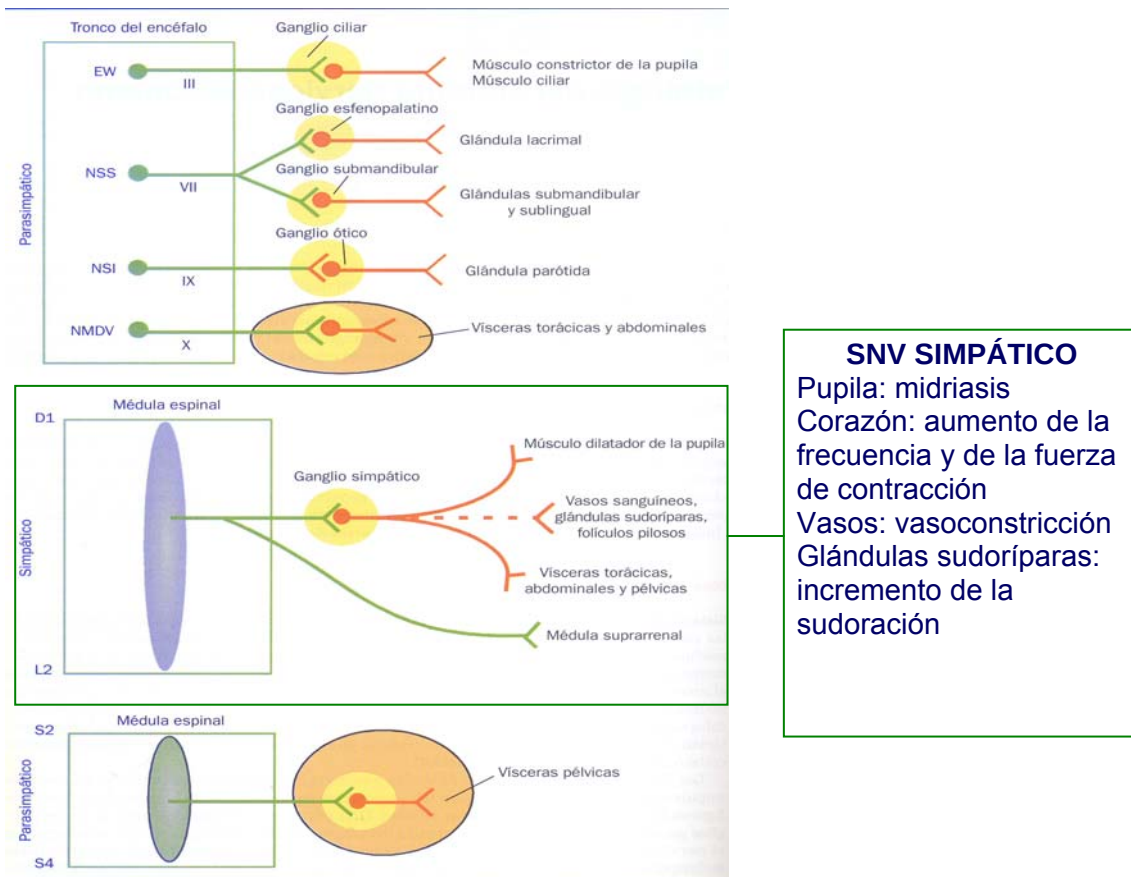


Figura 14. Esquema del sistema nervioso vegetativo simpático y parasimpático [59].

Las anfetaminas presentan similitud estructural con los neurotransmisores como noradrenalina, dopamina y serotonina (fig. 15), por lo que parece lógico suponer que van a ejercer algún tipo de interferencia con la función de los mismos en el sistema nervioso central (SNC) y periférico.

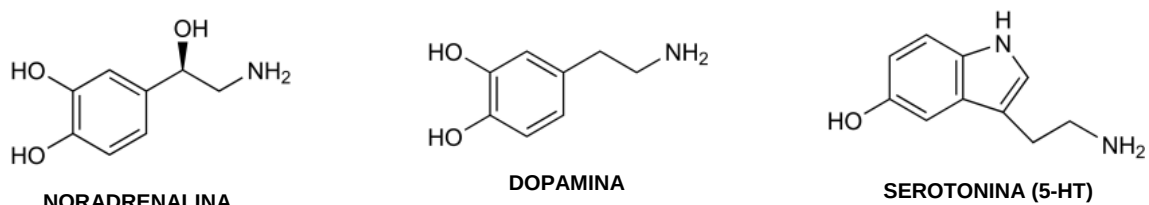


Figura 15. Estructura química de los neurotransmisores noradrenalina, dopamina y serotonina.

Las anfetaminas actúan a nivel de la sinapsis (fig.16) como falsos neurotransmisores, reemplazando a la noradrenalina y a la dopamina, o facilitando la liberación de los neurotransmisores noradrenalina, dopamina y serotonina, aumentando de este modo el efecto que estas sustancias provocan. Este último es probablemente el mecanismo dominante.

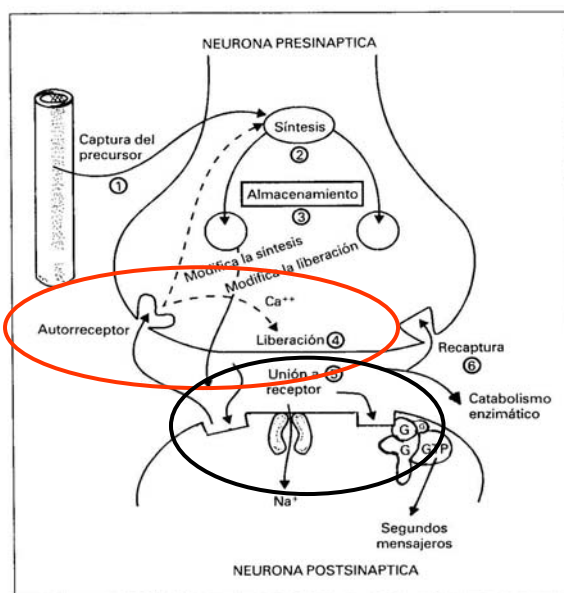


Figura 16. Sinapsis. En rojo está marcado el mecanismo de acción facilitando la liberación de neurotransmisores, y en negro el mecanismo de falso neurotransmisor [60].

A nivel central la activación de las neuronas serotoninérgicas y dopaminérgicas, es responsable de los cambios de conducta asociados al consumo de anfetaminas.

Los derivados anfetamínicos elevan los niveles extracelulares de serotonina (5-HT) y de dopamina en el nucleus accumbens de la región límbica de la rata [61]. Su mecanismo de acción en neuronas serotoninérgicas es totalmente distinto al de los alucinógenos que también actúan a este nivel, en particular en los receptores 5-HT₂ [61]. En el sistema serotoninérgico, la MDMA facilita la liberación de serotonina (5-HT), sin embargo, la administración crónica de la droga produciría un deterioro de la función serotoninérgica muy duradera y, a veces, irreversible. Aunque posee escasa actividad agonista sobre los receptores 5-HT es posible que algunos efectos psicoactivos se deban también a interacciones de la droga con receptores postsinápticos de este neurotransmisor.

Por vía dopaminérgica las anfetaminas actúan favoreciendo la liberación de dopamina de las vesículas, inhibiendo la monoaminoxidasa y bloqueando la recaptación de las catecolaminas [61].

Las anfetaminas, especialmente la metanfetamina y la MDMA, son neurotóxicos y causan daño duradero o permanente en neuronas serotoninérgicas y dopaminérgicas en el cerebro. El mecanismo de esta

neurotoxicidad no es conocido completamente, pero se cree que están implicados determinados metabolitos tóxicos [62] y la hipertermia que producen estos compuestos. Un estudio realizado por investigadores de la Facultad de Medicina Johns Hopkins en EE.UU. [63], pone de manifiesto la neurotoxicidad de la MDMA. El estudio realizado en primates, correlaciona el daño cerebral ocasionado por la MDMA, con un considerable aumento del riesgo a sufrir la enfermedad de Parkinson.

A nivel periférico, la adrenalina y la noradrenalina actúan en unos determinados receptores, denominados α y β -adrenoceptores. La activación de los α -adrenoceptores provoca la contracción del músculo liso en los vasos sanguíneos, aumentando la resistencia periférica y la presión sanguínea. La activación de los β -adrenoceptores en el corazón provoca el aumento del ritmo cardiaco y de la fuerza de contracción. Existen diferentes subtipos de estos receptores, que controlan distintas funciones en el organismo [6].

4. FARMACODINAMIA (EFECTOS FARMACOLÓGICOS Y TÓXICOS)

Los efectos de las anfetaminas se derivan directamente de su mecanismo de acción, como estimulantes del sistema nervioso simpático. Los principales efectos farmacológicos y tóxicos. Son:

4.1. EFECTOS CARDIOVASCULARES

Una de las principales respuestas observadas tras el uso de las anfetaminas es el aumento de la presión arterial y la alteración de la función cardíaca causada por la actividad simpaticomimética. Se produce un aumento del ritmo cardíaco y de la fuerza de contracción. Otras complicaciones vasculares son vasoespasmo, edema, necrosis, dolor y parestesia. El aumento de la presión arterial y los vasoespasmos inducidos por la droga pueden ser la causa de accidentes cerebrovasculares [6, 30].

4.2. EFECTOS SOBRE EL MÚSCULO LISO

Los efectos sobre el músculo liso son similares a los que ocurren en el corazón. Aumentan el tono muscular y pueden causar temblor. El aumento del tono de los esfínteres produce retención urinaria. Las anfetaminas reducen la motilidad intestinal y retrasan así su propia absorción [6].

Uno de los efectos más graves asociado al consumo de los derivados anfetamínicos, es la rabdomiolisis (lisis de las fibras musculares), causada por la hipertermia, que cursa con la eliminación de grandes cantidades de mioglobina en la orina, que pueden desencadenar un fracaso renal agudo, situación clínica extremadamente grave [6].

4.3. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Los propios usuarios de los derivados anfetamínicos destacan como principales efectos los siguientes [6]:

- Alteraciones del estado de ánimo: euforia, hiperactividad, felicidad, desinhibición, aumento de la autoestima.
- Cambios en las relaciones interpersonales: mayor aceptación de los otros, mayor locuacidad, deseo de establecer algún tipo de contacto físico con otras personas, empatía y mayor intimidad.

- Alteraciones de la percepción: distorsiones perceptivas, mayor agudeza perceptiva, alucinaciones acústicas, alucinaciones visuales.
- Cambios del comportamiento sexual: aumento del deseo sexual.
- Alteraciones en los procesos cognitivos: mayor atención, mayor claridad de ideas y mayor capacidad de concentración [64]. Este aumento del rendimiento mental es más una percepción del consumidor que una realidad.
- Aumento del estado de alerta.
- Reducción de la fatiga: sería el efecto buscado por personas como conductores de largo recorrido, que realizan actividades monótonas durante un largo período de tiempo, o estudiantes, privados de sueño. Este efecto es la base de la utilización de la anfetamina en el tratamiento de la narcolepsia.
- Disminución del apetito.
- Movimientos amanerados y comportamiento estereotipado: movimientos repetitivos, agitación, expresiones faciales raras, muecas, etc.
- Agresividad.
- Psicosis de la metanfetamina: En la bibliografía se ha descrito que los consumidores de este tipo de compuestos pueden sufrir psicosis. Episodios psicóticos recurrentes, denominados “flashbacks”, pueden desencadenarse por estrés, miedo, etc. [65, 66].

4.4. OTROS EFECTOS

Otro de los principales y graves efectos adversos de los derivados anfetamínicos es la hipertermia, cuyo origen puede ser triple: anomalías inducidas en el SNC por la droga, las convulsiones o la hiperactividad muscular. Un factor importante a tener en cuenta, es el ambiente dónde normalmente se consumen estas sustancias, lugares cerrados y mucha gente bailando, lo que puede favorecer la aparición de la hipertermia. El principal problema derivado de la hipertermia es la rabdomiolisis [30]. En la bibliografía se encuentran casos descritos de hasta 46.1°C [6].

El consumo de este tipo de drogas, debido a los efectos ya mencionados, produce una intensa sed, con la consiguiente ingesta de gran cantidad de líquidos, lo que aumenta la diuresis, pudiendo llegar a producirse hiponatremia y muerte [67].

4.5. EFECTOS TÓXICOS

4.5.1. TOXICIDAD AGUDA

Los efectos tóxicos más relevantes de los derivados de la anfetamina, aunque su intensidad dependerá de la dosis absorbida, son: hipertensión arterial, arritmias, asistolia, colapso cardiovascular, accidente cerebro-vascular, coagulación intravascular diseminada, hipertermia, rabdomiolisis, insuficiencia renal aguda, cuadros de espasticidad muscular y manifestaciones de hepatotoxicidad; dosis muy elevadas pueden precipitar a la muerte por fibrilación ventricular o hemorragias cerebrales [68-72] (fig. 17).

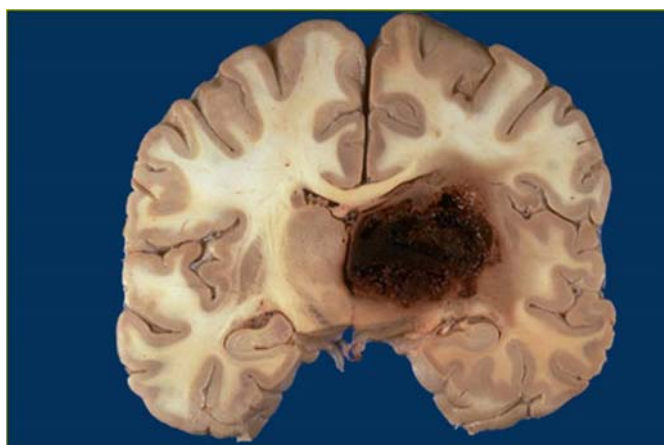


Figura 17. Hemorragia cerebral con afectación de los núcleos basales [73].

Estos cuadros tóxicos pueden ir acompañados de alteraciones analíticas tales como: leucocitosis, hiperglucemia, aumento de CPK, fosfatos y potasio (por rabdomiolisis), aumento del nitrógeno ureico en sangre y disminución del bicarbonato por deshidratación [4].

Además de la toxicidad intrínseca de este tipo de compuestos, hay que tener en cuenta una posible toxicidad adicional, la de las sustancias añadidas para adulterar la droga [4].

Se debe tener en cuenta la tendencia actual al policonsumo, es decir, el consumidor en una misma sesión consume distintos tipo de sustancias (anfetaminas, cocaína, THC), por lo que es difícil saber cual de las sustancias es responsable de los efectos adversos, o si estos son consecuencia de la interacción entre las mismas.

Los casos de muertes por sobredosis por estas sustancias son escasos. Son más frecuentes las muertes por accidentes de tráfico u otras modalidades de violencia, en las que los individuos estaban bajo los efectos de estas drogas (*related deaths*).

4.5.2. TOXICIDAD CRÓNICA

Las consecuencias a largo plazo producidas por el consumo de los derivados anfetamínicos todavía no se conocen exactamente, pero estudios realizados señalan la neurotoxicidad de estas sustancias [62, 65].

Entre los trastornos asociados a su consumo crónico destacan: la hipertrofia cardíaca (fig. 18), espasmos vasculares difusos, reacciones pirógenas, psicosis paranoide, desórdenes del humor y agresividad [4, 6].



Figura 18. Hipertrofia cardíaca, con afectación del ventrículo izquierdo [73].

4.6. EFECTO PRODUCIDO POR DOSIS MODERADAS DE MDMA

Según Shulguin “la MDMA provoca un estado alterado de la conciencia, fácilmente controlable, con trasfondo emotivo y sensual, y escaso efecto alucinatorio”.

A los 30 minutos aproximadamente tras la ingesta de dosis moderadas (75-150 mg), aparecen los efectos simpaticomiméticos. El individuo está

ligeramente ansioso, con taquicardia y su presión arterial aumenta. También puede presentar bruxismo y tensión mandibular. La sequedad de boca es característica, y pueden aparecer náuseas.

Unos 60 minutos más tarde, estos efectos simpaticomiméticos dan paso a los efectos más psicodélicos: euforia y locuacidad, alteración de la percepción, relajación y sensación de tranquilidad, mayor conciencia de las emociones. Estos efectos se mantienen durante algo más de 1 hora, empezando posteriormente a remitir.

La resaca del consumo de estas sustancias dura uno o varios días, durante los cuales la persona puede estar con ánimo depresivo, ansiosa, insomne, con falta de apetito y fatigada.

5. TOLERANCIA Y DEPENDENCIA

Las anfetaminas están incluidas, junto con otras sustancias como la cocaína, en el grupo de drogas con un alto potencial de abuso. El potencial de abuso se define como la capacidad de un compuesto de producir dependencia al mismo después de un uso repetitivo [6].

5.1. TOLERANCIA

Se ha apreciado que en el caso de los derivados anfetamínicos, la tolerancia se produce para los efectos positivos (empatía, euforia, sensación de bienestar, etc.), pero no para los negativos (efectos simpaticomiméticos), los cuales se ven incluso potenciados.

La tolerancia aparece como consecuencia del consumo repetitivo de estas sustancias, y es muy dependiente de la frecuencia y de la cantidad de las dosis ingeridas [6]. Tras semanas o meses de utilización, algunos consumidores llegan a ingerir 10 o más pastillas en el curso de una sola noche buscando los efectos positivos, lo que representa un indudable riesgo de graves complicaciones cardiovasculares [74].

5.2. DEPENDENCIA

La dependencia es el estado en el que la persona tiene una necesidad tanto física como psicológica, de consumir la droga. Debido al desarrollo de tolerancia a los efectos positivos, y no a los negativos, es difícil el uso intenso y prolongado de este tipo de sustancias con fines adictivos. Sólo un pequeño porcentaje de los consumidores (<5%), desarrolla claramente dependencia y síndrome de abstinencia. La abstinencia se asocia con letargia, depresión y fatiga [6].

6. ABUSO Y USO TERAPÉUTICO

6.1. ABUSO

Según datos del Observatorio Español sobre Droga (OED) [75], entre las drogas de comercio ilegal, las sustancias más extendida entre la población española, son los derivados cannábicos, la cocaína y el éxtasis con prevalencias de consumo en los últimos 12 meses que superan el 1% (11,3% cánnabis, 2,7% cocaína y 1,4% éxtasis). En la mayor parte de los países europeos, el primer lugar lo ocupa el cánnabis, y el segundo el éxtasis [76].

El consumo de anfetaminas y de éxtasis se produce en determinados grupos de población, habitualmente adolescentes y jóvenes, en circunstancias concretas (discotecas, situaciones de ocio, situaciones de estrés, etc.), y bajo determinadas condiciones psicológicas [77].

Dentro del término anfetaminas, se incluye la anfetamina propiamente dicha, y la metanfetamina, y dentro del término éxtasis, se incluye MDMA y los demás derivados de las feniletilaminas.

En las encuestas realizadas por el Observatorio Español sobre Drogas, no es posible separar de forma clara las anfetaminas del éxtasis, porque la población a veces consume anfetaminas creyendo que se trata de éxtasis. No es fácil por lo tanto, apreciar tendencias claras de consumo ni en la población en general, ni en los estudiantes de 14-18 años, aunque el consumo no parece estar aumentando. Más bien, se aprecia cierto descenso en los años más recientes. En cambio, en la mayoría de los países europeos las encuestas de población muestran un incremento del consumo de anfetaminas y de éxtasis.

Analizando más en profundidad esta situación, en 2003 un 4,6% de la población española de 15-64 años había consumido éxtasis alguna vez en la vida, un 1,4% en los últimos 12 meses y un 0,4% en los últimos 30 días. La figura 19 muestra la evolución de estas prevalencias entre 1995 y 2003, predominando un descenso de las mismas. En la población de estudiantes de 14-18 años, estas prevalencias son algo mayores, siendo un 5% la prevalencia de consumo alguna vez en la vida, un 2,6% en los últimos 12 meses y un 1,5% en los últimos 30 días.

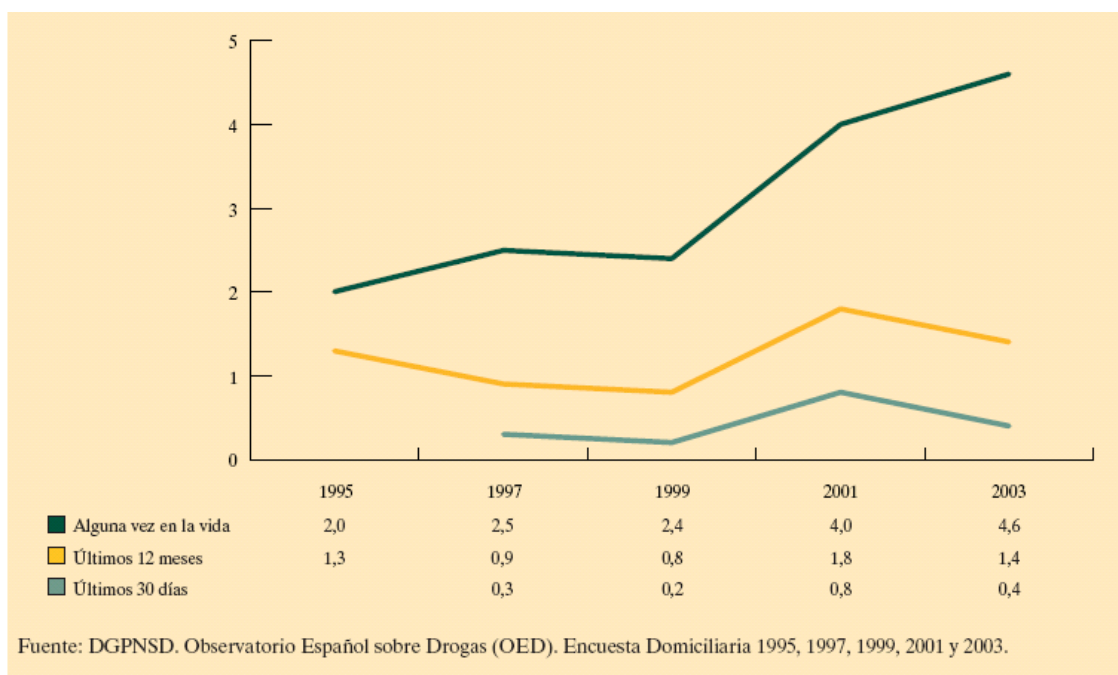


Figura 19. Prevalencias de consumo de éxtasis entre la población de 15-64 años en España de 1995-2003 [75].

En relación al consumo de anfetaminas en la población general de 15-64 años, la prevalencia de consumo alguna vez en la vida fue de 3,2%, de un 0,8% en los últimos 12 meses y de un 0,2% en los últimos 30 días. En cuanto a la evolución del consumo se aprecia una cierta tendencia a la estabilidad de la prevalencia de consumo en los últimos 12 meses.

En todos los supuestos la prevalencia mayor se da en los hombres con respecto a las mujeres. Su consumo tiene un carácter esporádico, no siendo reconocidos consumidores diarios. El consumo de estas sustancias suele ser el fin de semana, en lugares públicos y en compañía de otras personas; esto las diferencia de otras drogas, como la heroína o la cocaína que se consumen en lugares reservados, en solitario o en grupos reducidos. Como principales motivos de aproximación a este tipo de drogas, destacan la curiosidad y la diversión [64].

El perfil sociodemográfico de los consumidores de este tipo de sustancias según el Observatorio Español sobre Drogas, es el siguiente:

- La mayor parte de los consumidores son hombres (80%).
- La edad media es 21,43 años.

- El mayor contingente de consumidores tiene un nivel de estudios de ESO (41.9%), seguido por los sujetos con estudios universitarios.
- La mayor parte de los consumidores son trabajadores (45.3%).

Además de este consumo recreacional, los estimulantes anfetamínicos pueden presentar un consumo instrumental, es decir, el consumidor pretende de esta manera aumentar su rendimiento y reducir el cansancio para realizar una determinada actividad (estudiantes, conductores, deportistas).

A pesar de su reputación de sustancias “seguras”, las últimas encuestas muestran que su consumo, tanto esporádico como habitual, es considerado como una conducta de riesgo. En relación con la percepción de su disponibilidad, más del 39% de la población entre 15-64 años, piensa que es fácil, o relativamente fácil, conseguir cualquiera de las drogas ilegales.

En cuanto a los problemas asociados a su consumo, se observa un aumento del número de tratamientos por éxtasis (pasando de 226 en 1996 a 452 en 2002), y de las urgencias en que se menciona su consumo, pasando de 1,6% en 1996 a 6,3% en 2002. Por su parte, los tratamientos por anfetaminas y la proporción de urgencias en que se mencionan estas sustancias están relativamente estabilizados (fig. 20).

Según datos del Ministerio del Interior, en 2003 descendieron las cantidades decomisadas de anfetaminas y de éxtasis. En relación al precio de las “pastillas” de éxtasis, se ha reducido de 14,27 € a 10,28 €, entre 1997 y 2003.

Desde una perspectiva europea, el informe anual 2005 del Observatorio Europeo de Drogas y Toxicomanías (EMCDDA) [76], indica que el consumo de drogas en Europa sigue siendo un fenómeno extendido fundamentalmente entre los jóvenes, especialmente en varones. El mercado más importante es para las drogas estimulantes, y los indicadores señalan que, en el conjunto de Europa, el consumo de anfetaminas, éxtasis y cocaína, sigue tendiendo al alza, aunque el principal problema radica en las politoxicomanías.

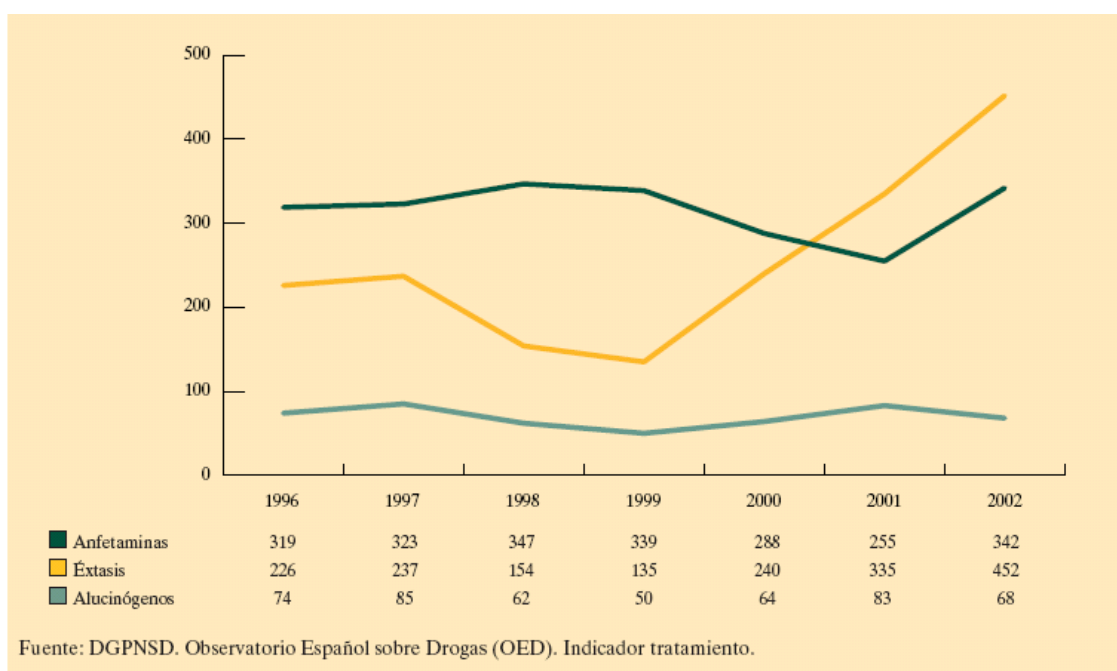


Figura 20. Evolución del número de tratados por abuso o dependencia de anfetaminas, éxtasis y alucinógenos (números absolutos) en España, 1996-2002 [75].

Por lo tanto, entre las principales drogas estimulantes nos encontramos con la anfetamina y el éxtasis. En cambio, la metanfetamina, droga problemática con índices de consumo elevados en Estados Unidos, Australia, algunas zonas de África y gran parte del sudeste asiático, hasta la fecha su consumo en Europa se ha visto restringido a la República Checa. Sin embargo, dado que muchos países europeos mantienen fuertes vínculos con algunas zonas del mundo que tienen problemas con la metanfetamina, y teniendo en cuenta la tendencia a la expansión del mercado europeo de estimulantes, no se puede pasar por alto el potencial de propagación del consumo de la misma, y, por consiguiente, sigue siendo un aspecto importante que se debe vigilar [76].

En las encuestas de población, el grupo de adultos jóvenes (de 15 a 34 años) presenta un consumo de anfetaminas a lo largo de la vida del 0.1% al 10%, aunque la tasa del Reino Unido resulta excepcionalmente elevada (18.4%). El consumo reciente (prevalencia de los últimos 12 meses) oscila entre el 0% y el 3%, situándose en lo alto de la escala Dinamarca, Estonia y el Reino Unido (fig. 21). En lo que respecta al éxtasis, las prevalencias de consumo alguna vez en la vida, son algo mayores, entre 0.6% y 13.6% de los adultos jóvenes (fig. 22). El consumo reciente es del 0.4% al 6%, y los países

que presentan las mayores tasas son la República Checa, Estonia, España y el Reino Unido.

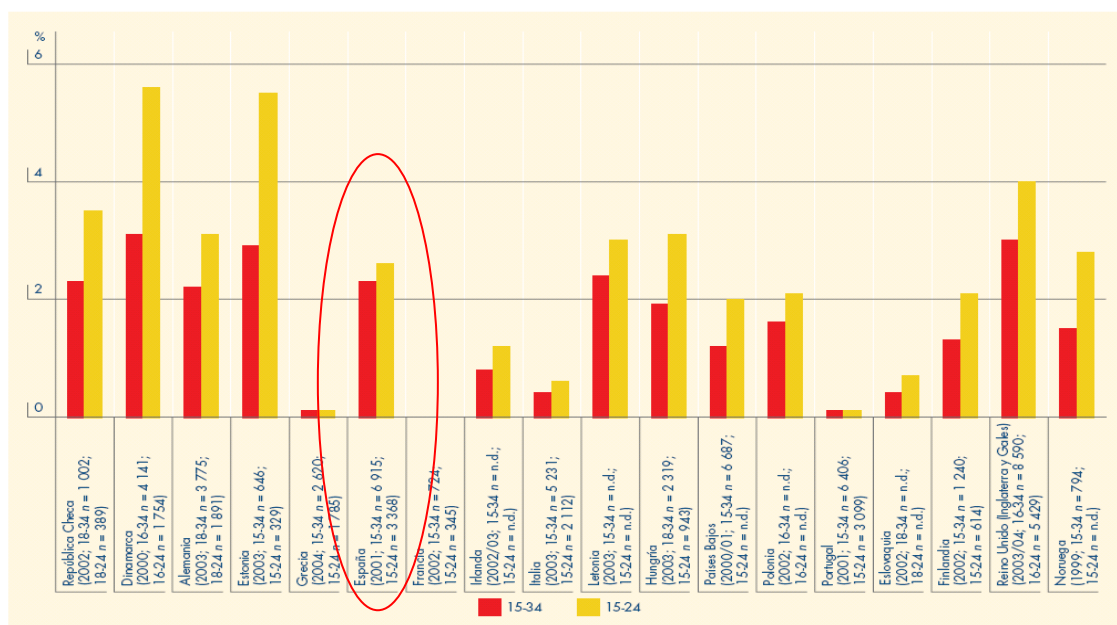


Figura 21. Consumo reciente (último año) de anfetamina entre adultos jóvenes de edades seleccionadas (15-34 años y 15-24años), medido a través de encuestas de población [75].

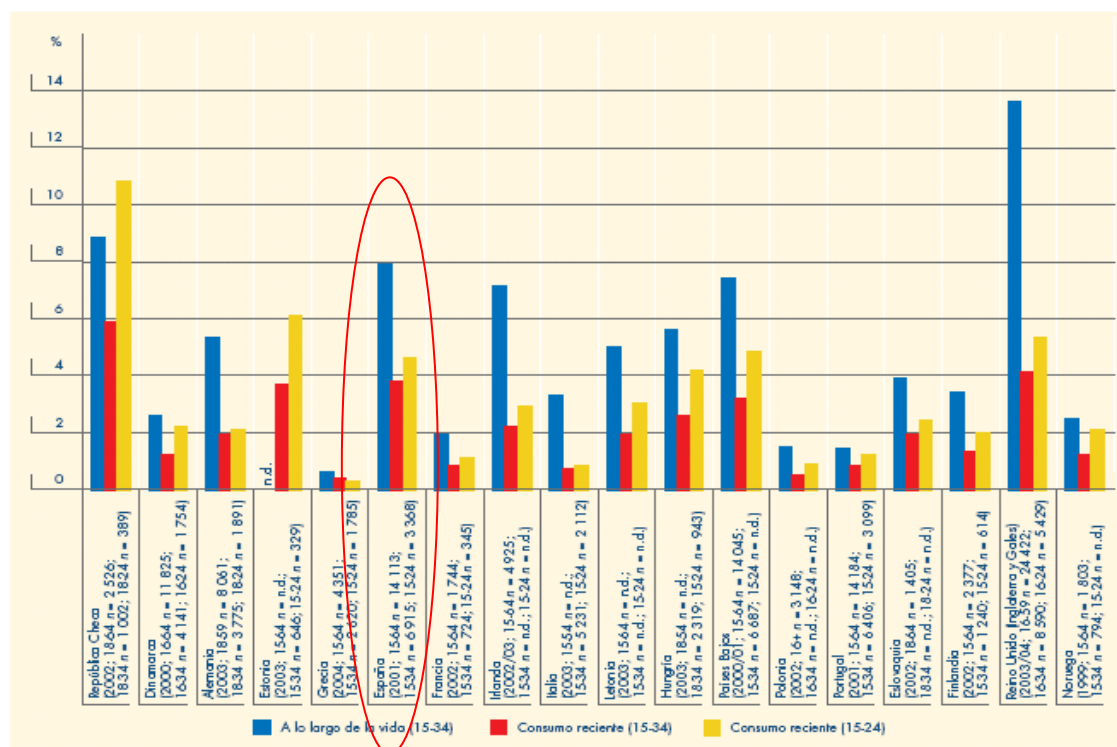


Figura 22. Prevalencia a lo largo de la vida y consumo reciente (último año) de éxtasis entre adultos jóvenes de edades seleccionadas (15-34 años y 15-24 años), medido a través de encuestas de población [75].

Según la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el delito (ONUDD) [78], resulta complicado cuantificar la producción de estimulantes anfetamínicos, ya que se inicia con sustancias químicas disponibles en el mercado y, en laboratorios fáciles de ocultar. No obstante, se calcula que la producción anual mundial de estimulantes anfetamínicos oscila en torno a las 520 toneladas [79]. Las incautaciones mundiales de estimulantes anfetamínicos alcanzaron su apogeo en el año 2000 con 46 toneladas y, tras un descenso posterior, volvieron a aumentar hasta las 34 toneladas en 2003 [80, 81].

Tomando como referencia el número de laboratorios desmantelados, la producción mundial de anfetaminas sigue concentrándose en Europa. La mayor parte de las anfetaminas incautadas en la Unión Europea en 2003 provenían de los Países Bajos, seguidos de Polonia y Bélgica. Por su parte, la metanfetamina, alcanzó las mayores cifras de producción e incautación en el este y sureste asiático (China, Myanmar, Filipinas, Tailandia), seguidos de Norteamérica (Estados Unidos) [81]. En lo que respecta al éxtasis, Europa sigue siendo el principal centro productor [81, 82]. El éxtasis incautado procede principalmente de los Países Bajos y de Bélgica [83].

La mayoría de las pastillas vendidas como drogas ilegales que fueron analizadas contenían únicamente éxtasis (MDMA) y sustancias análogas (MDA, MDEA) como ingredientes psicoactivos. Este fue el caso de Dinamarca, España, Hungría, los Países Bajos, Eslovaquia y Noruega, dónde más del 95% de las pastillas analizadas contenían estas sustancias. Sin embargo, dos países, Estonia y Lituania, informan que un elevado porcentaje de las pastillas analizadas (94% y 76%, respectivamente) contenían anfetamina o metanfetamina como únicas sustancias psicoactivas. El contenido de MDMA de las pastillas de éxtasis varía considerablemente según las partidas (incluso entre las que llevan el mismo logotipo), tanto dentro como fuera de un mismo país (fig. 23). En 2003, el contenido medio de MDMA de las pastillas de éxtasis era de 54 a 78 mg. Otras sustancias psicoactivas halladas en las pastillas vendidas como éxtasis fueron la MDA, la MDEA, la PMA, la PMMA, la DOB, la 5-MeO-DIPT, la 4-MTA y la 1-PEA [83].



Figura 23. Ejemplos de distintos tipos de pastillas de éxtasis.

6.2. USO TERAPÉUTICO

Actualmente ninguno de los estimulantes anfetamínicos es utilizado en terapéutica en nuestro país.

Hasta la inclusión de la MDMA en la Lista I, varios psicólogos y psiquiatras norteamericanos llevaban casi una década usando esta sustancia. Desde entonces ciertos profesionales de la psiquiatría y de la psicología pretenden pasar la MDMA de la Lista I a la Lista III, y así poder utilizarla en terapéutica.

Un manifiesto firmado por varios psicoterapeutas afirma que esta sustancia “tiene el increíble poder de lograr que las personas confíen unas en otras, desterrar los celos y romper las barreras que separan al amante del amante, a los progenitores de los hijos, al terapeuta del paciente”. Algunos de

los psiquiatras defensores de su uso terapéutico, sostienen que “ayuda a la gente a ponerse en relación con sentimientos generalmente no disponibles”, e incluso que no conocen ninguna sustancia más útil para “curar el miedo” a dejarnos comprender [15]. Antonio Escohotado afirma que la frigidez, la impotencia debida a razones psicológicas, la incomprensión entre miembros de una familia, el síndrome de aislamiento, la rigidez caracterológica, la desmotivación genérica y fenómenos análogos parecen experimentar mejoras espectaculares cuando son abordados con MDMA por un psiquiatra o psicólogo competente [15].

III. TOXICOLOGÍA FORENSE

El toxicólogo forense, para establecer el diagnóstico de intoxicación en el sujeto vivo y en el cadáver, ha de detectar, identificar y cuantificar la sustancia o sustancias implicadas en el caso, y en colaboración con los otros facultativos (clínicos, patólogos), realizar la interpretación de los resultados obtenidos [84].

En el supuesto del sujeto vivo, el resultado obtenido en la investigación toxicológica se utiliza para orientar en el tipo de tratamiento que debe recibir la persona intoxicada (toxicología clínica y de emergencia), determinar si la persona se encuentra bajo los efectos de una determinada droga (control de drogas en el tráfico rodado, control de drogas en el lugar de trabajo), detectar su consumo reciente o crónico, etc.

La toxicología postmortem trata de averiguar si una determinada sustancia ha podido causar o contribuir a la muerte de una persona. En la toxicología postmortem no siempre se dispone de todas las muestras deseables, ni en buenas condiciones (cadáver putrefacto), por lo que el procesado de las muestras y su interpretación es mucho más complejo que en el caso del sujeto vivo [85].

1. ETAPAS DEL DIAGNÓSTICO DE LA INTOXICACIÓN

1.1. EN EL SUJETO VIVO

De manera general, los pasos seguidos en el diagnóstico de una intoxicación en la persona viva comprende:

- a) Anamnesis e información del caso [85]:
 - ¿Alguna enfermedad reciente o crónica? ¿Medicación prescrita?
 - ¿La víctima es alcohólico, drogadicto?
 - ¿De qué sustancia se sospecha? ¿Qué cantidad fue ingerida?Indicar otras sustancias a las que pudo tener acceso.
- b) Exploración clínica.
- c) **Análisis toxicológico de las muestras biológicas.**
- d) Interpretación de los hallazgos: Comparación con bases de datos de concentraciones terapéuticas y tóxicas.

1.2. POSTMORTEM

Además de identificar y cuantificar la presencia de una determinada sustancia, el toxicólogo forense debe responder a preguntas como la vía y momento de administración, toma esporádica o crónica, indicar si las concentraciones halladas están dentro del rango terapéutico o son tóxicas, determinar el tiempo transcurrido desde la toma hasta el fallecimiento. Para responder a estas preguntas es necesario disponer de información anterior a la toma de muestras, junto con los hallazgos analíticos del material postmortem [86].

En el caso del diagnóstico de intoxicación postmortem, se procedería de la siguiente manera:

- a) Información del caso: suministrada por la policía, por su entorno social y el historial médico del fallecido. Si la persona recibió tratamiento médico de emergencia, especificar cual.
- b) Examen del lugar del hecho, y evidencias recogidas en el escenario.
- c) Autopsia: Causa de la muerte: Muerte violenta (¿Bajo la influencia?) o muerte por intoxicación (La mayor parte de las muertes debidas a drogas de abuso no presentan hallazgos

patológicos característicos. Habitualmente en el caso de intoxicaciones solo aparece congestión de órganos y edema pulmonar y cerebral).

- d) **Análisis toxicológico de las muestras biológicas.**
- e) **Interpretación de los hallazgos**

2. MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA EL ANÁLISIS TOXICOLÓGICO

2.1. MUESTRAS EN EL SUJETO VIVO

Las muestras biológicas remitidas para el análisis toxicológico son normalmente la orina y el plasma. Otras muestras pueden ser el pelo, el contenido gástrico, el sudor y la saliva, la cual está adquiriendo cada vez más importancia en determinadas aplicaciones como el control de drogas en el tráfico rodado. Cada una de estas matrices biológicas tiene unas características diferentes (concentraciones de la droga y metabolitos, ventanas de detección, cantidad de muestra disponible), lo que hace que tengan distinta utilidad.

2.1.1. ORINA

La mayor parte de las drogas se eliminan por vía renal, encontrándose en la orina una alta concentración de aquellas y de sus metabolitos. Es la matriz de elección para realizar el cribado cualitativo, sin necesidad de un tratamiento previo de la muestra. La principal limitación de la orina es que no es posible relacionar las concentraciones halladas con el grado de afectación del individuo. Las drogas y sus metabolitos son detectables en orina durante varios días, indicando simplemente su presencia, que ha habido un consumo reciente. Además, los métodos de recogida de la muestra pueden considerarse que invaden la intimidad del sujeto, cuando debe hacerse bajo supervisión para evitar adulteraciones, como ocurre en el control de drogas en el lugar de trabajo [87, 88].

2.1.2. PLASMA/SANGRE

Es la muestra que mejor correlaciona sus niveles con el efecto farmacológico, indicando si el individuo se encuentra bajo la influencia de una determinada sustancia. Es una muestra muy útil cuando se trata de demostrar una ingesta reciente. La muestra es recogida por personal especializado, normalmente de las venas del brazo [6].

2.1.3. PELO

Es una matriz interesante para demostrar consumo semanas o meses antes de la recogida de la muestra. Otras ventajas de esta matriz es que se pueden tomar varias muestras sin dificultad (normalmente un mechón de 100 cabellos tomados del *vertex posterior*), y que no se necesitan condiciones especiales de almacenamiento de las muestras (sobre o bolsa de plástico a temperatura ambiente). El principal problema del pelo es la posibilidad de que la droga presente se deba a una contaminación externa procedente del ambiente, por lo que en el tratamiento de este tipo de muestras es necesario realizar un lavado previo de las mismas. De todos modos, la presencia de metabolitos que no pueden deberse a una hidrólisis o a una contaminación externa, son prueba de su consumo [89]. Debido a que el pelo crece como media 1 cm/mes, un análisis segmentado permite también determinar el historial del consumo [6, 88].

2.1.4. CONTENIDO GÁSTRICO

Esta muestra puede proceder de vómitos y lavado de estómago. Si es obtenido rápidamente después de la intoxicación, es posible encontrar pastillas y cápsulas sin degradar, o identificar un olor característico de ciertos compuestos. Su resultado cuantitativo (cantidad de droga presente, no concentración en contenido gástrico), sólo sirve para determinar la cantidad de sustancia que todavía no ha sido absorbida [85].

2.1.5. SUDOR

Tiene un uso potencial en clínica para demostrar el consumo reciente de una droga. Es interesante recordar que puede ser una fuente de contaminación del pelo. Los dispositivos que se utilizan para su recogida son los parches.

2.1.6. SALIVA

Es la muestra alternativa de la sangre. Las principales ventajas que ofrece la saliva respecto a otros medios biológicos son: la toma de muestra es no invasiva, a diferencia de la sangre, la probabilidad de adulteración es baja, comparado con las muestras de orina, y además, a diferencia de esta última, indica un consumo reciente [90]. Como desventajas debemos citar la

posibilidad de contaminación debido a la ingesta oral de la droga, y que el método de recogida de la muestra puede afectar al pH de la saliva. Al aumentar el flujo de saliva, la concentración del ión bicarbonato aumenta, por lo que aumenta el pH [91], y como consecuencia, se puede modificar la concentración de la droga en la misma. La saliva presenta importantes aplicaciones como la monitorización de fármacos, el control de consumo de drogas en el tráfico rodado y el control de drogas en el lugar de trabajo [91-93].

Tabla 2. Resumen de las ventajas e inconvenientes de las principales muestras biológicas de la persona viva.

Muestra biológica	Ventajas	Inconvenientes	Ventana de detección
Plasma/Sangre	Buena correlación niveles-efecto farmacológico.	Toma de muestra invasiva, por personal especializado.	Horas 
Saliva	Detecta consumo reciente. Toma de muestra fácil y no invasiva. Toma de muestra bajo supervisión.	Contaminación oral. Poco volumen de muestra. Relación plasma/saliva variable.	Horas 
Orina	Drogas y metabolitos en alta concentración. Métodos de cribado comerciales.	No relación con el grado de afectación. Susceptible de adulterar. Invasión intimidad.	Días 
Pelo	Detecta consumo anterior. Historia del consumo (segmentos) Toma de muestra fácil y no invasiva. Toma de muestra bajo supervisión.	No detecta consumo reciente. Distinta incorporación drogas según color pelo. Contaminación externa	Meses 

2.2. MUESTRAS POSTMORTEM

Las muestras disponibles en una investigación toxicológica postmortem pueden ser muy numerosas y variadas, y deben ser seleccionadas en función de la historia del caso, peticiones, aspectos legales y disponibilidad de las

mismas según el estado del cadáver [94]. Generalmente, las muestras que se recogen en la autopsia son fluidos biológicos como sangre periférica y cardíaca, orina, bilis, humor vítreo y el contenido gástrico, y órganos, particularmente el hígado [95, 96]. Otras muestras de interés son el líquido pericárdico, el pelo, las uñas, y órganos como el riñón, los pulmones, el cerebro o el músculo esquelético, cuya recogida no es habitual en la mayoría de las autopsias judiciales.

Una etapa crítica es la manera de obtener estas muestras. Por muy bueno que sea el análisis, si la toma de muestras no ha sido realizada correctamente, su resultado puede ser inútil. Esta fase ocurre obviamente fuera del laboratorio, por lo que muy frecuentemente no se puede controlar, pero sí hacer algunas recomendaciones. La toma de muestras debe realizarse lo más pronto posible en la autopsia. Las muestras que deben recogerse antes de la disección son la sangre femoral, la orina, el humor vítreo, el pelo y las uñas. Las muestras deben recogerse en recipientes separados, y correctamente etiquetados (nº de identificación del caso, nombre del cadáver, fecha de la toma de muestras, tipo de muestra y lugar de procedencia). Un transporte seguro al laboratorio es esencial, debiéndose respetar obligatoriamente la cadena de custodia [94].

2.2.1. FLUIDOS BIOLÓGICOS

2.2.1.1. ORINA

Al igual que en el caso de las personas vivas, es la matriz más frecuentemente utilizada para realizar el cribado con inmunoensayos, ya que las drogas se encuentran en ella en elevada concentración. Su principal limitación es que no existe correlación entre la concentración hallada en la orina y los efectos farmacológicos. Si la muerte ocurre muy rápidamente después de la administración de la sustancia, puede ocurrir que no aparezca en orina [94]. En el caso de las anfetaminas y derivados, son muy frecuentes los falsos positivos en los inmunoensayos, debido a la presencia de aminos originadas en el proceso putrefactivo.

2.2.1.2. SANGRE

Es la muestra de elección para cuantificar e interpretar la concentración de las drogas y de sus metabolitos. La cuantificación se realiza en sangre periférica, normalmente de la vena femoral. Existen dos tipos de muestras de sangre: la de sangre cardíaca y la de sangre de las venas periféricas, especialmente las de las extremidades inferiores. La cantidad de sangre suele ser mayor en esta última localización y habitualmente carente de coágulos postmortem. Aunque, por lo general, la muestra procede de las venas femorales, en no pocas ocasiones es necesario proceder a la elevación de las piernas del cadáver, y exprimirlas hacia arriba para recuperar un volumen de sangre suficiente, lo que determina que ésta proceda también o mayoritariamente de venas más distales. Por otra parte, los niveles de las drogas son normalmente mayores en sangre cardíaca que en femoral. Entre los factores que afectan a la relación de concentraciones en sangre cardíaca/periférica destacan: el tipo de droga, su volumen de distribución, el rango de concentraciones, su unión a proteínas, el valor del pK_a y el intervalo de tiempo entre la muerte y la autopsia [97]. Las drogas básicas, como las anfetaminas, presentan altos niveles en la sangre cardíaca y una relación concentración en sangre cardíaca/concentración en sangre periférica muy variable [94].

2.2.1.3. HUMOR VÍTREO

Es un líquido algo viscoso, transparente, de bajo contenido en enzimas y proteínas, que se obtiene por punción de la cámara vítrea del ojo. Las principales ventajas de esta muestra son: es poco susceptible a la contaminación e invasión bacteriana, manteniéndose alejado de los efectos de la putrefacción que presentan otras muestras, además se trata de una muestra relativamente sencilla de analizar. Como inconvenientes presenta, el pequeño volumen disponible (1-2mL de cada ojo), y la baja concentración en él de aquellas drogas con elevada unión a proteínas y las drogas lipofílicas [6, 94, 98]. Un parámetro importante a determinar es la relación de concentraciones sangre/humor vítreo. En un estudio realizado por De Letter et al. [99] en conejos, se demostró que el equilibrio sangre-humor vítreo se alcanzaba 1 h después del consumo de la droga, y que es una muestra estable postmortem.

2.2.1.4. BILIS

La bilis es un fluido en el que se pueden detectar la mayor parte de las drogas. La concentración de una droga en la bilis suele ser mayor que la concentración en la sangre, y este hecho se produce sobre todo cuánto mayor sea el peso molecular de la sustancia. Es una matriz muy compleja desde el punto de vista analítico, por lo que es necesaria la readaptación de los métodos empleados con otros fluidos [94, 100].

2.2.1.5. LÍQUIDO PERICÁRDICO

El líquido pericárdico es un ultrafiltrado del plasma, situado en el saco pericárdico, de apariencia transparente. El volumen disponible es aproximadamente 20 mL [101]. El principal problema que presenta es la posible difusión de las drogas desde el músculo cardíaco, presentando así niveles superiores a los hallados en la sangre periférica. De todos modos, puede ser una matriz útil para el cribado cualitativo.

2.2.1.6. CONTENIDO GÁSTRICO E INTESTINAL

Aunque en sentido estricto no es un fluido biológico, por su carácter líquido o pastoso lo incluimos en este apartado. Esta muestra se utiliza para determinar el momento de la ingesta, si la vía de entrada fue la oral, y la cantidad total de droga que todavía no había sido absorbida. En el caso del contenido gástrico es necesario conocer su volumen, ya que es mucho más interesante conocer la cantidad total de droga que su concentración. Debe tenerse en cuenta que la presencia de una pequeña cantidad en el estómago puede derivar de la bilis, especialmente si han tenido lugar vómitos, y no de la ingesta por vía oral. Además, un resultado negativo no excluye un consumo por vía oral anterior [100].

2.2.2. ÓRGANOS Y TEJIDOS

2.2.2.1. HÍGADO

Es una muestra interesante cuando no se dispone de sangre por exsanguinación, carbonización o descomposición. La mayor parte de las drogas se encuentran en él en alta concentración, ya que es el órgano dónde

se realiza principalmente el metabolismo de las sustancias. La concentración de las drogas puede depender del lugar de toma de muestra, por lo que debe ser indicado. Para evitar una posible contaminación por difusión desde el tracto gastrointestinal, se recomienda tomar la muestra del interior del lóbulo derecho [94, 100, 102].

2.2.2.2. RIÑÓN

Es una muestra importante en el caso de las drogas que se eliminan preferentemente por vía renal. Debe recogerse una muestra de cada riñón. La importancia del valor de la concentración renal de la sustancia es limitada [94].

2.2.2.3. PULMÓN

En este órgano se suelen detectar altas concentraciones de las drogas, especialmente las administradas por vía intravenosa. Es una muestra importante en el caso de que se sospeche inhalación de disolventes. Se recomienda recoger las muestras de los lóbulos superiores y no de los inferiores, para evitar la posible contaminación por difusión desde el tracto gastrointestinal [94, 102].

2.2.2.4. CEREBRO

Es una muestra importante ya que el cerebro es el órgano en el que se manifiesta la acción más relevante de la mayor parte de las drogas. Debe especificarse la región anatómica que se utilizó en el análisis, puesto que las concentraciones pueden variar considerablemente de una región a otra [94].

2.2.2.5. MÚSCULO ESQUELÉTICO

El músculo esquelético parece una matriz interesante ya que está disponible en grandes cantidades, es afectado por la descomposición más tarde que las vísceras y las muestras pueden obtenerse de sitios periféricos, muy alejados de los principales reservorios (estómago, hígado y pulmones). El principal problema es la gran variabilidad entre los niveles de la droga hallados en los distintos músculos. Esto hace que sea una muestra aceptada para uso cualitativo y no cuantitativo. Se recomienda la recogida de la muestra de músculo de las extremidades [103].

2.2.2.6. PELO

El análisis postmortem del pelo permite determinar el consumo de una droga semanas o meses antes de la muerte. El análisis de los segmentos del mismo, conociendo que el pelo crece una media de 1 cm/mes, nos sirve para establecer la historia del consumo. De esta manera se puede diferenciar entre consumidores crónicos y esporádicos, lo cual puede ser importante en la interpretación de los hallazgos obtenidos. Las ventajas e inconvenientes de esta matriz, y de la toma de muestras, son semejantes a los que se plantean en la persona viva [104].

2.2.2.7. UÑAS

Las uñas de manos y pies acumulan drogas en el caso de un consumo crónico, aportando una ventana de detección retrospectiva, al igual que el pelo. Distintas drogas han sido detectadas en ellas [105, 106].

3. ANÁLISIS TOXICOLÓGICO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

3.1. EL ANÁLISIS TOXICOLÓGICO

La metodología aplicada al proceso de análisis de una muestra biológica, susceptible de contener algún tipo de droga, en el laboratorio de toxicología, se realiza en dos etapas. En una primera fase se utilizan las técnicas de cribado o screening de drogas y fármacos, y en una segunda se emplean las técnicas de confirmación y cuantificación de las mismas.

Entre las técnicas de cribado o screening las más importantes son los inmunoensayos. Existen tres procedimientos inmunológicos de uso general: radioinmunoensayo, enzimoimmunoensayo e inmunofluorescencia. Todos ellos se basan en el mismo principio general, esto es, el fármaco es administrado a un animal, de tal modo que éste quede inmunizado y produzca anticuerpos contra el mismo, y los inmunoensayos se basan en la detección de la reacción entre el anticuerpo y el fármaco. Desgraciadamente, incluso usando anticuerpos monoclonales, tienen lugar ciertas reacciones cruzadas [84]. Estas técnicas nos proporcionan información sobre la naturaleza de los compuestos presentes, y entre sus ventajas están que no requieren una preparación previa de la muestra a analizar, necesitan poca cantidad de la misma (200 µL), y son pruebas rápidas. Como desventajas podemos decir que generalmente sólo se aplican a muestras de orina, simplemente nos indican el grupo farmacológico al que pertenece el compuesto, y la información que dan es cualitativa y no cuantitativa. Además, en el caso de un resultado positivo, se requiere una confirmación y cuantificación mediante otras técnicas analíticas que sean altamente específicas. La mayoría están diseñados para la detección de drogas en orina, pero también han sido aplicados con éxito en otras matrices biológicas como la sangre, los extractos de pelo, la saliva y el sudor [107]. Los inmunoensayos son utilizados como técnicas de cribado cuando se sospecha de un tipo de sustancias determinado (cocaína, anfetaminas, benzodiazepinas, etc.). En el caso de realizar un cribado de sustancias desconocidas en un principio, se utilizarían técnicas como cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía líquida de alta resolución con detector array de diodos (HPLC-DAD).

Como técnicas de confirmación y cuantificación se utilizan las técnicas cromatográficas. La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases: una de ellas es una fase sólida estacionaria y la otra es un gas o líquido móvil, que circula a través de la fase estacionaria. Durante el desarrollo de un cromatograma, la fase móvil arrastra a las moléculas de la muestra a través de la fase estacionaria, empaquetada en la columna cromatográfica. A lo largo del trayecto, las distintas moléculas de la muestra son retardadas, debido a la diferente interacción de los analitos con la fase estacionaria y la fase móvil. Estas interacciones son selectivas, lo que significa que para un determinado sistema fase móvil-fase estacionaria, la interacción será diferente para cada componente de la muestra. Los analitos se irán separando a medida que atraviesan la columna, ya que cada uno presenta un tiempo de retención característico. El tiempo de retención se define como el tiempo que necesitan las moléculas de la muestra para eluir de la columna [108], y será el modo de identificar a los distintos compuestos.

Las técnicas cromatográficas se clasifican en dos tipos según el estado de la fase móvil:

- Cromatografía de gases (GC): la fase móvil es un gas inerte.
- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): la fase móvil es líquida. La HPLC se clasifica a su vez en cromatografía en fase reversa y en fase normal.

Para detectar a las sustancias separadas se utilizan detectores. Dentro de la cromatografía de gases los más utilizados son el detector de ionización de llama (FID), nitrógeno-fósforo (NPD), electrón-captura (ECD), transformada de Fourier (FTIR), emisión atómica (AED) y espectrometría de masas (MS) [109]. En la cromatografía líquida tenemos el detector UV (Ultravioleta), DAD (diode array detector), de fluorescencia, de índice de refracción y electroquímico [110]. Otra opción, de creciente importancia, es el acoplamiento de la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas (LC-MS).

GC-MS y LC-MS son los únicos métodos de análisis específicos al 100%, gracias al espectrómetro de masas que identifica a los compuestos inequívocamente. Con los demás detectores, la identificación de los compuestos se basa en su tiempo de retención. En GC-MS (fig. 24) y LC-MS

(fig. 25), además del tiempo de retención, gracias al espectrómetro de masas podemos conseguir “la huella dactilar del compuesto”, lo que nos permite identificarlo con gran especificad.



Figura 24. Equipo de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.



Figura 25. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (izquierda) acoplada a espectrometría de masas (derecha).

Pero antes de aplicar estas técnicas cromatográficas, se requiere un proceso de preparación y extracción de la muestra biológica que va a ser analizada, esto es, una purificación de la misma para eliminar posibles interferencias y para concentrar los analitos.

Muestras como la orina y fluidos no viscosos, no precisan una preparación antes de la extracción, pero sí otras más complejas como el pelo, los tejidos o sangre coagulada. La preparación puede consistir en una simple dilución en agua o tampón, como en el caso de la sangre coagulada, o ser un

proceso más laborioso, como en el caso de los tejidos, que han de ser homogeneizados mecánicamente o bien someterlos a una digestión enzimática [85].

Existen tres tipos de procesos de extracción: extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida y microextracción en fase sólida.

En la extracción líquido-líquido la distribución de los analitos se produce entre una fase acuosa a pH ácido o pH básico, en donde estarán las sustancias más hidrosolubles a ese pH, y una fase orgánica, en donde estarán las sustancias más liposolubles. El objetivo es hacer pasar a la fase orgánica los analitos de interés, por lo que en el caso de sustancias básicas trabajaremos con fases acuosas a pH básico, y en el caso de sustancias ácidas con fases acuosas a pH ácido. Como fases acuosas se pueden utilizar tampones a distintos pH (tampón carbonato, fosfato, borato, etc.), o bien directamente soluciones básicas (distintas molaridades de NaOH), o ácidas (ácido acético). Como fase orgánica se utiliza dietiléter, acetato de etilo, hexano, etc. La elección del disolvente orgánico dependerá de propiedades tales como el índice de polaridad.

La extracción en fase sólida consiste en hacer pasar la muestra a través de un soporte sólido donde quedará retenida la droga. Dicho soporte tiene un relleno que retiene en una primera fase la sustancia a determinar, y en una segunda se eluye con disolventes orgánicos. Tras cargar la muestra en las columnas de extracción, se procede normalmente a realizar una serie de lavados. Los lavados consisten en hacer pasar a través de la columna de extracción distintos disolventes o mezclas de los mismos, de tal modo que eluyan posibles interferencias y otros componentes de las matrices biológicas, pero permitiendo que los analitos de interés permanezcan retenidos hasta su elución. Los rellenos son generalmente de tipo fase reversa C_8 o C_{18} , aunque también existen rellenos selectivos para la extracción de drogas básicas, denominados de intercambio catiónico, y para la extracción de drogas ácidas, denominados de intercambio aniónico. Los rellenos apolares (C_8 y C_{18}) retienen a los analitos cuando se encuentran en su forma no ionizada, debido a interacciones de tipo apolar-apolar. Los rellenos de intercambio catiónico retienen cationes, y los de intercambio aniónico, aniones.

La extracción en fase sólida puede realizarse en sistemas manuales (fig. 26) o automáticos. Existen además sistemas de extracción en fase sólida automáticos en línea con el sistema cromatográfico, que normalmente se trata de un sistema de cromatografía líquida. De esta manera el proceso está completamente automatizado, y no es necesario realizar pasos intermedios como la evaporación a seco de los extractos.



Figura 26. Sistema manual de extracción en fase sólida.

La microextracción en fase sólida, técnica de extracción relativamente reciente propuesta por Pawliszyn y colaboradores a principios de los noventa [111, 112], es un proceso de extracción en el que no se usan disolventes. En este caso los analitos se adsorberán superficialmente a la fibra que se deja en contacto con la muestra un determinado tiempo. Según el tipo de fibra se adsorberán distintos tipos de droga, y según su espesor, distinta cantidad.

Una vez finalizado el proceso de extracción, se evapora a seco la fase orgánica resultante, se reconstituye en un determinado volumen y con un determinado disolvente, y se inyecta una alícuota del extracto en el sistema cromatográfico seleccionado. En el caso de la microextracción, no se realiza esta última fase de evaporación y reconstitución del extracto, ya que la fibra se introduce directamente en el inyector del equipo.

3.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA DETECCIÓN DE ANFETAMINAS

Los distintos tipos de inmunoensayos son las técnicas más utilizadas en el cribado de muestras para la detección de anfetaminas. Algunos de los más empleados son CEDIA (*Cloned enzyme donor immunoassay*), FPIA (*Fluorescent polarization immunoassay*) y métodos de micro-partículas como KIMS (*Kinetic interaction of micro-particles in solution*). En la bibliografía encontramos evaluaciones de distintos kits [113-120], estudios con muestras dopadas [121-123], estudios en voluntarios consumidores de la droga [124], y estudios comparativos de distintos inmunoensayos [125-132].

Como técnicas de confirmación, tanto la cromatografía de gases como la cromatografía líquida, son comúnmente utilizadas. Dentro de la cromatografía de gases la técnica más empleada con diferencia, en la determinación de las anfetaminas y derivados en los distintos fluidos biológicos, es la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Esta técnica ha sido muy utilizada para la determinación de las anfetaminas en la sangre/plasma [31, 133-150], en la orina [55, 56, 133-135, 137, 140, 146, 151-188], en el pelo [134, 137, 189-205], la saliva [56, 135, 206-208] y en otras matrices como órganos y tejidos [146], contenido gástrico [139], sudor [5], uñas [209, 210] y meconio [211].

Además de GC-MS, la cromatografía de gases también ha sido utilizada con otros detectores como el detector nitrógeno-fósforo [140, 170, 212-218], el detector de ionización de llama [219-223] y el detector electrón-captura [159, 224-226].

La cromatografía líquida de alta resolución también ha sido empleada para la detección de las anfetaminas, utilizando principalmente como detectores el detector ultravioleta (HPLC-UV) o el diodo array (HPLC-DAD) [52, 161, 212, 227-241], y el detector de fluorescencia (HPLC-FD) [29, 35, 233, 241, 242-262]. También han sido detectadas mediante el detector electroquímico [263, 264].

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) ha sido utilizada para la determinación de las anfetaminas y derivados en distintas matrices biológicas. La LC-MS está alcanzando la importancia de la GC-MS, siendo cada vez más utilizada como técnica de confirmación. Las

anfetaminas son sustancias volátiles pero polares que para ser analizadas mediante GC-MS precisan ser derivatizadas, paso que no es necesario en LC-MS. Las tablas 3 y 4 recogen una detallada revisión de los métodos utilizados para la determinación de estos compuestos mediante LC-MS en las principales matrices biológicas (plasma, orina, pelo, fluido oral, tejidos postmortem, sudor), así como los métodos que determinan simultáneamente a las anfetaminas y a otras drogas de abuso.

Los métodos de extracción empleados han sido tanto la extracción en fase sólida [212, 265, 269, 271, 277], como la extracción líquido-líquido [232, 268, 275]. Otras técnicas empleadas han sido la microextracción en fase sólida [270], una simple precipitación con metanol [274, 276], o incluso, una inyección directa de la muestra sin ningún proceso de extracción previo [267, 273]. En el caso de los métodos que determinan simultáneamente a las anfetaminas y otras drogas de abuso, el método de extracción usado mayoritariamente ha sido la extracción en fase sólida [278, 280, 281, 282].

La separación cromatográfica más utilizada ha sido la cromatografía en fase reversa, usando como fase móvil mezclas de acetonitrilo o metanol con distintos tampones, compatibles con LC-MS. Las principales sondas utilizadas, APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) y ESI (*Electrospray*), fueron empleadas siempre en modo positivo. El modo de trabajo de los espectrómetros de masas ha sido SIM (*Selected Ion Monitoring*) o MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), según se tratase de LC-MS, o bien de LC-MS/MS.

En la bibliografía también encontramos métodos de separación de los enantiómeros de la anfetamina, metanfetamina y de los metilendioxi-derivados en matrices biológicas. Estos métodos han sido realizados tanto por cromatografía de gases [41, 283-296], como por cromatografía líquida [251, 252, 297-313].

Tabla 3. Revisión bibliográfica de los métodos para la determinación de anfetaminas mediante LC-MS en las principales matrices biológicas.

Referencia bibliográfica	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción	Fase estacionaria (Columna)	Fase móvil	Modo de detección	Analizador	Validación
Bogusz [265]	A, MA, MDA, MDEA, MDMA, MBDB, BDMPEA y otras 9 feniletilaminas	Plasma	Extracción en fase sólida	Superspher 100RP 18 (125x3mm; 4µm)	Formiato amónico pH 3 / ACN (75:25) Isocrático F=0.3mL/min	APCI+ SIM	Cuadrapolo simple	-Linealidad: 5-500ng/mL -Precisión y exactitud intra e interdía < 15% -LOD: 1-5ng/mL -Rendimiento: 60-90% -Estabilidad: 8 semanas, -20°C -Aplicación casos reales
Bogusz [232]	A, MA, MDA, MDEA, MDMA y 8 aminas ppsimpáticomiméticas	Plasma Orina	Extracción líquido-líquido	Superspher Select Ba ECOcart (125x3mm)	Formiato amónico 50mM pH 3 / ACN (55:45) Isocrático F=0.9mL/min	APCI+ SIM	Cuadrapolo simple	-Linealidad :5-1000ng/mL -Precisión interdía < 15% -LOD: 1-5ng/mL -Estabilidad: 10 días, 20°C -Aplicación casos reales
Cairns [266]	A, MA, MDA, MDMA	Pelo	-Lavado -Digestión enzimática -Extracción líquido-líquido	Keystone Scientific BETASIL C8	Agua / ACN+ Ác. Fórmico 0.1% (80:20) Isocrático	ESI+ MRM	Triple cuadrapolo	-LOD:10-100pg/mg -Aplicación casos reales

(Continuación tabla 3)

Referencia bibliográfica	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción	Fase estacionaria (Columna)	Fase móvil	Modo de detección	Analizador	Validación
Cristoni [267]	A, MA, MDA, MDEA, MDMA	Orina	Inyección directa	Reverse-phase C18 (150x1mm ; 5µm)	Agua + Ác. Fórmico 0.05% / ACN + Ác. Fórmico 0.05% Gradiente F=0.1mL/min	APCI+ ESI+ SACI+ MRM	Trampa de iones	-Linealidad: APCI:200-1000ng/mL; ESI:50-1000ng/mL; SACI:2-100ng/mL -LOD: 2-5ng/mL (SACI) -Efecto matriz:45%(SACI) -Aplicación casos reales
Deventer [268]	A, MA, MDA, MDEA, MDMA y 22 derivados	Orina	Extracción líquido-líquido	Omnispher C18 (50x3mm;3µm) T ^a =35°C	Agua + Ác. Fórmico 0.1 % / MeOH Gradiente F=0.4mL/min	APCI+ MRM	Trampa de iones	-Linealidad:1-500ng/mL -LOD: 1-250ng/mL -Rendimiento: 36-104% -Especificidad
Hendrickson [269]	A, MA	Plasma de rata	Extracción en fase sólida	Hypersil BDS C18 (100x2.1mm; 3µm) T ^a =55°C	Acetato amónico 10mM pH 3.7 / ACN / MeOH (72.5:25:2.5) Isocrático F=0.2mL/min	ESI+ MRM	Triple cuadrupolo	-Linealidad: 0.3-10ng/mL; 10-1000ng/mL -Precisión y exactitud intra e inter día < 15% -Rendimiento:67-110% -Efecto matriz: 39-63% -LOQ: 0.3ng/mL -Aplicación casos reales

(Continuación tabla 3)

Referencia bibliográfica	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción	Fase estacionaria (Columna)	Fase móvil	Modo de detección	Analizador	Validación
Jenkins [212]	HMMA, MDA, MDMA	Orina	Extracción en fase sólida (Intercambio catiónico)	XTerra MS C18 (150x2.1mm; 3.5µm) T ^a =30°C	Bicarbonato amónico 20mM pH 9 / MeOH (70:30) Isocrático F=0.2mL/min	ESI+ SIM	Cuadrapolo simple	-Linealidad: 2000ng/mL -Precisión y exactitud intradía < 15% -Rendimiento: 83.9-108% -LOD: 15-40ng/mL -LOQ: 40-100ng/mL -Aplicación casos reales
Kataoka [270]	A, MA, MDA, MDEA, MDMA	Orina	Microextracción en fase sólida	Supelcosil LC-CN (330x4.6mm ; 3µm)	Acetato amónico 50mM / ACN (85:15) F=0.4mL/min	ESI+ SIM	Cuadrapolo simple	-Linealidad: 2-100ng/mL -Aplicación a casos reales
Miki [271]	A, MA, para-hidroxí-MA	Pelo	-Lavado (dodecil sulfato sódico, agua y MeOH) -Digestión (MeOH/HCl) -Extracción en fase sólida on-line (Intercambio catiónico)	CAPCELL PAK SCX UG 80 (150x1.5mm;5 µm)	Acetato amónico 12.5mM pH 4 / ACN (40:60) F= 0.15 mL/min	ESI+ SIM	Cuadrapolo simple	-Linealidad: 0.02-30ng/mg -Rendimiento: 93.8-99.8% -Especificidad -Aplicación a casos reales

(Continuación tabla 3)

Referencia bibliográfica	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción	Fase estacionaria (Columna)	Fase móvil	Modo de detección	Analizador	Validación
Mortier [272]	A, MDA, MDMA, PMA	Sangre	-Homogenización	Hypersil BDS	Agua + Ác.	ESI+	Trampa de	-Linealidad: 10-1000ng/mL;
		Orina	tejidos UltraTurax	phenyl	Fórmico 0.001%	MRM	iones	20-2000ng/g
		Tejidos (hígado y riñón)	-Extracción líquido-líquido	(100x2.1mm; 3µm)	/ ACN			-Precisión y exactitud intra e inter día < 15%
Nordgren [273]	MDA, MDMA	Orina	Inyección directa	Symmetry C18 (100x3mm; 3µm)	Ác. Fórmico	APCI+	Triple	-Linealidad : 100-5000ng/mL
					10mM pH 3.7 / MeOH	MRM	cuadrapolo	-Precisión intradía < 15%
					Tª=30°C (72.5:27.5) Isocrático			-LOD: 20-50ng/mL
Samyn [274]	A, efedrina, MA, MDA, MDMA, MDEA	Fluido oral Sudor	MeOH	Hypersil BDS C18 (2.1x100mm; 3.5µm)	Acetato amónico	ESI+	Triple	-Linealidad
					10mM /ACN + Acetato amónico	MRM	cuadrapolo	-Precisión intra e inter día < 15%
					5% (85:15) Isocrático			-LOQ: 1-5ng/mL (saliva); 5ng/parche (sudor)
								-Aplicación casos reales

(Continuación tabla 3)

Referencia bibliográfica	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción	Fase estacionaria (Columna)	Fase móvil	Modo de detección	Analizador	Validación
Stanaszek [275]	A, efedrina, MA, metcatinona, MDA, MDEA, MDMA, PMA	Pelo	-Lavado (DCM, agua y MeOH) -Hidrólisis (NaOH 1M) -Extracción líquido-líquido	LiChro CART Purospher 60 RP 18e (125x4mm; 5µm) T ^a =35°C	Agua + Ác. Fórmico 0.1% / ACN + Ác. Fórmico 0.1% Gradiente F=1mL/min	APCI+ SIM	Cuadrapolo simple	-Linealidad: 0.2-20ng/mg -Precisión y exactitud intra e inter día < 15% -Rendimiento: 60-100% -LOD: 0.05-0.2ng/mg -LOQ: 0.1-0.3ng/mg -Aplicación casos reales
Wood [276]	A, efedrina, MA, MDA, MDEA, MDMA	Plasma Fluido oral	MeOH	Hypersil BDS C18 (100x2.1mm; 3.5µm)	Acetato amónico 10mM / ACN (75:25) Isocrático F=0.3mL/min	ESI+ MRM	Triple cuadrapolo	-Linealidad (2-500ng/mL) -Precisión intra e inter día < 15% -LOD: 0.2-2ng/mL -LOQ: 0.5-2ng/mL -Aplicación casos reales
Wu [277]	A, MA, MDA, MDEA, MDMA	Orina	Extracción en fase sólida on-line	Symmetry Shield RP18 (50x2.1mm; 3.5µm)	Agua+Hidróxido amónico 0.2% / MeOH+Hidróxido amónico 0.2% / ACN+TFA0.05% / Agua+TFA0.05% Gradiente F=1mL/min	ESI+ MRM	Trampa de iones	-Linealidad: 5-100ng/mL; 100-500ng/mL -Precisión y exactitud intra e inter día < 15% -Rendimiento: 85-101% -LOD: 1.3-2.8ng/mL -LOQ: 4-4-9.1ng/mL -Aplicación casos reales

Tabla 4. Revisión bibliográfica de los métodos para la determinación simultánea de anfetaminas y otras drogas mediante LC-MS en las principales matrices biológicas.

Referencia bibliográfica	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción	Fase estacionaria (Columna)	Fase móvil	Modo de detección	Analizador	Validación
Concheiro [278]	A, MA, MBDB, MDA, MDEA, MDMA, MAM, Morfina, benzoilecgonina, cocaína	Plasma	Extracción en fase sólida	Atlantis dC18 (100x2.1mm; 3µm) Tª=26°C	Formiato amónico 2mM pH 3 / ACN Gradiente F=0.2mL/min	ESI+ SIM	Cuadrapolo simple	-Linealidad: 2-250ng/mL -Precisión y exactitud intra e inter día < 15% -Rendimiento: 69.7-100% -Efecto matriz: No detectado -Intensidad relativa de iones -LOD: 0.5-1ng/mL -LOQ: 2ng/mL -Aplicación casos reales
Kronstrand [279]	A, MA, MDA, MDMA, nicotina, cotinina, morfina, codeína, MAM, etilmorfina, 7-aminoflunitrazepam, diazepam	Pelo	Hidrólisis (FM)	Zorbax phenyl (50x2.1mm; 3µm) Tª=30°C	Formiato amónico 20 mM pH 3 / ACN / MeOH Gradiente F=0.25mL/min	ESI+ MRM	Triple cuadrapolo	-Linealidad: 0.5-7.5ng/mg -Precisión y exactitud inter día < 15% -Rendimiento: 77-100% -LOD: 3-70pg/mg -LOQ: 13-232pg/mg -Aplicación casos reales

(Continuación tabla 4)

Referencia bibliográfica	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción	Fase estacionaria (Columna)	Fase móvil	Modo de detección	Analizador	Validación
Mortier [280]	A, MA, MDA, MDEA, MDMA, morfina, codeína, benzoilecgonina, cocaína	Fluido oral	Extracción en fase sólida (Intercambio catiónico)	Hypersil BDS phenyl (100x2.1mm; 3µm)	Formiato amónico 10mM pH 5 / MeOH Gradiente F=0.2mL/min	ESI+ MRM	Cuadrapolo- Tiempo de vuelo	-Linealidad: 2-100ng/mL -Precisión y exactitud intra e inter día < 16.8% -Rendimiento: 64.3-98.8% -Efecto matriz: No detectado -LOD: 0.22-1.07ng/mL -LOQ: 2ng/mL -Aplicación casos reales
Tatsuno [281]	A, MA, efedrina, metilefedrina, morfina, morfina-3-glucurónido, morfina-6-glucurónido, MAM, benzoilecgonina, cocaína	Orina	Extracción en fase sólida	L-column ODS (150x4.6mm)	Acetato amónico / ACN Gradiente F=1mL/min	TS+ SIM	Cuadrapolo simple	-Linealidad: 40-500ng/mL -Rendimiento: 88-99% -LOD: 2-40ng/mL -Aplicación casos reales

(Continuación tabla 4)

Referencia bibliográfica	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción	Fase estacionaria (Columna)	Fase móvil	Modo de detección	Analizador	Validación
Wood [282]	A, MA, MDA, MDMA, morfina, codeína, MAM, benzolecgonina, cocaína	Fluido oral	Extracción en fase sólida (Intercambio catiónico)	XTerra MS C18 (150x2.1mm; 3.5µm)	Bicarbonato amónico 10mM pH 10 / MeOH Gradiente F=0.25mL/min	ESI+ MRM	Triple cuadrupolo	-Linealidad: 2-200ng/mL -Precisión y exactitud intra e interdía < 15% -Rendimiento: 82.2-99% -Efecto matriz: No detectado -Selectividad -LOD: 0.2-0.5ng/mL -LOQ: 2ng/mL -Aplicación casos reales

4. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS POSTMORTEM

4.1. INTERPRETACIÓN DE LOS HALLAZGOS

Tradicionalmente, la interpretación de los niveles sanguíneos postmortem, se ha hecho comparando con los valores encontrados en casos de dosis terapéuticas o tóxicas en el plasma de personas vivas. Es decir, se considera que los niveles postmortem son semejantes a los antemortem, pero esto raras veces ocurre. Por otro lado, en el caso de disponer de bases de datos con niveles postmortem, el problema radica en que en muchas ocasiones no se indica el lugar de procedencia de la muestra (sangre cardíaca, periférica).

En las muestras postmortem, las concentraciones halladas se ven afectadas por problemas de estabilidad de las drogas en las muestras, o de aparición de sustancias interferentes producidas endógenamente, y además, se ha observado que según el lugar de muestreo de la sangre, los niveles hallados pueden ser muy diferentes (distribución incompleta en el momento de la muerte y fenómeno de redistribución).

Otro problema asociado a la Toxicología postmortem es que no siempre se dispone de las muestras deseadas, o su estado de descomposición y putrefacción es muy avanzado.

Teniendo en cuenta estos factores, la interpretación de los resultados ha de ser realizada con precaución.

4.2. ASPECTOS ESPECIALES DE LA TOXICOLOGÍA POSTMORTEM

En algunas ocasiones, existen grandes diferencias entre las concentraciones halladas en muestras de sangre tomadas de distintos lugares del cadáver. Estas diferencias son tan altas que no se pueden explicar por una distribución incompleta de la droga en el momento de la muerte (diferencias entre sangre venosa y arterial atribuibles a una falta de equilibrio farmacocinético), o por la composición heterogénea de la sangre postmortem (distintas proporciones de eritrocitos y de plasma según el lugar de toma de muestra) [314].

Los factores que hay que tener en cuenta a la hora de interpretar los niveles de las drogas hallados en las muestras postmortem son principalmente la estabilidad en las muestras y el fenómeno de redistribución.

4.2.1. ESTABILIDAD DE LAS DROGAS EN MUESTRAS POSTMORTEM

La descomposición del cadáver se debe a la de autólisis y a la putrefacción. La velocidad de la descomposición es diferente en los diversos órganos y fluidos biológicos. La autólisis es producida por los enzimas naturalmente presentes en el organismo, y la putrefacción sería la destrucción debida a microorganismos. El comienzo de la autólisis es rápido después de la muerte, especialmente en aquellas células con alto contenido en enzimas hidrolíticos, como son las células del páncreas y de la mucosa gástrica, siendo menor en las células del corazón o del hígado [94].

La invasión de la flora intestinal de los tejidos y fluidos biológicos ocurre de un modo rápido, especialmente si el cadáver se encuentra en un ambiente de elevada temperatura y un alto grado de humedad [315]. Los microorganismos realizan su actividad enzimática hidrolizando y transformando lípidos, proteínas, carbohidratos, y otros compuestos presentes como las drogas. Una de las principales bacterias de la flora intestinal es la *Escherichia coli*, que presenta una elevada actividad β -glucuronidasa, lo que afectaría a los glucurónidos, elevando la concentración de la droga sin conjugar [94]. Debido a la acción de los microorganismos, además de alterarse las drogas, se producen sustancias que pueden interferir en el proceso analítico, como las aminas feniletilamina, tiramina y triptamina [316]. Estas aminas representan una interferencia importante en el caso de la determinación de las anfetaminas.

4.2.2. REDISTRIBUCIÓN POSTMORTEM

4.2.2.1. DEFINICIÓN

La redistribución postmortem se define como la difusión postmortem de las drogas, según un gradiente de concentración, desde lugares de elevada concentración en los órganos, a la sangre, resultando en una elevación artificial de los niveles hemáticos. Normalmente, los mayores niveles son hallados en los vasos centrales, y los menores en los periféricos [314]. La redistribución ocurre a nivel celular por difusión pasiva, o por vía vascular desde los principales órganos [94]. Variables incontrolables como el intervalo postmortem, tipo de refrigeración hasta la autopsia, y posición del cuerpo, afectan a la acumulación de la droga en un sitio específico [102].

La redistribución no ocurre con todas las drogas. Las propiedades químicas y farmacocinéticas de éstas como su peso molecular, propiedades ácido/base, pK_a , lipofilia, unión a proteínas y a glóbulos rojos, volumen de distribución y actividad metabólica residual, afectan a su redistribución. Las drogas quedan retenidas en reservorios orgánicos, a partir de los cuales difunden a la sangre. Las drogas básicas son atrapadas en tejidos donde el pH (pH=5), sea menor que el pH sanguíneo (pH=7). Las drogas con alto volumen de distribución ($>3,4$ L/Kg), y que, por tanto, tienen alta afinidad por los tejidos, suelen experimentar con más frecuencia el fenómeno de redistribución postmortem [314, 317].

Los cambios que se producen para liberar a las drogas de sus sitios de unión en los tejidos y posibilitar el paso a la sangre, son complejos cambios físico-químicos debidos a la autólisis y a la putrefacción, que provocan cambios en el pH, en las características de unión de los tejidos y en la integridad de la membrana celular. Además, deben de tenerse en cuenta los movimientos de sangre en el cadáver. En el cadáver la sangre no está estática, si no que existen importantes movimientos debidos al *rigor mortis* y la presión ejercida por los gases de la putrefacción [314].

Los principales reservorios orgánicos de difusión postmortem son el hígado, los pulmones, el tracto gastrointestinal y el miocardio (tabla 5 y fig. 27). Todos estos reservorios contribuyen a elevar los niveles en sangre cardíaca, por lo que se recomienda utilizar, como ya hemos referido, la sangre periférica, concretamente de la vena femoral, con fines cuantitativos. De todos modos estos valores también han de ser tomados con precaución, ya que también puede existir una difusión postmortem de las drogas acumuladas en la orina contenida en la vejiga, a la sangre femoral [318]. Un trauma severo que implique la ruptura de órganos internos, facilita los procesos de difusión [94].

Tabla 5. Principales órganos que actúan como reservorios de las drogas y tejidos a los que afecta su difusión [317].

Reservorio	Tejidos afectados
Hígado	Vena cava inferior, cavidades cardíacas derechas, vasos pulmonares, estómago, duodeno, vesícula biliar
Pulmones	Cavidades cardíacas, vasos torácicos, hígado
Tracto gastrointestinal	Cavidades cardíacas, vasos torácicos, pulmón izquierdo, vena cava inferior
Miocardio	Sangre cardíaca

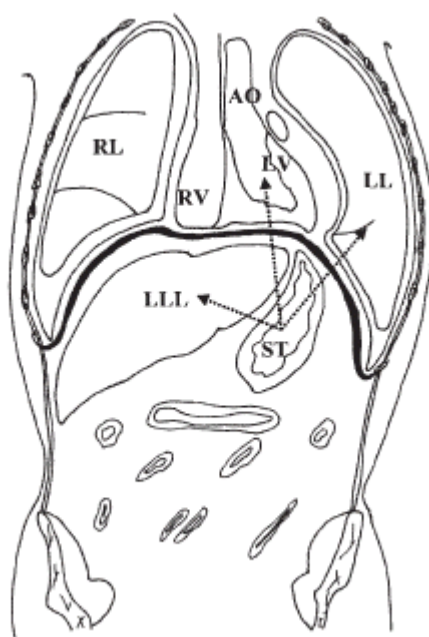


Figura 27. Vista frontal del tórax y el abdomen. Las flechas muestran la dirección de la redistribución entre los principales órganos (RL, pulmón derecho; LL, pulmón izquierdo; AO, aorta; RV, ventrículo derecho; LV, ventrículo izquierdo; ST, estómago; LLL, lóbulo izquierdo del hígado) [317].

4.2.2.2. REDISTRIBUCIÓN POSTMORTEM DE LAS ANFETAMINAS

Las anfetaminas son bases débiles, de bajo peso molecular, con un bajo porcentaje de unión a las proteínas plasmáticas y un elevado volumen de distribución (>3 L/Kg). Estas características las hacen proclives a experimentar el fenómeno de la redistribución postmortem.

El análisis de distintas muestras postmortem en el caso de intoxicaciones mortales de anfetamina y de metanfetamina, demuestra unos altos niveles de estas sustancias en el hígado [319-321], el pulmón [320], el

contenido gástrico [320, 321] y el cerebro [319, 320], existiendo, además, una mayor concentración en la sangre cardíaca que en la periférica [322, 323]. Este incremento de los niveles en sangre cardíaca se debe, probablemente, a la difusión desde los pulmones a las venas pulmonares (que tienen una pared más fina que las arterias) y de allí a la sangre cardíaca [323]. Los dos isómeros de la metanfetamina aparecen en concentraciones semejantes en los distintos tejidos, excepto en la sangre dónde la relación (+)-metanfetamina/(-)-metanfetamina es de 2 [324].

En un estudio de la distribución postmortem de MDMA, Rohrig et al. [325], habían observado una mayor concentración en la sangre cardíaca que en la periférica, y unos elevados niveles en hígado y cerebro. De Letter et al. [326, 327] estudiaron en mayor profundidad la distribución de MDMA en casos de intoxicación por estas sustancias. MDMA y su metabolito MDA se acumulan en varios tejidos, pudiendo existir distribución postmortem desde el hígado y el pulmón a la sangre cardíaca principalmente. Para evitar este fenómeno, la sangre para realizar la cuantificación ha de ser periférica, femoral preferentemente. También por estos problemas, debe tomarse en cuenta el humor vítreo, que una vez alcanzado el equilibrio, el ratio sangre/humor vítreo, es aproximadamente 1, y el músculo esquelético, aunque éste sólo para análisis cualitativo. En el cerebro se hallaron elevadas concentraciones de estas sustancias, especialmente en los lóbulos parietal y frontal, lo que concuerda con las expectativas ya que el cerebro es el órgano diana de estas drogas [326, 327].

Estudios de distribución realizados para otras anfetaminas, tales como MDEA [328] y PMA [329], demuestran un comportamiento semejante al descrito para anfetamina, metanfetamina y MDMA.

5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LOS CASOS DE MUERTE RELACIONADOS CON LAS ANFETAMINAS

Se ha realizado una revisión de las fatalidades relacionadas con el consumo de anfetamina y derivados, ya sean estas sustancias las causantes directas del fallecimiento (intoxicación), o como factores circunstanciales (muerte violenta). Los casos los hemos clasificado según el derivado anfetamínico implicado, es decir, anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, PMA o una combinación de los mismos.

La edad media $\pm$ la desviación estándar (SD) de las muertes debidas a una intoxicación de anfetaminas, o relacionadas con su consumo, fue de 26.7 ± 7.8 años, siendo la mayor parte hombres (83.6%). Las concentraciones halladas han sido muy variadas. Desafortunadamente, en muchas de las ocasiones no se indica la procedencia de la muestra de sangre (cardíaca o periférica), ni tampoco la causa de la muerte, por lo que hacer un análisis de los resultados es muy complejo.

De los 152 casos recopilados 21 fueron debidos a anfetamina, 37 a metanfetamina, 45 a MDMA, 5 a MDA, 5 a MDEA, 1 a MBDB, 8 a PMA y 30 a una combinación de dos o más derivados anfetamínicos.

En el caso de la anfetamina la media $\pm$ SD y mediana de los niveles hallados en muertes debidas a una intoxicación por este compuesto fue de 1.62 ± 1.1 y $1.82 \mu\text{g/mL}$. Estos valores son algo inferiores en el caso de muertes debidas a una intoxicación por anfetaminas junto con otras sustancias (0.31 ± 0.5 y $0.08 \mu\text{g/mL}$), o en los casos de muertes relacionadas con su consumo, como pueden ser los accidentes de distinto tipo (0.33 ± 0.3 y $0.19 \mu\text{g/mL}$).

La media $\pm$ SD y la mediana de los niveles de metanfetamina hallados en muertes debidas a intoxicaciones, en sangre cardíaca, fueron de 8.15 ± 19.5 y $0.71 \mu\text{g/mL}$. Estos valores fueron de 0.49 ± 0.31 y $0.44 \mu\text{g/mL}$ en muertes debidas a otras causas. En todos estos casos la anfetamina también estuvo presente, como un metabolito de la metanfetamina.

En el caso del MDMA, los valores de la media $\pm$ SD y la mediana fueron muy parecidos en los casos de muertes debidas a una intoxicación sólo por MDMA o por MDMA y otras sustancias (1.7 ± 2.1 y $0.7 \mu\text{g/mL}$, y 1.1 ± 1.36 y $0.5 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). En los casos de muertes relacionadas, los niveles son algo inferiores (0.65 ± 0.4 y $0.58 \mu\text{g/mL}$).

En la bibliografía se han encontrado pocos casos de muertes debidas a MDA, MDEA o MBDB. Los niveles hallados en los casos de la MDEA y la MBDB son del orden de los hallados para la MDMA. Sin embargo, los niveles de MDA han sido superiores (media $\pm$ SD = 14.4 ± 7.4 $\mu\text{g/mL}$ y mediana = 12 $\mu\text{g/mL}$).

Tan solo ocho fueron las intoxicaciones halladas en la bibliografía relacionadas con el PMA. La media $\pm$ SD y mediana de los niveles encontrados fueron de 1.90 ± 2.2 y 1.07 $\mu\text{g/mL}$.

En las tablas 6-13 se recoge la información más relevante de los casos de muertes relacionadas con las anfetaminas que han sido halladas en la bibliografía, indicando siempre que fue posible, el lugar de toma de la muestra.

Tabla 6. Revisión de las concentraciones halladas en casos de muertes relacionadas con la anfetamina.

Referencia bibliográfica	Edad/Sexo	Sangre (µg/mL)		Orina (µg/mL)	Hígado (µg/g)	Riñón (µg/g)	Contenido gástrico	Otros hallazgos en sangre (µg/mL) y etanol (g/L)	Causa muerte
		Periférica	Cardíaca						
Lora-Tamayo [330]	34/H	-	-	-	-	-	-	-	Intoxicación
	56/H	-	-	-	-	-	-	-	Intoxicación
	35/H	-	-	-	-	-	-	-	Intoxicación
	36/H	-	-	-	-	-	-	Morfina = 0.9 Beg = 0.03	Intoxicación
?	7/H	-	-	-	-	-	-	Morfina = 0.03	Intoxicación
	30/H	-	-	-	-	-	-	Coca = 0.87 Beg = 8.9 THC = 0.005	Intoxicación
25/H	-	-	-	-	-	-	-	Metadona = 0.18 Nordia = 0.28	Intoxicación
23/H	-	-	-	-	-	-	-	Morfina = 0.11 Beg = 0.10	Intoxicación
27/H	-	-	-	-	-	-	-	Morfina = 0.22 Nordia = 2.11 Etanol = 0.38	Intoxicación
24/H	-	-	-	-	-	-	-	Morfina = 0.03	Intoxicación
37/H	-	-	-	-	-	-	-	Morfina = 0.22 Nordia = 0.41	Intoxicación
41/H	-	-	-	-	-	-	-	Morfina = 0.31 Etanol = 0.89	Intoxicación
19/H	-	-	-	-	-	-	-	Metadona = 0.29 THC = 0.015 Alpra = 0.06	Intoxicación
24/H	-	-	-	-	-	-	-	Etanol = 2.42	Accidente de tráfico
27/H	-	-	-	-	-	-	-	Etanol = 1.15	Accidente de tráfico

(Continuación tabla 6)

Referencia bibliográfica	Edad/Sexo	Sangre (µg/mL)			Orina (µg/mL)	Hígado (µg/g)	Riñón (µg/g)	Contenido gástrico	Otros hallazgos en sangre (µg/mL) y etanol (g/L)	Causa muerte
		Periférica	Cardíaca	Proced. Desconocida						
Lora-Tamayo [330] (Continuación)	22/H	-	-	A = 0.07	-	-	-	-	Etanol = 1.24	Suicidio (Ahorcado)
	42/H	-	-	A = 0.10	-	-	-	-	Beg = 0.02 Etanol = 1.72	Accidente de tráfico
	27/M	-	-	A = 0.19	-	-	-	-	COHb = 61%	Suicidio (Monóxido de carbono)
	28/H	-	-	A = 0.64	-	-	-	-	COHb = 66%	Suicidio (Monóxido de carbono)
25/H		-	-	A = 0.1	-	-	-	-	Beg = 0.16 Etanol = 0.89	Atropello
Meyer [319] H: Hombre; M: Mujer	22/H	A = 2.4	-	-	A = 33.4	A = 11.7	A = 3.9	-	-	Intoxicación

Tabla 7. Revisión de las concentraciones halladas en casos de muertes relacionados con la metanfetamina.

Referencia bibliográfica	Edad/Sexo	Sangre (µg/mL)		Orina (µg/mL)	Hígado (µg/g)	Riñón (µg/g)	Contenido gástrico	Otros hallazgos en sangre (µg/mL) y etanol (g/L)	Causa muerte
		Periférica	Cardíaca						
Barnhart [322]	-	M = 0.46 A = 0.04	M = 1.16 A = 0.07	-	-	-	-	-	-
	-	M = 0.3 A = 0.03	M = 1.16 A = 0.07	-	-	-	-	-	-
	-	M = 0.62 A = 0.08	M = 3.12 A = 0.46	-	-	-	-	-	-
	-	M = 0.71 A = 0.06	M = 1.9 A = 0.18	-	-	-	-	-	-
	-	M = 0.14 A = 0.02	M = 0.24 A = 0.08	-	-	-	-	-	-
	-	M = 2.3 A = 0.24	M = 3.1 A = 0.28	-	-	-	-	-	-
	-	M = 2 A = 0.2	M = 5 A = 0.55	-	-	-	-	-	-
	-	M = 0.3 A = 0.06	M = 0.5 A = 0.09	-	-	-	-	-	-
	-	M = 4.1 A = 0.06	M = 8.9 A = 0.22	-	-	-	-	-	-
	-	M = 0.65 A = 0.07	M = 0.96 A = 0.1	-	-	-	-	-	-
	-	M = 0.38 A = 0.04	M = 1.08 A = 0.12	-	-	-	-	-	-
	-	M = 0.28 A = 0.03	M = 0.4 A = 0.07	-	-	-	-	-	-
	-	M = 0.18 A = 0.05	M = 0.25 A = 0.08	-	-	-	-	-	-
	-	M = 0.26 A = 0.03	M = 0.42 A = 0.09	-	-	-	-	-	-
	-	M = 3.18 A = 0.15	M = 6.6 A = 0.3	-	-	-	-	-	-
	-	M = 0.51 A = 0.05	M = 0.94 A = 0.1	-	-	-	-	-	-
	-	M = 1.3 A = 0.08	M = 3.99 A = 0.21	-	-	-	-	-	-
	-	M = 1.14 A = 0.1	M = 2.7 A = 0.32	-	-	-	-	-	-

(Continuación tabla 7)

Referencia bibliográfica	Edad/Sexo	Sangre (µg/mL)		Orina (µg/mL)	Hígado (µg/g)	Riñón (µg/g)	Contenido gástrico	Otros hallazgos en sangre (µg/mL) y etanol (g/L)	Causa muerte
		Periférica	Cardiaca						
Barnhart [322] (Continuación)	-	M = 0.3 A = 0.04	M = 0.68 A = 0.06	-	-	-	-	-	-
	-	M = 0.03 A = 0.02	M = 0.04 A = 0.05	-	-	-	-	-	-
Berakova [331]	31/H	M = 1.5	-	-	-	-	-	-	Intoxicación
Chatuverdi [324]	44/H	-	-	M = 59.2 A = 1.5	M = 5.53 A = 0.13	-	M = 5.75 mg A = 0.01 mg	-	Accidente aéreo
Kalasinsky [332]	28/H	-	M = 1.74 A = 0.08	-	-	-	-	-	Intoxicación
	44/M	-	M = 0.18 A = 0.03	-	-	-	-	-	Intoxicación
	20/H	-	M = 0.71 A = 0.07	-	-	-	-	-	Intoxicación
	34/M	-	M = 12.5 A = 0.32	-	-	-	-	-	Intoxicación
	36/H	-	M = 0.27 A = 0.09	-	-	-	-	-	Intoxicación
	22/H	-	M = 0.26 A = 0.06	-	-	-	-	-	Intoxicación
	42/H	-	M = 0.33 A = 0.04	-	-	-	-	-	Intoxicación
	20/H	-	M = 7 A = 0.03	-	-	-	-	-	Intoxicación
	34/H	-	M = 0.25 A = 0.04	-	-	-	-	-	Intoxicación
	28/H	-	M = 0.73 A = 0.09	-	-	-	-	-	Intoxicación
	44/M	-	M = 0.66 A = 0.07	-	-	-	-	-	Aterosclerosis coronaria
	33/H	-	M = 0.22 A = 0.04	-	-	-	-	-	Aterosclerosis coronaria
	28/H	-	M = 0.22 A = 0.03	-	-	-	-	-	Disparo
	39/H	-	M = 0.84 A = 0.08	-	-	-	-	-	Disparo
Logan [321]	27/H	M = 53.7 A = 0.43	M = 65.7 A = 0.7	M = 375.6 A = 5.06	-	-	MA = 102860 mg A = 690 mg	Metadona = 0.15	Intoxicación

H: Hombre; M: Mujer

Tabla 8. Revisión bibliográfica de las concentraciones halladas en los casos de muertes relacionados con MDMA.

Referencia bibliográfica	Edad/Sexo	Sangre (µg/mL)		Orina (µg/mL)	Hígado (µg/g)	Riñón (µg/mL)	Contenido gástrico	Otros hallazgos en sangre (µg/mL)	Causa muerte
		Periférica	Cardiaca						
Bernhard [333]	27/H	MDMA = 2.75 MDA = 0.28 A = 0.08	MDMA = 9.1 MDA = 0.83 A = 0.11	-	-	-	-	-	-
	32/H	MDMA = 1.56 MDA = 0.04	MDMA = 0.42 MDA = 0.04	-	-	-	-	Etanol = 1	-
	-	MDMA = 3.37	MDMA = 3.51	-	-	-	-	-	-
Cox [334]	-	MDMA = 5.21	MDMA = 5.38	-	-	-	-	-	-
	22/H	MDMA = 0.43 MDA = 0.3	-	-	-	-	-	-	Intoxicación
	29/H	-	MDMA = 2.32 MDA < 0.25	MDMA = 118.8 MDA = 3.86	-	-	-	-	Politraumatismo
Dar [336] De Letter [326]	17/H	-	-	MDMA = 0.23	MDMA = 1.2	-	-	Etanol	Intoxicación
	23/H	MDMA = 3.1 MDA = 0.09	MDMA = 5.7 MDA = 0.3	MDMA = 170.9 MDA = 4	MDMA = 26.2 MDA = 1.2	MDMA = 13.9 MDA = 3.02	MDMA = 118.1 µg/mL MDA = 0.45 µg/mL	-	Intoxicación
De Letter [327]	18/H	-	MDMA = 0.42 MDA = 0.01	MDMA = 3.29 MDA = 0.1	MDMA = 4.87 MDA = 0.09	MDMA = 1.85 MDA = 0.09	MDMA = 10.5 µg/mL MDA = 0.58 µg/mL	Metadona = 1.1 Etanol = 0.56	Intoxicación
	31/H	MDMA = 13.51 MDA = 0.04	MDMA = 57.3 MDA = 0.05	MDMA = 71.56 MDA = 3.48	MDMA = 103.5 MDA = 0.83	MDMA = 155.3 MDA = 6.68	MDMA = 2310.71 µg/mL MDA = 3.94 µg/mL	-	Intoxicación
Dowling [337]	18/M	-	-	MDMA = 1	-	-	-	Etanol = 0.4	Intoxicación
	32/H	-	-	MDMA = 1.1	-	-	-	-	Ataque agudo de asma
Duflou [338]	29/H	-	-	MDMA = 0.1	-	-	-	-	Intoxicación

(Continuación tabla 8)

Referencia bibliográfica	Edad/Sexo	Sangre (µg/mL)			Orina (µg/mL)	Hígado (µg/g)	Riñón (µg/mL)	Contenido gástrico	Otros hallazgos en sangre (µg/mL) y etanol (g/L)	Causa muerte
		Periférica	Cardiaca	Proced. Desconocida						
Fineschi [339]	19/H	-	-	MDMA = 7.15 MDA = 0.25	MDMA = 31 MDA = 0.85	MDMA=5.10 MDA = 0.97	MDMA = 8.7	-	-	Intoxicación
García-Repetto [340]	19/M	-	-	-	-	MDMA =0.18 MDA = 0.15	MDMA = 0.05	-	-	Intoxicación
	19/H	-	-	MDMA = 3.18 MDA = 0.06	MDMA = 7.99 MDA = 1.18	MDMA = 4.86 MDA = 0.24	-	-	-	Intoxicación
Ghysel [341]	20/H	-	-	MDMA = 0.28 MDA = 0.05	MDMA = 3.2 MDA = 0.74	MDMA =5.13 MDA = 0.26	-	-	-	Intoxicación
	21/M	-	-	MDMA = 0.05 MDA = 0.01	-	-	-	-	-	Intoxicación
-	-	-	-	MDMA = 0.78 MDA = 0.09	-	-	-	-	-	Intoxicación
	-	-	-	MDMA = 0.3	-	-	-	-	-	Intoxicación
Gill [342]	30/H	-	-	MDMA = 0.6 MDA = 0.1	-	-	-	-	-	Intoxicación
	21/H	-	-	MDMA = 3.7 MDA = 0.8	-	-	-	-	-	Intoxicación
-	29/H	-	-	MDMA = 0.7 MDA = 0.1	-	-	-	-	-	Intoxicación
	41/H	-	-	MDMA = 0.5 MDA = 0.1	-	-	-	-	Ketamina	Intoxicación
-	31/M	-	-	MDMA = 0.3 MDA < 0.1	-	-	-	-	Beg Efedrina	Intoxicación
	22/M	-	-	MDMA = 0.2	-	-	-	-	Cannabinoides	Intoxicación
-	18/H	-	-	MDMA = 1.7 MDA = 0.1	-	-	-	-	Ketamina Cannabinoides	Intoxicación
	35/H	-	-	MDMA = 0.6 MDA < 0.1	-	-	-	-	GHB Ketamina Beg	Intoxicación
-	26/H	-	-	Metanfetamina MDMA = 1.7 MDA = 0.3	-	-	-	-	Coca Opi Etanol	Intoxicación
	21/H	-	-	Anfetamina MDMA < 0.1	-	-	-	-	Opi	Intoxicación
-	27/H	-	-	MDMA = 0.6 MDA = 0.1	-	-	-	-	Coca Opi Etanol	Intoxicación

(Continuación tabla 8)

Referencia bibliográfica	Edad/Sexo	Sangre (µg/mL)		Proced. desconocida	Orina (µg/mL)	Hígado (µg/g)	Riñón (µg/mL)	Contenido gástrico	Otros hallazgos en sangre (µg/mL) y etanol (g/L)	Causa muerte
		Periférica	Cardiaca							
Gill [342] (Continuación)	37/H	-	-	MDMA = 0.3 MDA = 0.1	-	-	-	-	Coca Opi Etanol	Intoxicación
	30/H	-	-	MDMA = 0.2 MDA = 0.1	-	-	-	-	Coca Opi Dia	Intoxicación
Henry [343]	32/H	-	-	MDMA = 4.56 MDA = 0.36	-	-	-	-	Etanol = 0.24	Intoxicación
Libiseller [344]	19/M	MDMA = 3.8	-	-	-	-	-	-	THC-COOH = 0.065	Intoxicación
Lo [345]	26/H	MDMA = 18.5	-	-	MDMA = 39.7	-	-	-	-	Intoxicación
Lora-Tamayo [330]	29/H	-	-	MDMA = 4.07 MDA = 0.49	-	-	-	-	Morfina = 0.38 Alpra = 0.1 Etanol = 0.92	Intoxicación
	32/H	-	-	MDMA = 0.27	-	-	-	-	Etanol = 2.47	Atropello
Moore [346]	20/H	-	-	MDMA = 2.8	-	-	-	-	Beg = 0.97 Morfina = 0.11	Intoxicación
Mueller [347]	20/M	-	-	MDMA = 2.3 MDA = 0.1	-	-	-	-	-	Intoxicación
Omtzigt [348]	21/H	-	-	MDMA = 0.26	-	-	-	-	THC = 1.9 THCCOOH = 4.8 11-OH-THC = 0.7	Intoxicación
Rohrig [325]	35/H	MDMA = 2.8	MDMA = 10.9 MDA < 0.5	-	-	MDMA = 20	-	-	Etanol = 0.21	Intoxicación
Suárez [349]	?/M	-	-	MDMA = 0.58 MDA = 0.1	-	MDMA = 1.8 MDA < 0.33	-	-	Beg Dia Nordia	Suicidio
	34/H	-	-	MDMA = 0.2	-	-	-	-	-	Intoxicación (Parkinson)
Walubo [350]	53/H	-	-	MDMA = 3.05	MDMA M A	-	-	-	-	Intoxicación

H: Hombre; M: Mujer

Tabla 9. Revisión bibliográfica de las concentraciones halladas en los casos de muertes relacionadas con MDA.

Referencia bibliográfica	Edad/Sexo	Sangre (µg/mL)		Orina (µg/mL)	Hígado (µg/g)	Riñón (µg/g)	Contenido gástrico	Otros hallazgos en sangre (µg/mL) y etanol (g/L)	Causa muerte
		Periférica	Cardiaca						
Cimbrura [351]	17/H	-	-	MDA = 16	MDA = 11	-	MDA = 0.7 mg	-	Intoxicación
	19/H	-	-	MDA = 12	MDA = 160	-	-	-	Intoxicación
	21/H	-	-	MDA = 26	-	-	MDA	Butabarbital = 9	Intoxicación
H: Hombre; M: Mujer	23/H	-	-	MDA = 12	MDA = 100	-	MDA = 9	-	Intoxicación
	30/H	-	-	MDA = 6	MDA = 46	-	MDA = 17	-	Intoxicación

Tabla 10. Revisión bibliográfica de las concentraciones halladas en los casos de muertes relacionadas con MDEA.

Referencia bibliográfica	Edad/Sexo	Sangre (µg/mL)		Orina (µg/mL)	Hígado (µg/g)	Riñón (µg/g)	Contenido gástrico	Otros hallazgos en sangre (µg/mL) y etanol (g/L)	Causa muerte
		Periférica	Cardiaca						
Balanzó [352]	19/H	-	-	MDA = 314	-	-	-	Etanol = 0.1	Intoxicación (Ingesta de 15 pastillas para evitar control policial)
Dowling [337]	25/H	-	-	MDA = 0.95	-	-	-	Butalbital = 0.8	Ateroesclerosis
	21/H	-	-	MDA = 2	MDA = 4.51	MDA = 2.55	-	Propoxifeno = 0.26	Cardiopatía idiopática
Weinmann [328]	19/H	MDEA = 12 MDA = 0.32 MDMA = 0.016	MDEA = 22 MDA = 0.34 MDMA = 0.02	MDEA = 201 MDA = 7.1 MDMA = 0.135	MDEA = 30	MDEA = 15	MDEA = 52 µg/g MDA = 1.5 µg/g	Norpropoxifeno = 1	Intoxicación
Arimany [353]	27/M	-	-	MDA = 1.2	MDA = 1.9	-	-	-	Intoxicación
H: Hombre; M: Mujer									

Tabla 11. Revisión bibliográfica de las concentraciones halladas en los casos de muertes relacionadas con MBDB.

Referencia bibliográfica	Edad/Sexo	Sangre (µg/mL)		Orina (µg/mL)	Hígado (µg/g)	Riñón (µg/g)	Contenido gástrico	Otros hallazgos en sangre (µg/mL) y etanol (g/L)	Causa muerte
		Periférica	Cardiaca						
Carter [354]	33/H	MBDB = 1.2	-	-	-	-	-	Etanol = 0.15	Intoxicación
H: Hombre									

Tabla 12. Revisión bibliográfica de las concentraciones halladas en los casos de muertes relacionadas con PMA.

Referencia bibliográfica	Edad/Sexo	Sangre (µg/mL)		Orina (µg/mL)	Hígado (µg/g)	Riñón (µg/g)	Contenido gástrico	Otros hallazgos en sangre (µg/mL) y etanol (g/L)	Causa muerte
		Periférica	Cardiaca						
Felgate [36]	37/M	-	-	PMA = 0.24	PMA = 1.4	-	-	Fluoxetina = 0.1 THC	Intoxicación
Kraner [355]	18/M	-	-	PMA = 1.9	-	-	-	-	Intoxicación
	24/H	-	-	PMA = 0.6	-	-	-	-	Intoxicación
	19/H	-	-	PMA = 1.07	-	-	-	Efedrina = 0.71	Intoxicación
Lora-Tamayo [330]	21/H	-	-	PMA = 5.7	-	-	-	-	Intoxicación
Martín [356]	19/H	PMA = 0.6	PMA = 0.7 M = 0.1 A = trazas	-	-	-	-	Beg = trazas	Intoxicación
	18/H	PMA = 1.3	PMA = 2.3	-	-	-	-	Beg = 0.6 Dia = 0.5	Intoxicación
	19/M	PMA = 0.6	PMA = 0.8	-	-	-	-	Metacualona = 0.7 THC = trazas	Intoxicación
H: Hombre; M: Mujer									

Tabla 13. Revisión bibliográfica de las concentraciones halladas en los casos de muertes relacionadas con el consumo de una combinación de anfetaminas.

Referencia bibliográfica	Edad/Sexo	Sangre (µg/mL)		Orina (µg/mL)	Hígado (µg/g)	Riñón (µg/g)	Contenido gástrico	Otros hallazgos en sangre (µg/mL) y etanol (g/L)	Causa muerte
		Periférica	Cardiaca						
Becker [357]	22/H	PMMA = 0.85 PMA = 0.61 A = 0.21	PMMA = 2.12 PMA = 1.94 A = 0.51	PMMA = 10.22 PMA = 6.37 A = 2.39	-	-	-	Beg < 0.01 Etanol = 0.46	Intoxicación
	22/M	-	-	PMA = 1.32 MDMA = 0.3	-	-	-	-	Intoxicación
	26/M	-	-	PMA = 2.2 MDMA = 0.82 M = 0.09	-	-	-	-	Intoxicación
Carter [354]	19/M	A = 2.1 MBDB = 0.44 BDB = 0.11	-	-	-	-	A = 9 µg/mL MBDB = 5.2 µg/mL BDB < 1 µg/mL	-	Intoxicación
Dams [329]	?/H	PMA = 1.6 MDMA = 1.1 MDA = 0.4 A = 0.2	PMA = 2.1 MDMA = 1.6 MDA = 0.6 A = 0.25	PMA = 0.9 MDMA = 0.8 MDA = 0.37 A = 0.5	PMA = 8.9 MDMA = 6.7 MDA = 0.7 A = 0.86	PMA = 5.7 MDMA = 4.06 MDA = 3.9 A = 0.7	PMA = 3.7 mg MDMA = 1.7 mg MDA = 0.7 mg A = 0.3 mg	-	Intoxicación
	31/H	-	-	PMA = 1.7 A = 1.6 M = 0.23	PMA = 11 A = 5.9 MDMA = 1.9 M = 1.4	-	-	Cannabinoides	Intoxicación
	22/M	-	-	PMA = 1.3 MDMA = 0.3	PMA = 7.4 MDMA = 3.2 A = 0.45	-	-	Cannabinoides	Intoxicación
23/H	-	-	-	PMA = 3.7 M = 3.1 A = 0.26	PMA = 7.1 M = 1.7 A = 0.57	-	-	-	Intoxicación
24/H	-	-	-	PMA = 4.9	PMA = 2.1 MDMA = 2.1	-	-	-	Intoxicación
26/M	-	-	-	PMA = 2.2 MDMA = 0.82 M = 0.09 A = 0.03	PMA = 5.6 MDMA = 3.2 M = 0.26 A = 0.35	-	-	-	Intoxicación

(Continuación tabla 13)

Referencia bibliográfica	Edad/Sexo	Sangre (µg/mL)		Proced.	Orina (µg/mL)	Hígado (µg/g)	Riñón (µg/g)	Contenido gástrico	Otros hallazgos en sangre (µg/mL) y etanol (g/L)	Causa muerte
		Periférica	Cardiaca							
Fineschi [339]	20/H	-	-	MDEA = 1.59 MDMA = 0.18 MDA = 0.12	MDEA = 183.73 MDMA = 263.13 MDA = 5.25	MDMA = 13.23	MDMA = 9.81	-	-	Intoxicación
Forrest [359]	21/H	-	-	MDA = 8.5 MDEA = 3.5 MDMA = 2.1 A = 0.26	MDA MDEA MDMA A	-	-	MDA = 299µg/mL MDEA = 324µg/mL MDMA = 96µg/mL A < 0.1 µg/mL	-	Intoxicación
Ghyssels [341]	26/H	-	-	MDMA = 0.38 MBDB = 0.37	-	-	-	Morfina = 0.09 Codeína = 0.007 6-MAM = trazas Etanol = 0.47	-	Intoxicación
	24/H	-	-	MDEA = 23.56 MDMA = 5.39 MDA = 0.8	MDEA = 60.42 MDMA = 2.18 MDA = 2.62	-	-	-	-	Intoxicación
	26/H	-	-	MDEA = 13.87 MDMA = 3.69 MDA = 2.12	MDEA = 60.6 MDMA = 1.4 MDA = 1.43	-	-	-	-	Intoxicación
Johansen [360]	20/H	PMA = 3.4 PMMA = 3.3 MDMA = 1.6	-	-	-	-	-	-	THC Etanol = 0.6	Intoxicación
	20/H	PMA = 0.02 A = 0.02	-	-	-	-	-	-	-	Intoxicación
	24/H	PMA = 0.78 PMMA = 0.68 MDMA = 0.08	-	-	-	-	-	-	Beg = 0.08 Etanol = 0.29	Intoxicación
Lora-Tamayo [330]	17/H	-	-	MDEA = 2 PMMA = 1.51 MDA = 0.3	-	-	-	-	-	Intoxicación
	39/H	-	-	MDMA = 0.6 MDEA = 0.22 A = 0.22 MDA = 0.12	-	-	-	-	-	Intoxicación

(Continuación tabla 13)

Referencia bibliográfica	Edad/Sexo	Sangre (µg/mL)		Orina (µg/mL)	Hígado (µg/g)	Riñón (µg/g)	Contenido gástrico	Otros hallazgos en sangre (µg/mL) y etanol (g/L)	Causa muerte
		Periférica	Cardiaca						
Lora-Tamayo [330] (Continuación)	30/H	-	-	MDMA = 0.98 A = 0.06	-	-	-	Morfina = 0.15 Etanol = 0.38	Intoxicación
	27/H	-	-	MDMA = 8 MDA = 1.2 A = 0.18	-	-	-	Coca = 0.04 Beg = 0.18 Etanol = 0.9	Intoxicación
	19/H	-	-	MDEA = 4.32 MDMA = 0.49 MDA = 0.29 A = 0.2	-	-	-	Dipirona = 1.36	Intoxicación
23/H		-	-	MDEA = 0.77 A = 0.62 MDMA = 0.23 MDA = 0.05	-	-	-	-	Apuñalamiento
	17/H	-	-	MDA = 0.4 MA = 0.35 MDMA = 0.23 A = 0.1	-	-	-	-	Precipitación
	21/H	-	-	MDEA = 1.07 MDMA = 0.17 MDA = 0.18 A = 0.1	-	-	-	Etanol = 0.7	Accidente de tráfico
26/H		-	-	MDEA = 2.44 MDA = 0.15 MDMA = 0.03	-	-	-	Beg = 0.05 Etanol = 0.88	Accidente de tráfico
	20/H	-	-	MDA = 0.13 MDMA = 0.09 A = 0.4	-	-	-	-	Intoxicación
	19/H	-	-	MDMA = 0.13	-	-	-	-	Intoxicación
28/H		-	-	MDMA = 0.3 MDA = 0.1	-	-	-	-	Intoxicación

H: Hombre; M: Mujer

**IV. LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE
COUPLÉ À LA SPECTROMETRIE DE MASSE
DANS LA TOXICOLOGIE MÉDICO-LÉGALE**

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) constitue une puissante technique analytique, d'importance croissante dans différentes disciplines comme la toxicologie médico-légale.

La LC-MS est une technique spécialement indiquée pour l'analyse des molécules polaires, de haut poids moléculaire et thermolabiles. D'ailleurs beaucoup de ces molécules ne peuvent pas être analysées par GC-MS, par exemple les glucuronides et les protéines, ou autres molécules qui ont besoin d'une procédure de dérivation avant l'analyse [362].

La spectrométrie de masse est une méthode très spécifique et sensible, mise en œuvre sous une enceinte de haut vide. La spectrométrie de masse mesure les rapports masse/charge (m/z) des molécules individuelles et ionisées. Pour cela, la spectrométrie de masse doit assurer la volatilisation et l'ionisation des molécules, et mesurer les rapports m/z . Par ailleurs, la séparation chromatographique est réalisée à pression atmosphérique et dans l'état liquide. Compte tenu de la difficulté du passage de l'état liquide à pression atmosphérique à l'état gazeux sous haut vide, la mise en point de cette technique a été un vrai défi.

La recherche sur le couplage LC-MS commence au début des années soixante-dix, et s'est consacrée durant vingt ans à résoudre les problèmes liés de cette difficile union [363].

Le premier essai de couplage LC-MS a été décrit par Arpino et al. en 1974 [364]. Depuis, de nombreuses sources d'ions ont été décrites tel: la *Direct Liquid Inlet* (DLI) [364-366], la *Moving Belt* [367-371], la *Fast Atom Bombardment* (FAB) [372, 373], la *Particle Beam* (PB) [374, 375], la *Thermospray* (TS) [376], l'*Electrospray* (ESI) [377, 378], l'*Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI) [379], la *Sonic Spray Ionisation* (SSI) [380, 381], l'*Atmospheric pressure photo-ionisation* (APPI) [382] et l'*Atmospheric pressure laser ionisation* (APLI) [383]. Parmi toutes ces sources, seules deux ont fini par s'imposer: l'ESI et l'APCI. Dans la bibliographie on trouve de nombreux passages en revue des différents types de sources d'ions existantes [362, 384-387].

Les principaux avantages des sources d'ionisation à pression atmosphérique (API), c'est à dire, l'electrospray (ESI) et l'ionisation chimique à

pression atmosphérique (APCI), ont été mis en évidence par Voyksner [388], et ceux-ci sont les suivantes:

- Le volume de phase mobile utilisé est plus proche des valeurs normalement employées dans la chromatographie liquide seule. Dans le cas des autres sources d'ions le débit était très bas.
- Les techniques API sont recommandées pour l'analyse des molécules non volatiles, polaires et thermolabiles, qui sont normalement analysées par chromatographie liquide.
- Le couplage LC-API-MS donne une technique très sensible, avec des limites de détections aussi bonnes ou meilleures qu'en GC - MS.
- Les techniques API sont très stables et relativement faciles à manipuler.

Le spectromètre de masse employé peut être un spectromètre simple avec un analyseur, alors on parle de LC-MS, ou un spectromètre de masse en tandem, c'est à dire deux ou « n » analyseurs, et alors on parle de LC-MSⁿ.

1. LE SPÉCTROMÈTRE DE MASSE DANS LC-MS

Le spectromètre de masse mesure la masse de molécules isolées. Pour cela, comme nous l'avons dit précédemment, le spectromètre de masse doit assurer les opérations suivantes :

1. **Volatiliser** : c'est le rôle de la source. Volatiliser est séparer les molécules les unes de les autres : on passe de l'état de matière condensée à un état gazeux.
2. **Ioniser** : c'est aussi le rôle de la source. Ioniser est transformer les molécules en ions, car un spectromètre de masse fonctionne grâce à des champs électriques.
3. Faire passer les ions formés à pression atmosphérique à l'enceinte sous vide de l'analyseur du spectromètre de masse.
4. **Mesurer les rapports m/z** : c'est le rôle de l'analyseur. La masse moléculaire est calculée à partir du rapport m/z , déduit de ce rapport.

Un spectromètre de masse est donc constitué de quatre parties (fig. 28) :

1. **La source d'ions** : pour volatiliser et ioniser. Ces opérations peuvent se faire simultanément ou successivement, selon le type de source d'ion (ESI ou APCI).
2. **L'interface** : son rôle est de faire passer les ions formés à pression atmosphérique dans l'enceinte sous vide de l'analyseur.
3. **L'analyseur** : son rôle est de mesurer les valeurs du rapport masse/charge (m/z). C'est une partie de l'appareil qui comporte des champs électrostatiques très précis pour guider et déplacer les ions dans l'appareil (lentilles électrostatiques, optique ionique), et dans le condition de vide assurant que les ions puissent se déplacer sans être détruits ou déviés par des molécules résiduelles, sur une distance supérieur à la longueur de l'analyseur. Ce-ci est appelé le libre parcourt moyen supérieur à la longueur de l'analyseur.
4. **Le détecteur** : sa fonction est de transformer les ions en électrons, et d'amplifier le signal obtenu.

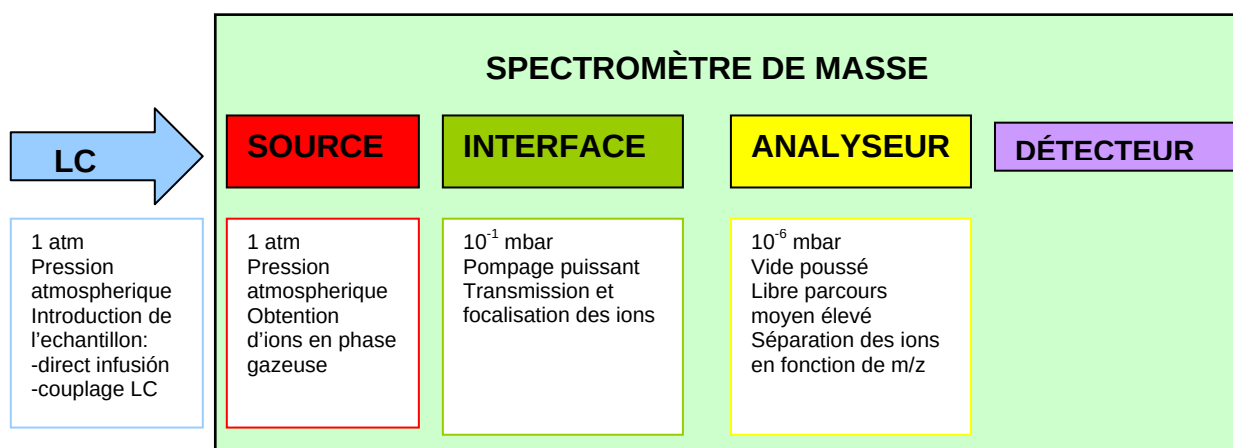


Figure 28. Les différentes parties de la chromatographie liquide (flèche bleue) couplée à la spectrométrie de masse (carré vert).

1.1. LA SOURCE D'IONS

Le rôle de la source d'ions est volatiliser et ioniser les molécules. L'électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) sont des sources d'ions classées comme « sources douces », parce que ces type des sources génèrent des ions moléculaires à nombre pair d'électrons, qui sont relativement stables et qui ont des durées de vie suffisant pour traverser l'analyseur, arriver jusqu'au le détecteur, et donc être mesurées.

Les sources à ionisation douce peuvent apporter des informations sur la masse moléculaire d'un composé, et une mesure de sa quantité. Malheureusement, il n'y a pas de fragmentation, donc on ne connaît pas la masse des fragments de ce composé, et donc il n'y a pas d'information structurale.

Pour obtenir des fragments des molécules avec ce type de source d'ions, il faut employer la technique appelée *Collision Induced Dissociation* (CID), qui a lieu dans la source dans le cas de LC-MS (*in source CID*), et dans la chambre de collision dans le cas de LC-MS/MS.

L'ESI y l'APCI utilisent un haut voltage et la nébulisation pneumatique pour la formation d'ions en phase gazeuse. Les deux techniques sont très sensibles et elles génèrent des ions quasi-moléculaires $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$, c'est-à-dire, le poids moléculaire plus un ou le poids moléculaire moins un proton $[H^+]$, sans fragmentation. Elles se distinguent l'une de l'autre par la manière de

généraliser des ions, le type d'analyte et le débit de travail. En ESI, l'ionisation est réalisée en phase liquide, en solution, ce qui est spécialement indiqué pour les analytes polaires et biomolécules, et le débit de travail employé est entre 0.001 et 1 mL/min. En APCI, la ionisation est réalisée en phase gazeuse, ce qui est spécialement indiqué pour les composés moins polaires et plus petits que lesquels analysés par ESI, et un peu volatiles. Le débit de travail est plus haut, entre 0.2 et 2 mL/min.

Pour les deux sources, la phase mobile utilisée doit être très volatile, pour éviter la formation d'un dépôt dans la source. Il faut le pourcentage du solvant organique, acetonitrile ou méthanol, soit le plus haut possible. Ainsi la efficacité de l'évaporation du solvant est-elle améliorée, et de ce fait l'ionisation des molécules aussi.

1.1.1. L'IONISATION CHIMIQUE À PRESSION ATMOSPHERIQUE : APCI

La principale caractéristique de l'ionisation par APCI c'est que les ions sont générés en phase gazeuse, et se produit en deux étapes :

1. **Flash de volatilisation:** de la vapeur est formée en chauffant le spray à une température haute (400-500°C). La chaleur fait évaporer rapidement le solvant et les analytes. Les analytes doivent être un peu volatiles, et stables sous cet ambiant. La vapeur est donc formée par des molécules du solvant et des analytes (fig. 29).

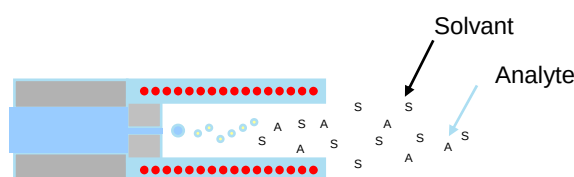


Figure 29. Dessin du flash volatilisation.

2. **Ionisation en phase gazeuse:** des électrons sont formés grâce à la décharge au niveau de la couronne (2-5 KV). La couronne est l'électrode de haut voltage qui est placé à la sorti de la sonde de volatilisation et avant le cône. Les électrons formés provoquent l'ionisation du gaz de la source, normalement l'azote. L'azote ionisé génère des ions réactifs parmi les molécules du solvant, et par une

réaction en chaîne, ces ions réactifs provoquent finalement l'ionisation des molécules (fig. 30) [389].

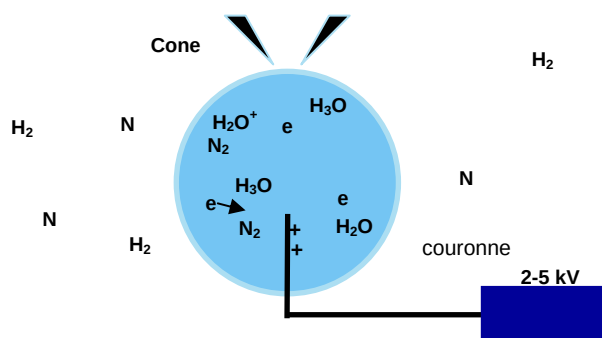


Figure 30. Dessin de l'ionisation par APCI.

Selon soit la polarité de la décharge en couronne ($\pm 2-5$ KV), l'ionisation par APCI peut être une ionisation positive, en protonant un site basique de la molécule $[M+H]^+$, ou une ionisation négative, en perdant un proton de la molécule $[M-H]^-$.

1.1.2. L'IONISATION PAR ÉLECTROSPRAY : ESI

La principale caractéristique de l'ionisation par ESI c'est que les ions sont générés en phase liquide et ensuite ils sont volatilisés. Le processus suivi pour parvenir à ce résultat est le suivant:

1. **Production de gouttelettes chargées**, à partir de l'électrolyte en solution. La formation du spray dépend du voltage du capillaire (1-3 KV) et de l'assistance pneumatique, d'un gaz de nébulisation. Le gaz normalement utilisé est l'azote, qui est amené de façon concentrique par le capillaire.

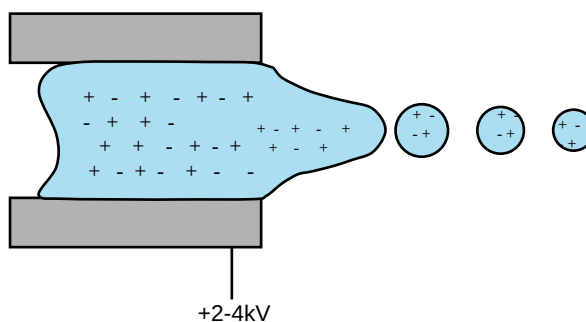


Figure 31. Production de gouttelettes chargées.

2. **Fission de gouttelettes chargées** : à mesure que le solvant s'évapore du fait de la température et du gaz, la taille de la gouttelette se réduit, mais les nombres de charges électriques est constant. De cette façon des explosions coulombiennes ont lieu, la force de répulsion coulombimétrique étant supérieur à la tension superficielle du liquide, et la gouttelette casse.

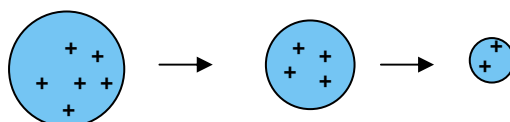


Figure 32. Fission de gouttelettes chargées.

3. **Transfert des ions en phase gazeuse**. Finalement, l'ion individuel est formé en phase gazeuse à partir des gouttelettes chargées. Le mécanisme de cette formation est mal connu, mais il y a deux modèles qui expliquent ce transfert :

- **Le modèle de Dole** [377] : connu comme « le modèle de la charge résiduelle », il énonce que des fissions se produisent jusqu'à obtenir un seul ion par gouttelette.
- **Le modèle d'Iribarne et Thomson** [390] : c'est le modèle de l'évaporation ionique. À partir d'une gouttelette de moins de 10nm de rayon, il y a une extraction directe des ions (fig. 33).

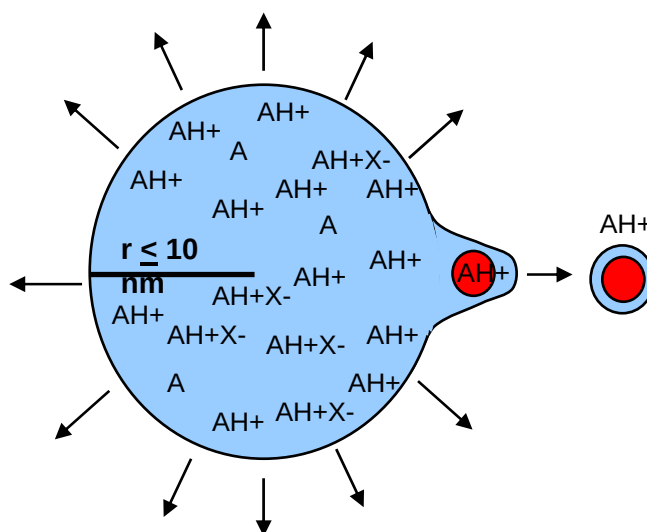


Figure 33. Extraction directe des ions à partir d'une gouttelette de moins de 10 nm de rayon, selon le modèle d'Iribarne et Thomson.

L'ionisation par ESI peut être aussi une ionisation positive (protonation d'un site basique de la molécule), ou une ionisation négative (perte d'un proton de la molécule), selon la polarité du capillaire soit positive ou négative.

1.2. L'INTERFACE

La ionisation par APCI ou ESI qui vient d'être décrit, se fait à pression atmosphérique. Pour faire passer les ions formés à pression atmosphérique dans l'enceinte sous vide de l'analyseur du spectromètre de masse, il faut un dispositif appelé l'interface.

L'interface est une suite d'orifices (en forme de cônes habituellement), répartis en général en deux étages, avec à chaque étage une importante chute de la pression obtenue par pompage (fig. 34).

Dans le premier étage, l'interface guide les ions grâce à un champ électrostatique (appelé voltage de cône : V_c). Le rôle de ce champ électrostatique est très important car les ions présentent souvent une grande dispersion en énergie cinétique, et il faut les guider.

Dans le deuxième étage, c'est grâce à un champ hexapolaire, qui fonctionne comme un quadripôle en mode « RF only », que l'énergie cinétique des ions est corrigée. De cette façon, le faisceau d'ions devient homocinétique, c'est-à-dire qu'une focalisation de l'énergie cinétique se produit. Le champ hexapolaire induit aussi une focalisation spatiale. De cette façon, on optimise les conditions pour le bon fonctionnement de l'analyseur.

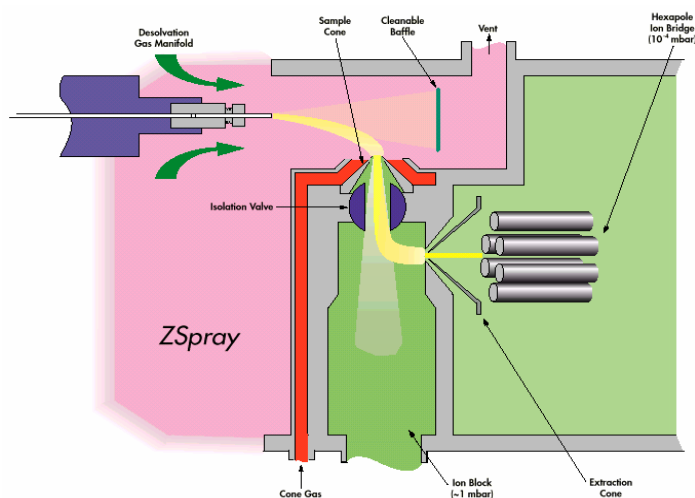


Figure 34. La source (en rose) ESI, et le premier (en vert foncé) et le deuxième (en vert claire) étage de l'interface, des appareils de Micromass.

Le réglage du voltage de cône (Vc) de l'interface est essentiel en l'ionisation à pression atmosphérique (API), parce que grâce à ce voltage l'interface permet de conférer aux ions une énergie interne variable.

La possibilité de doser l'énergie interne des ions permet d'un côté de désolvater totalement les ions, ce que est nécessaire du fait qu'après leur formation par électrospray, les ions sont souvent encore partiellement solvatés (*clusters*). D'un autre côté, le dosage de l'énergie interne des ions permet d'induire des fragmentations des ions dans l'interface même, avant que les ions ne pénètrent dans l'analyseur ; ceci permet donc d'obtenir des informations de structure sur des composés purs, sans avoir à faire de MS-MS. Ceci est appelé *in source Collision Induced Dissociation* (in source-CID). En MS-MS il existe une chambre de collision, après le premier analyseur, où la CID a lieu, grâce à la présence d'un gaz de collision (normalement de l'argon). C'est alors dans la source ou dans la chambre de collision que les fragments de la molécule sont obtenus.

Le système de transfert des ions dans les appareils de Micromass employé dans l'élaboration de cette Thèse (ZMD et Quattro Micro™), suit un parcours orthogonal en « Z », appelé Z-spray (fig. 35). Cette disposition physique donne plus de sensibilité, car elle permet d'éviter que les molécules neutres ou non volatiles n'entrent dans l'analyseur. Ainsi le bruit de fond est-il diminué [384], et par ailleurs, on évite la contamination de l'hexapôle et du quadripôle.

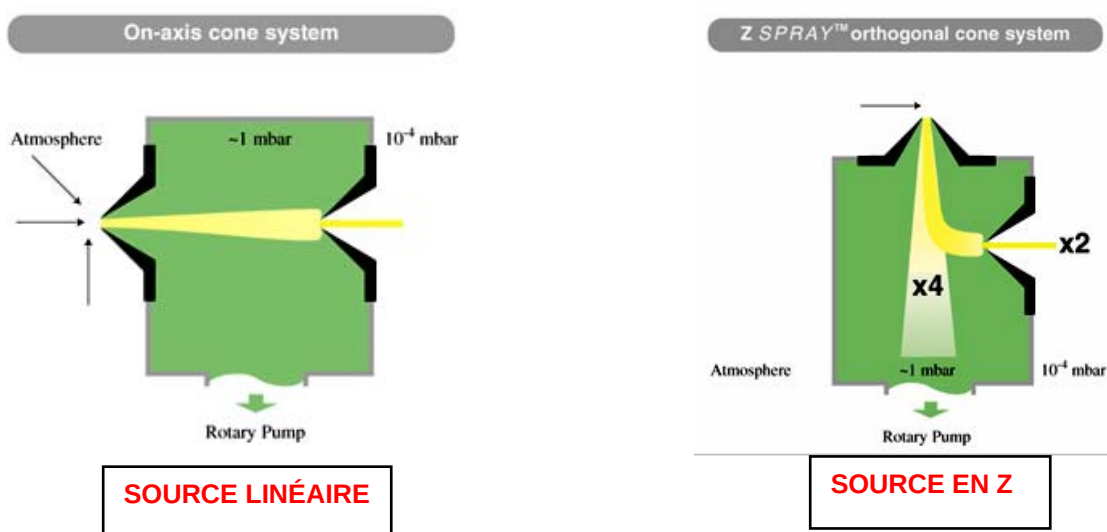


Figure 35. Comparaison entre la disposition linéaire et en « Z » de la interface.

1.3. L'ANALYSEUR

Il y a plusieurs types d'analyseurs qui sont basés sur de principes physiques différents, mais tous les analyseurs mesurent de valeurs m/z . Les plus important sont : déflexion par un champ électrique et magnétique (*electric and magnetic sector*, E & B), déflexion par un champ quadrupolaire (*quadrupole*, Q), confinement dans un piège à ion (*ion trap*, IT), mesure d'un temps de vol (*time-of-flight*, TOF) et résonance cyclotronique d'ions à Transformée de Fourier (*Fourier transform*, FT) [389].

Les principales caractéristiques d'un analyseur que l'on peut citer sont: la résolution R, qui est l'aptitude d'un analyseur à séparer des ions distants d'un dalton, la gamme de m/z qu'il peut analyser, la rapidité de balayage en m/z , la sensibilité et la vitesse avec laquelle les ions le traversent. Chaque type d'analyseur à son "point fort".

Ce travaille a été réalisé en utilisant un analyseur quadripolaire. Ce type est très utilisé, du fait de sa manipulation facile, de la gamme de m/z qu'il peut analyser, de sa bonne linéarité, et de son prix économique.

L'analyseur quadripolaire a été décrit par Dawson et Peter en 1976 [391]. Il est formé de quatre barres de métal (en molybdène), parallèles et équidistantes à un axe central, entre lesquelles sont injectés les ions avec une énergie cinétique de quelques volts (fig. 36). Les ions oscillent entre les barres (slalom) grâce à des tensions électriques oscillantes appliquées sur les barres (courant continu, dc ; et courant alternatif, rf). Les ions d'une seule valeur m/z arrivent à traverser le système sans heurter les barres. Les barres opposées ont la même polarité, et donc les barres adjacentes une polarité contraire (fig. 37).

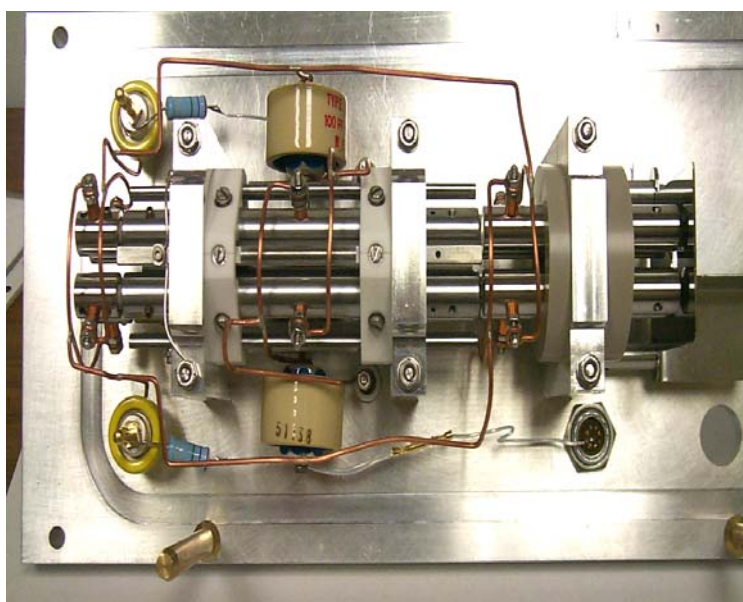


Figure 36. Photographie d'un analyseur quadripolaire.

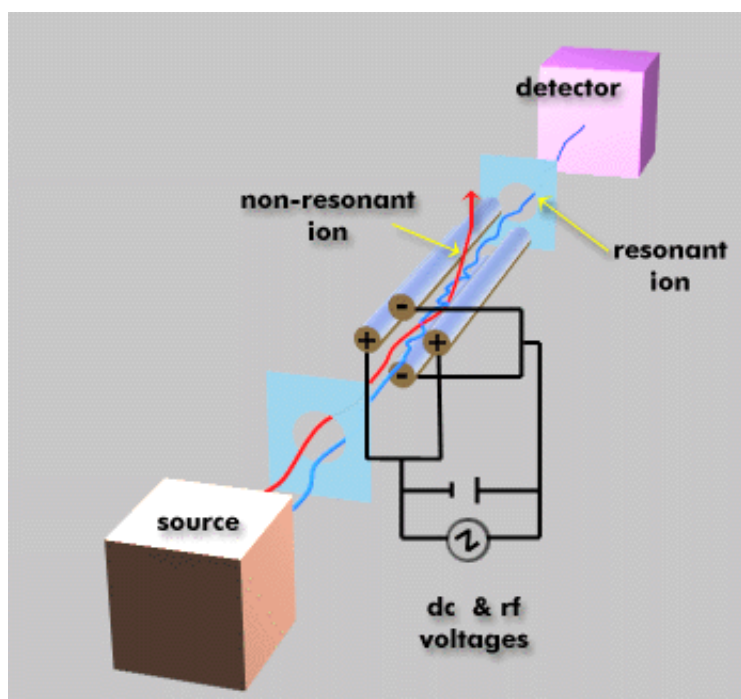


Figure 37. Dessin d'un analyseur quadripolaire. Seule une m/z arrive jusqu'au détecteur (ion résonant, ligne bleue), tandis que l'ion non-résonant n'arrive pas (ligne rouge).

On peut résumer les principales caractéristiques de cet analyseur ainsi [389]:

- Résolution : très bas (1 unité de masse)
- Gamme de masse : 50-2000 uma
- Vitesse de balayage : 4000 uma/s
- Vide de travail : 10^{-4} - 10^{-5} mbar
- Symbole graphique : 

On peut accoupler plusieurs analyseurs (MS-MS, MS^n) pour faire de la spectrométrie de masse à plusieurs dimensions, en utilisant successivement le pouvoir séparateur de chaque analyseur. Ceux-ci peuvent être identiques, comme les utilisés en ce travail (QqQ, appelé triple-quadrupôle), ou différents, comme par exemple Q-TOF (couplage d'un quadrupole et d'un temps de vol). Certains analyseurs, comme le *Ion trap* (IT), offrent la possibilité de travailler en MS ou en MS^n .

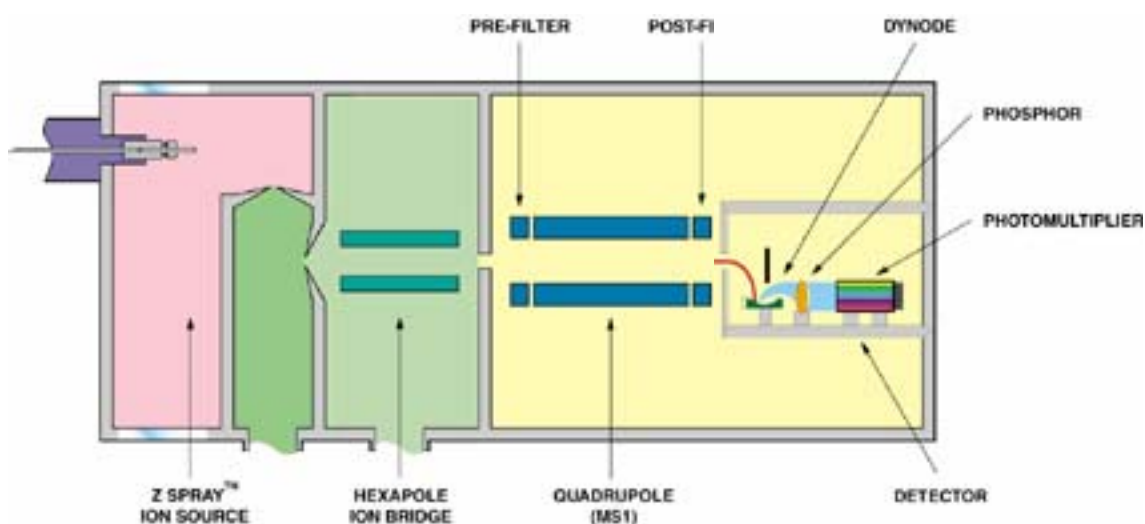


Figure 38. Spectromètre de masse simple quadrupôle (Q).

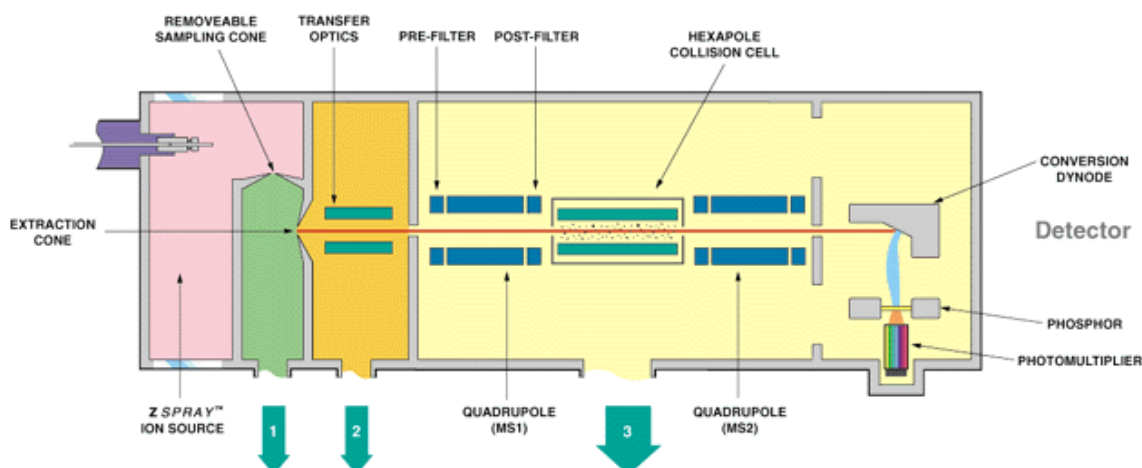


Figure 39. Spectromètre de masse en tandem quadripôle-quadripôle. Dans le cas du spectromètre de masse QqQ, entre les deux analyseurs se trouve la cellule de collision (hexapole collision cell dans la figure), et c'est pour cela que ce type d'analyseur est appelé triple quadripôle.

1.4. LE DÉTECTEUR

Le détecteur est la partie du appareil où les ions qui ont été séparés par l'analyseur, sont transformés en un type de signal électrique qui peut être mesuré (courant). Le signal analogue est alors transformé en un signal digital, mémorisée par l'équipement [387].

Les spectromètres de masse employés à la réalisation de ce travail disposent d'un détecteur photomultiplicateur. Les ions sont transformés en électrons, lesquels sont alors transformés en photons. Le photomultiplicateur amplifie le signal obtenu. Voici un dessin de ce type de détecteur (fig. 40).

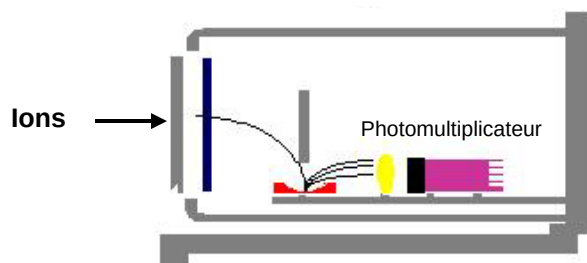


Figure 40. Dessin d'un détecteur photomultiplicateur.

1.5. LE VIDE

L'ionisation des molécules a lieu à pression atmosphérique, mais l'analyseur travaille dans une enceinte où règne un vide suffisant pour que les ions puissent se déplacer sans être détruits ou déviés par des molécules résiduelles.

Le vide est généré par des pompes et mesuré par des gauges à vide (gauge Pirani et gauge Penning). Ils existent différents types de pompes qui sont caractérisées par le vide maximum qu'elles peuvent générer, connu comme vide limite. Il y a deux types principaux :

- **Les pompes à palettes** : avec un vide limite de 10^{-2} mbar, et elles sont utilisées en général pour pomper la sortie de pompes plus performantes. On dit qu'elles génèrent le vide primaire.
- **Les pompes turbomoléculaires** : qui chassent les molécules d'une enceinte grâce à des turbines en séries qui tournent jusqu'à 100000 tours/min. Elles peuvent générer un vide de 10^{-7} mbar. Leur sortie doit être pompée par un pompage primaire. Elles assurent donc le vide secondaire.

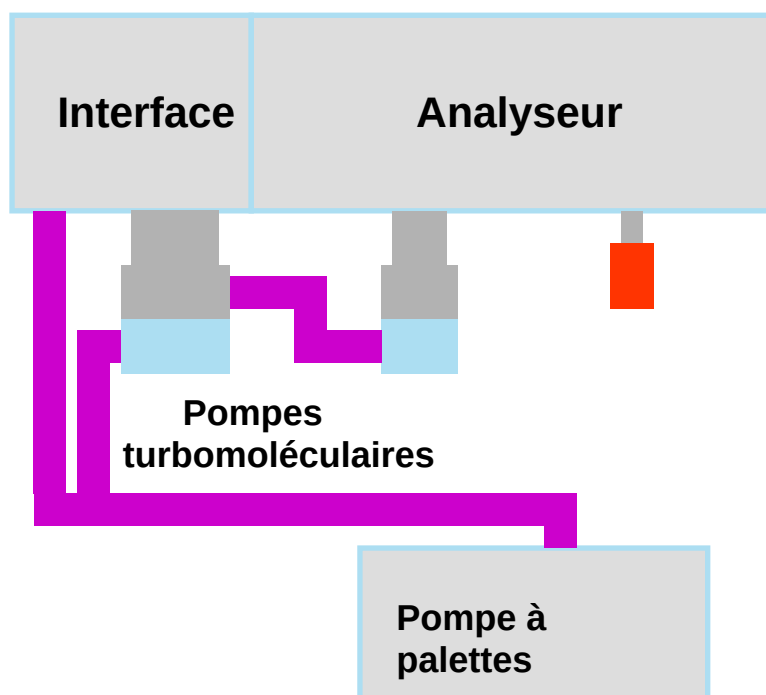


Figure 41. Cette figure montre l'emplacement des pompes par rapport au spectromètre de masse. Les pompes turbomoléculaires travaillent au niveau de l'interface et de l'analyseur, et la pompe à palettes au niveau de l'interface et à la sortie des pompes turbomoléculaires.

2. MODES DE TRAVAIL EN LC-MS ET LC-MS/MS

Un analyseur quadripolaire simple (MS) peut travailler de deux façons différentes:

1. **SCAN**: un balayage de m/z est fait pendant le chromatogramme. Ce mode de travail est intéressant si on veut obtenir l'information totale du spectre de la molécule.
2. **SIM (Selected Ion Monitoring)**: ce mode de travail suit une m/z déterminée pendant le chromatogramme.

En MS/MS plusieurs modes de travail sont possibles, selon le mode de travail SIM ou SCAN de chaque analyseur (fig.42). De cette façon on a [392]:

1. **Balayage d'ions fragments ou *daughter scan***: cette technique implique d'isoler un ion précurseur ou parent dans le premier analyseur, de le casser dans la chambre de collision, et de faire un balayage d'ions fragments ou fils obtenus dans le deuxième analyseur.
2. **Balayage d'ions parents ou *parent scan***: tous les ions traversent le premier analyseur, et chaque m/z est cassé dans la chambre de collision. Le deuxième analyseur va alors seulement suivre un m/z déterminé, qui arrive jusqu'au détecteur.
3. **Balayage en perte de neutre constant (*neutral loss scan*)**: le premier et le deuxième analyseur font un balayage des m/z , mais les m/z du deuxième sont balayées à une valeur fixe (neutre constant) inférieur à celles du premier. Avec cette technique on peut détecter les analytes qui ont la même perte neutre constant.
4. **MRM (*Multiple reaction monitoring*)**: cette technique l'équivalent en MS/MS du SIM en MS, mais beaucoup plus spécifique. En MRM, une m/z déterminé est choisi dans le premier analyseur, et entre en la chambre de collision. Dans le deuxième analyseur, parmi tous les fragments générés, une m/z est choisi, et celle-ci arrive jusqu'au détecteur. Ce mode de travail est une puissante technique analytique qui permet faire la quantification de faibles quantités d'analyte en matrices complexes.

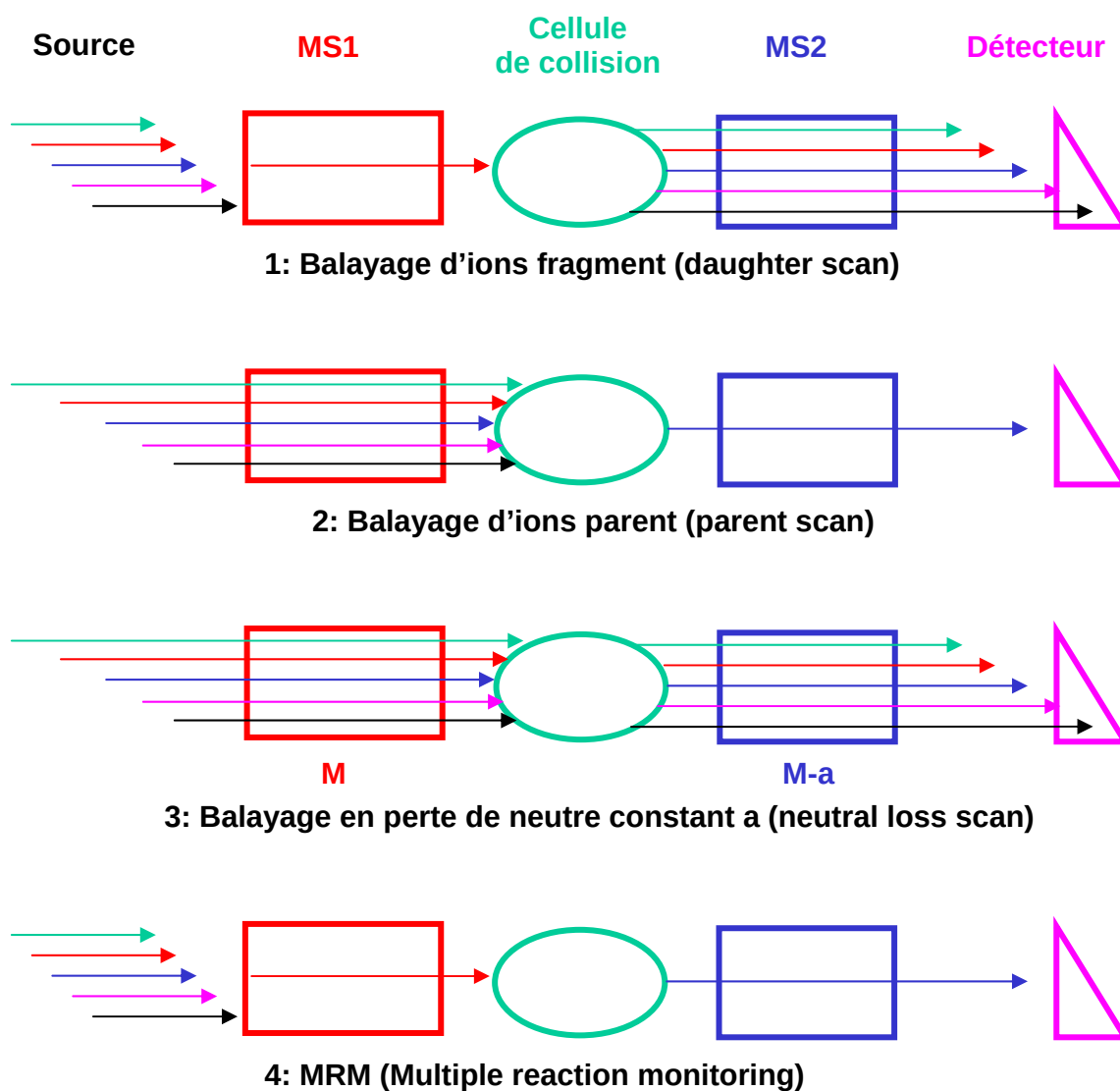


Figure 42. Les quatre modes de travail en MS/MS. On représente le premier analyseur (carré rouge), la chambre de collision (ellipse verte) et le deuxième analyseur (carré bleu).

3. L'APPLICATION DE LA LC-MS EN LA TOXICOLOGIE MÉDICO-LÉGALE

Les principales applications de la LC-MS en toxicologie médico-légale sont les suivants:

- Les méthodes de détermination de stupéfiants
- Les méthodes de détermination de médicaments
- L'analyse toxicologique systématique (STA):
 - Les méthodes de screening de drogues prédéterminées
 - Les bibliothèques en LC-MS

3.1. Les méthodes de détermination de stupéfiants

Le nombre de travaux scientifiques où les drogues sont analysées par LC-MS, s'est accru de manière spectaculaire pendant les dernières années. La LC-MS a permis de développer des méthodes plus sensibles et plus spécifiques que les autres techniques analytiques.

Les méthodes décrits déterminent plusieurs stupéfiants comme les amphétamines, la cocaïne, les opiacés, le cannabis, le LSD, etc., et leur métabolites, dans les différents matrices biologiques, poudre, comprimé, etc. Les méthodes développées déterminent un ou plusieurs composés en même temps.

Dû à sa sensibilité et à sa spécificité, la LC-MS est de plus en plus accepté comme la technique de confirmation dans les laboratoires de toxicologie médico-légale, en substitution de la GC-MS.

La sensibilité élevée de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, a permis la détection de très faibles quantités d'une substance. Cette caractéristique est très importante dans les cas de soumission chimique. La soumission chimique peut être défini comme l'administration de substances psychoactives à une personne à des fins délictueuses ou criminelles [393]. Les particularités du diagnostic de la soumission chimique, sont qu'en raison du long délai entre les faits et la collecte des échantillons et de la faible quantité du xénobiotique administré, normalement une dose unique, il faut choisir les meilleures matrices à prélever, donc il faut connaître les fenêtres de détection des composés, et avoir des méthodes et des technologies analytiques très sensibles, comme LC-MS/MS.

Dans la bibliographie on trouve beaucoup de révisions des méthodes de détermination de ce type de composés développés par LC-MS [362, 384-386, 394-398].

3.2. Les méthodes de détermination de médicaments

Comme pour les stupéfiants, le nombre de travaux scientifiques où les médicaments sont analysés par LC-MS s'est accru de manière spectaculaire pendant les dernières années. La LC-MS a là aussi permis de développer des méthodes plus sensibles et plus spécifiques, que les autres techniques analytiques.

La recherche pharmaceutique utilise LC-MS ou LC-MS/MS pour déterminer des médicaments dans les matrices biologiques comme le sang et les urines, qui proviennent des études de disponibilité, de bioéquivalence ou de pharmacocinétique [399].

Il y a beaucoup des médicaments qui sont d'intérêt médico-légale, comme les anxiolytiques, les hypnotiques, où les antidépresseurs. Ceux-ci peuvent altérer l'aptitude à conduire un véhicule, être employés dans la soumission chimique, etc. Donc il est très important de disposer de méthodes sensibles et spécifiques pour ces types de composés.

3.3. L'analyse toxicologique systématique

La toxicologie médico-légale a besoin de techniques de screening de drogues dans les milieux biologiques. Les défis qu'il faut affronter sont la quantité de échantillon (<1mL), et les nombreuses drogues que l'on veut chercher.

En utilisant LC-MS on peut développer des méthodes de screening des drogues prédéterminées, où faire des bibliothèques.

3.3.1. Les méthodes de screening de drogues prédéterminées

Ce sont des méthodes qui déterminent plusieurs drogues en même temps dans les urines, le sang où d'autres milieux biologiques. Parfois, ces méthodes permettent en même de faire du screening, d'établir la confirmation et quantifier. En LC-MS on travaille alors en mode SIM, et en LC-MS/MS en mode MRM. On choisit a priori les substances recherchées. On peut suivre des

méthodes de screening d'un groupe de substances, comme par exemple le screening de benzodiazépines [400-402], ou de plusieurs groupes de substances, comme par exemple le screening d'amphétamines, opiacés et cocaïne [278, 280-282].

3.3.2. Les bibliothèques en LC-MS

Le travail avec des bibliothèques consiste à pratiquer l'injection en SCAN, pour obtenir un spectre que l'équipement peut alors comparer avec ceux de la bibliothèque. De cet façon le composé est identifié.

Actuellement, les bibliothèques plus utilisées pour faire un screening général de drogues inconnues, sont produites en chromatographie de gaz-impact électronique-spectrométrie de masse (GC-EI-MS), car il existe de très nombreuses bibliothèques des spectres des molécules obtenues par cette technique. Les spectres obtenus par GC-EI-MS sont très reproductibles parmi les différents fabricants, mais il y a des molécules qui ne peuvent pas être analysé par GC-EI-MS (substances thermolabiles, non volatiles). La LC-MS est capable d'analyser ces molécules, mais le principal problème est la grande variabilité parmi les spectres obtenus utilisant les équipes de différents fabricants, et il faut utiliser différents paramètres (voltages de cônes, de capillaire).

Weinmann et al. [403-405] et Marquet et al. [406, 407], ont élaboré ses leurs propres bibliothèques comprenant les drogues illégales et les drogues thérapeutiques.

Durant l'élaboration de cette Thèse, et spécialement pendant mon stage au Institut de Médecine Légale de Strasbourg dans le Service de Toxicologie, sur la direction de Monsieur le Dr. Pascal Kintz, plusieurs méthodes pour la détermination de stupéfiants et médicaments par LC-MS ou LC-MS/MS ont été développés et appliqués à la toxicologie médico-légale [278, 400-402, 408-412].

V. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La drogadicción constituye un grave problema sanitario en nuestra sociedad. Según datos del Observatorio Español sobre Drogas (OED), en 2003 las sustancias psicoactivas de abuso más extendidas en la población española fueron el alcohol y el tabaco. Entre las drogas de comercio ilegal las sustancias más extendidas son los derivados cannábicos, la cocaína y el éxtasis, con prevalencias de consumo en los últimos 12 meses que superan el 1% (11,3% cánnabis, 2,7% cocaína y 1,4% éxtasis).

El resto de las drogas de comercio ilegal están menos extendidas, con prevalencias de consumo en los últimos 12 meses que se sitúan entre el 0,6 y el 0,8% para speed/anfetaminas y alucinógenos, y por debajo del 0,2% para la heroína, la cocaína base o *crack*, e inhalantes volátiles. Mención a parte merece el consumo de hipnosedantes sin receta médica cuya prevalencia en los 12 últimos meses fue de un 3,1%, sólo superado por el alcohol, el tabaco y el cánnabis [75].

El uso y el abuso de las drogas tienen importantes consecuencias negativas en la población. Estas sustancias pueden constituir la causa directa de la muerte de un individuo, o estar relacionada con la misma. Víctimas de muertes asociadas a crímenes violentos, a accidentes de tráfico, etc., estaban bajo el efecto de estas sustancias. El uso y el abuso de las drogas en el lugar de trabajo, en la conducción de vehículos o como sustancias dopantes también supone un importante riesgo para la comunidad [6].

Estos hechos hacen necesario y de gran utilidad disponer en el laboratorio de toxicología forense, de métodos de detección sensibles y específicos de las principales drogas de abuso en las distintas matrices biológicas. En nuestro medio, exceptuando el cánnabis, éstas son la cocaína, los opiáceos y las anfetaminas, concretamente la MDMA o éxtasis.

La MDMA o éxtasis es la tercera droga ilegal más consumida en nuestro país [75]. Su consumo se produce en determinados grupos de población, habitualmente adolescentes y jóvenes, y en circunstancias concretas, como situaciones de ocio o discotecas [77]. El resto de las anfetaminas más comunes (MDA, MDEA, MBDB, PMA, anfetamina y metanfetamina), son normalmente vendidas en el mercado ilegal como supuesto éxtasis.

En los últimos años se ha observado una tendencia creciente en el policonsumo de estas sustancias ilegales, siendo frecuente la asociación de

cocaína y derivados anfetamínicos [75]. Los opiáceos, aunque su consumo está disminuyendo, son un tipo de sustancia de abuso todavía presente en nuestro entorno, que también aparecen asociadas al fenómeno del policonsumo.

Investigaciones previas sobre los derivados anfetamínicos han sido realizadas en la elaboración de la Tesina de Licenciatura “Determinación de derivados anfetamínicos mediante cromatografía líquida de alta resolución” en Noviembre de 2002, y en la elaboración del Trabajo de Investigación Tutelado “Aplicación de la CLAR a la determinación de éxtasis y derivados” en Julio de 2004. Estos trabajos describen los métodos para la determinación de MDMA, MDA, MDEA y MBDB en plasma, orina, sangre y saliva mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia.

Las matrices biológicas estudiadas en este trabajo han sido el plasma, la orina, la sangre y el hígado. El plasma y la sangre son las muestras en que mejor se correlacionan los niveles hallados con el efecto farmacológico y tóxico, indicando si el individuo se encontraba bajo la influencia de una determinada sustancia. Son las muestras de elección para cuantificar e interpretar las concentraciones de las drogas y de sus metabolitos [6]. En el caso de la sangre postmortem esta interpretación ha de realizarse con cautela, ya que los niveles hallados no tienen porque corresponderse con los niveles en sangre en el momento de la muerte. El fenómeno de redistribución postmortem y la posible degradación de las sustancias, así como la aparición de compuestos interferentes, ha de tenerse en cuenta.

La orina es la matriz más frecuentemente utilizada en los métodos de cribado con inmunoensayos, debido a que en esta matriz las drogas se encuentran normalmente en concentraciones elevadas. Su gran inconveniente es que los niveles hallados no se correlacionan con los efectos farmacológicos. En el caso de las anfetaminas y derivados son frecuentes los falso positivos en los inmunoensayos, especialmente en las orinas postmortem, debido a la presencia de aminos originadas en el proceso de putrefacción. Esto implica, que sea indispensable la aplicación de un método de confirmación específico y rápido.

El hígado constituye una muestra postmortem bastante común, que suele presentar altos niveles de las sustancias. Puede actuar como órgano

reservorio en el fenómeno de redistribución postmortem, por lo que conocer los niveles hallados en el mismo puede ayudarnos a realizar una correcta interpretación de los niveles sanguíneos. Desde el punto de vista analítico es una matriz extremadamente compleja, con gran cantidad de posibles sustancias interferentes. El desarrollo de métodos lo más sencillos posibles, con el menor grado de manipulación de la muestra, así como sensibles y específicos, es de gran importancia.

La técnica analítica elegida para la elaboración de esta Tesis Doctoral ha sido la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas, LC-MS y LC-MS/MS. La cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas es una técnica sensible y específica, de cada vez mayor importancia en diversos campos, como la Toxicología Forense. Esto viene reflejado en el creciente número de publicaciones científicas que aplican LC-MS. La cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas es una técnica superior a la cromatografía de líquidos con cualquier otro detector, en términos de sensibilidad, especificidad, precisión y exactitud. En comparación con la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, considerada el *gold standard* de los noventa, presenta una serie de importantes ventajas, ya que se puede aplicar en la detección de un mayor número de compuestos, y no es necesario realizar procesos de derivatización, como ocurre en el caso de las anfetaminas y derivados por cromatografía de gases.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, los **objetivos** de la presente tesis doctoral han sido:

1. Elaboración de un método de determinación de la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la MDMA, la MDEA, la MBDB, la morfina, la 6-monoacetilmorfina, la cocaína y la benzoilecgonina en el plasma mediante LC-MS. Durante el desarrollo de este trabajo, se decidió integrar en el método de determinación en plasma de las anfetaminas, a la cocaína y su principal metabolito (benzoilecgonina), y a los opiáceos (morfina y 6-monoacetilmorfina), debido al habitual consumo conjunto de este tipo de sustancias.
2. Elaboración de un método de determinación de la anfetamina, la metanfetamina, la PMA, la MDA, la MDMA, la MDEA y la MBDB, en la sangre y en el hígado mediante LC-MS, y en la orina mediante LC-MS/MS, el cual fue

desarrollado durante mi estancia en la Delegación en Lisboa del Instituto Nacional de Medicina Legal.

3. Aplicación de estos métodos a muestras reales, prestando especial atención a los hallazgos en los casos de muertes por accidentes de tráfico.
4. Aplicación de estos métodos en los casos de muertes relacionadas con el consumo de las anfetaminas y derivados, e interpretar los niveles hallados en las muestras postmortem (sangre cardíaca, sangre periférica, orina y tejidos).

VI. PARTE EXPERIMENTAL

1. MATERIAL Y MÉTODOS

1.1. Instrumentación

1.1.1. Sistema de cromatografía líquida

El sistema de cromatografía líquida de alta resolución utilizado ha sido el Waters Alliance 2795 Separation Module, constituido por una bomba cuaternaria, un sistema desgasificador de membrana, un inyector automático con capacidad de refrigeración de hasta 4°C y un sistema independiente de lavado de la aguja de inyección. El sistema cromatográfico estaba provisto de un horno de columna Waters Alliance Series Column Heater/Cooler.

Las columnas cromatográficas empleadas han sido Atlantis dC18 3µm 2.1x100mm y Atlantis dC18 3µm 2.1x20mm *Intelligent SpeedTM column*.

1.1.2. Espectrómetro de masas

Los espectrómetros de masas utilizados han sido el espectrómetro de masas ZMD 2000 y el espectrómetro de masas en tandem Quattro MicroTM, ambos de Micromass (Waters Corporation).

El espectrómetro de masas sencillo utilizado ha sido el espectrómetro de masas ZMD 2000 de Micromass (Waters Corporation), cuyo analizador de masas es un cuadrupolo (fig. 43). El modo de ionización utilizado ha sido el electrospray en modo positivo (ESI+). El gas de nebulización y desolvatación usado ha sido el nitrógeno (N₂). La bomba de jeringa para perfusión continua empleada ha sido la Harvard Apparatus Pump II.

El espectrómetro de masas en tandem empleado ha sido el espectrómetro de masas Quattro MicroTM API ESCI de Micromass (Waters Corporation), cuyos analizadores de masas son dos cuadrupolos en tandem (fig. 44). El modo de ionización utilizado ha sido el electrospray en modo positivo (ESI+). El gas de nebulización y desolvatación usado fue el N₂, y el gas de la célula de colisión fue el argón.

Ambos espectrómetros utilizaron como bomba rotatoria de vacío una bomba Edwards E2M28.



Figura 43. Fotografía del LC-MS utilizado en la elaboración de este trabajo. La figura muestra el cromatógrafo de líquidos Waters Alliance 2795 Separation Module (izquierda) y el espectrómetro de masas ZMD 2000 (derecha).



Figura 44. Fotografía de un equipo LC-MS/MS semejante al utilizado en la elaboración de este trabajo. La figura muestra el espectrómetro de masas Quattro Micro™ (izquierda), el cromatógrafo de líquidos Waters Alliance 2795 Separation Module (centro) y el PC del equipo (derecha).

1.1.3. Soporte informático

El sistema informático empleado en el equipo LC-MS ha sido un ordenador Compaq Professional Workstation AP 2000 con sistema operativo Windows NT. El software de manejo y comunicación del sistema LC-MS ha sido el MassLynx NT 3.5 (Micromass, Waters Corporation). El software de cuantificación ha sido el QuanLynx 3.5 (Micromass, Waters Corporation).

El sistema informático empleado en el equipo LC-MS/MS ha sido un ordenador IBM Think Centre con sistema operativo Windows XP. El software de manejo y comunicación del sistema LC-MS/MS ha sido el MassLynx NT 4.0 (Micromass, Waters Corporation). El software de cuantificación ha sido el QuanLynx 4.0 (Micromass, Waters Corporation).

1.1.4. Instrumentación para la preparación y extracción de muestras

- Sistema homogeneizador de tejidos Ultra Turrax T8 S8N – 8G (IKA).
- Sistema automático de extracción en fase sólida Aspec XL (Gilson).
- Dispensador automático SOCOREX 1-10 mL.
- Pipetas automáticas Gilson y Eppendorf.
- Vortex Reax control (Heidolph).
- Agitador rotativo Orbit 12 rpm (Selecta).
- Centrífuga de sobremesa Minispin plus (Eppendorf).
- Centrífuga de sobremesa Mixtasel (Selecta).
- Termostato de bloque metálico para 24 tubos, con suministro múltiple de N₂ VLM EC1.

1.1.5. Otra instrumentación

- Balanza analítica digital BP61S (Sartorius).
- Phmetro digital Basic 20 (Crison).
- Agitador magnético HI 190M (Hamma Instruments).
- Sistema de purificación del agua Milli-Q (Millipore).

1.2. Material de laboratorio

- Tubos de vidrio de fondo redondo de 12 mL (Pyrex).
- Tubos de vidrio de fondo cónico de 10 mL (Kimble).
- Tubos de ensayo de fondo redondo 12x50 mm.

- Tubos de ensayo de fondo redondo 12x75 mm.
- Botes de cristal ámbar de 8 mL para el almacenamiento de disoluciones patrón.
- Viales de polipropileno 12x32 mm 300µL con tapa Screw Cap Lectra Bond PTFE/Silicone.
- Matraces aforados de 100, 250 y 500 mL.
- Probetas de 500 mL.
- Vasos de precipitados.
- Pipetas Pasteur.

1.3. Reactivos

- Agua Milli-Q.
- Acetonitrilo para LC-MS (Riedel-de-Haën) y de grado gradiente (Merck).
- Metanol grado gradiente (Merck).
- Ácido fórmico 98-100% para análisis (Merck).
- Formiato amónico (Fluka).
- Éter dietílico Multisolvant® (Scharlau).
- Hidróxido sódico (NaOH) para análisis (Merck).
- Ácido clorhídrico (HCl) 25% para análisis (Merck).
- Hidróxido amónico (NH₄OH) 25 % para análisis (Merck).
- Ácido acético (H₃CCOOH) glacial para análisis (Merck).
- Ácido bórico (H₃BO₃) para análisis (Merck).
- Cloruro potásico (KCl) para análisis (Merck).
- Plasma, sangre, orina e hígado exentos de las sustancias estudiadas.
- Sustancias patrón (anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, PMA, morfina, 6-monoacetilmorfina, benzoilecgonina, cocaína, metanfetamina-d₅, MDMA-d₅, MBDB-d₅, benzoilecgonina-d₃ y cocaína-d₃), fueron adquiridos en forma sólida a Lipomed. La anfetamina-d₆ y la MDA-d₅ fueron adquiridos como disolución metabólica (1 mg/mL) a Cerilliant.

1.4. Preparación de tampones y soluciones

- Tampón Borato pH 9: se pesaron 6.2 g de H₃BO₃ y 7.5 g de KCl. En un matraz aforado de 1L se añadieron los dos sólidos y 420 mL de NaOH 0.1 N

(2g de NaOH en 500 mL de agua), enrasando hasta 1 L con agua. Se comprobó el pH, y cuando fue necesario, se ajustó con NaOH o HCl diluidos.

- NaOH 1 N: se disolvieron 4 g de NaOH en agua, y se procedió a enrasar en un matraz aforado de 100 mL.

- Solución MeOH:HCl (99:1): se midieron 9.9 mL de metanol, a los que se añadió 100 µL de HCl al 25%.

- Tampón Formiato Amónico pH 3: en un matraz aforado de 1 L, se añadieron 2 mL de Formiato amónico 1 M (3,153 g de formiato amónico en 50 mL de agua) y 1 mL de ácido fórmico. Se procedió a enrasar a 1 L con agua Milli-Q.

1.5. Preparación de las disoluciones madre

A partir de las sustancias patrón en estado sólido, se prepararon las denominadas soluciones madre. En la balanza analítica se pesaron 5 mg del patrón, que se disolvieron en 5 mL de metanol, en el caso de la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la MDMA, la MDEA, la MBDB, la PMA, la morfina, la benzoilecgonina, la metanfetamina-d₅, la MDMA-d₅, la MBDB-d₅ y la benzoilecgonina-d₃, o de acetonitrilo, en el caso de la 6-monoacetilmorfina, la cocaína y la cocaína-d₃, resultando una disolución madre de 1 mg/mL. Esta disolución madre era almacenada a -20°C y protegida de la luz.

1.6. Preparación de las disoluciones de trabajo

Las disoluciones de trabajo se realizaron a partir de las disoluciones madre de los compuestos o de las ampollas comerciales, diluyéndolas en metanol. Se realizaron disoluciones separadas de los compuestos sin deuterar, que serían utilizadas para la elaboración de las rectas de calibrado y de los controles, y por otro lado de los deuterados, que serían utilizados como patrones internos.

Las disoluciones de trabajo para el método de determinación de drogas básicas en plasma han sido preparadas a 1, 0.2, 0.04 y 0.008 µg/mL. La disolución de patrones internos fue una mezcla de MDMA-d₅, MBDB-d₅ y benzoilecgonina-d₃ a 1 µg/mL y cocaína-d₃ a 0.5 µg/mL.

Las disoluciones de trabajo para el método de determinación de siete anfetaminas en sangre han sido preparadas a 2.5, 0.5, 0.1 y 0.02 µg/mL. La

disolución de patrones internos fue una mezcla de metanfetamina-d₅, MDMA-d₅ y MBDB-d₅ a 0.5 µg/mL.

Las disoluciones de trabajo para el método de determinación de siete anfetaminas en orina han sido preparadas a 10, 1, 0.1 y 0.01 µg/mL. La disolución de patrones internos fue una mezcla de anfetamina-d₆, MDA-d₅, MDMA-d₅ y MBDB-d₅ a 1 µg/mL.

Finalmente, en el caso del método de determinación de siete anfetaminas en hígado, las disoluciones de trabajo han sido preparadas a 10, 2, 0.4 y 0.08 µg/mL. La disolución de patrones internos es una mezcla de metanfetamina-d₅, MDMA-d₅ y MBDB-d₅ a 2 µg/mL.

1.7. Condiciones de la cromatografía líquida de alta resolución

La separación cromatográfica fue realizada en todos los casos en fase reversa. Después de ensayar distintas columnas C₁₈ (SymmetryShield, XTerraMS, XTerraRP), la que ofreció los mejores resultados fue la Atlantis dC18, de tamaño de partícula 3 µm, y de diámetro interno 2.1 mm. Este diámetro interno permite la utilización de flujos compatibles con ESI, sin necesidad de realizar splitless. En relación a la longitud de la columna, para todos los métodos desarrollados, excepto para el de la determinación de siete anfetaminas en orina, ha sido de 100 mm. En el caso del método de la determinación de siete anfetaminas en orina, ha sido utilizada una columna de longitud 20 mm. Este tipo de columnas, denominadas *Intelligent SpeedTM*, permiten desarrollar métodos cromatográficos muy rápidos, sin menoscabar la resolución y la calidad de los picos.

El tipo de relleno de las columnas Atlantis favorece la retención de compuestos polares, sin hacerlo excesivamente con los no polares. Permite además trabajar con fases móviles de alto contenido acuoso, sin que se “colapse” la columna.

En todos los métodos desarrollados, la columna de separación cromatográfica ha sido termostatzada a 26°C, o bien a 22°C.

La fase móvil utilizada ha sido una mezcla de tampón formiato amónico 2mM a pH 3 y de acetonitrilo, trabajando en modo gradiente o isocrático.

Los gradientes utilizados en los distintos métodos aparecen reflejados en las tablas 14-16. En el método de determinación de las siete anfetaminas en

sangre, se trabajó en modo isocrático (85% de tampón formiato a pH 3 y 15% de Acetonitrilo), a un flujo de 0.2 mL/min y a una temperatura de columna de 22°C.

Tabla 14. Gradiente utilizado en el método de determinación de drogas básicas en plasma. La columna empleada fue Atlantis dC18, 3µm, 2.1x100mm, a una temperatura de 26°C.

Tiempo (minutos)	% Formiato amónico pH 3	% Acetonitrilo	Flujo (mL/min)	Curva
0	95	5	0.2	1
1	95	5	0.2	1
10	50	50	0.2	6
11	50	50	0.2	1
12	95	5	0.2	6
17	95	5	0.2	1

Tabla 15. Gradiente utilizado en el método de determinación de siete anfetaminas en hígado. La columna empleada fue Atlantis dC18 3µm 2.1x100mm, a una temperatura de 26°C.

Tiempo (minutos)	% Formiato amónico pH 3	% Acetonitrilo	Flujo (mL/min)	Curva
0	90	10	0.2	1
1	90	10	0.2	1
10	50	50	0.2	6
12	10	90	0.2	6
12.5	10	90	0.2	1
13	90	10	0.2	6
18	90	10	0.2	1

Tabla 16. Gradiente utilizado en el método de determinación de siete anfetaminas en orina. La columna empleada fue Atlantis dC18, 3µm 2.1x20mm IS a una temperatura de 22°C.

Tiempo (minutos)	% Formiato amónico pH 3	% Acetonitrilo	Flujo (mL/min)	Curva
0	100	0	0.5	1
2	90	10	0.5	6
3.5	90	10	0.5	1
4.5	0	100	0.5	6
5	100	0	0.5	6
8	100	0	0.5	1

1.8. Condiciones del espectrómetro de masas

1.8.1. Condiciones del espectrómetro de masas ZMD 2000

Una parte importante de la parte experimental fue realizada utilizando el espectrómetro de masas simple ZMD 2000. El modo de trabajo ha sido electrospray en modo positivo (ESI+). Como se explicó en el capítulo IV, el ESI+ es un modo de ionización suave, que produce mayoritariamente la molécula protonada $[M+H]^+$. En el caso de un espectrómetro de masas simple, para originar fragmentos de la molécula y poder así confirmarla de manera inequívoca, es necesario realizar la fragmentación en la fuente, variando el valor del voltaje de cono (*In source-CID*). El modo de trabajo elegido del espectrómetro de masas ha sido el SIM (*Selected Ion Monitoring*).

Para cada una de las moléculas estudiadas se optimizó la molécula protonada $[M+H]^+$, y un fragmento de la misma obtenido mediante CID en la fuente. La optimización se llevó a cabo inyectando 5 μ L de una disolución pura de cada sustancia a 10 μ g/mL, directamente en el espectrómetro de masas sin realizar separación cromatográfica. Se realizó un *scan* entre 100 y 400 u.m.a, variando los voltajes de cono.

Las condiciones generales de la fuente ESI, la interfase y del analizador, fueron optimizadas para garantizar la correcta formación del spray, y la adecuada detección de las moléculas. La formación del spray depende del flujo de gas de desolvatación, voltaje del capilar y temperaturas del bloque y de desolvatación. El gas de cono evita la formación de aductos. Los parámetros óptimos fueron estudiados para todas las moléculas, eligiendo aquellos que implicaran una buena detección en todos los casos.

Los parámetros de la fuente ESI+ y de interfase elegidos fueron:

- Gas de desolvatación: 500 L/h
- Gas de cono: 50 L/h
- Voltaje del capilar: 3 KV
- Voltaje de cono: Variable V
- Voltaje del extractor: 3 V
- Radiofrecuencia RF de las lentes: 0.2
- Temperatura del bloque: 120°C

- Temperatura de la fuente: 300°C

Los parámetros seleccionados en el analizador fueron:

- Low mass resolution (LM): 14
- High mass resolution (HM): 14
- Ion Energy: 0.5
- Multiplicador: 650

1.8.2. Condiciones del espectrómetro de masas Quattro Micro™

El espectrómetro de masas Quattro Micro™ fue empleado en uno de los métodos desarrollados. Este espectrómetro de masas consiste en un triple cuadrupolo, es decir, dos analizadores cuadrupolo en tandem, y entre ellos, la célula de colisión. El modo de trabajo elegido fue, como en el caso anterior, el electrospray en modo positivo (ESI+). La ionización suave producida mediante ESI+, conduce principalmente a la formación de la molécula protonada $[M+H]^+$. Al tratarse de un MS/MS, la fragmentación de la molécula tendrá lugar en la célula de colisión. El modo de trabajo elegido del espectrómetro de masas fue MRM (*Multiple Reaction Monitoring*).

Para cada una de las moléculas fueron seleccionadas dos transiciones, es decir, dos iones hijos procedentes del mismo padre. La optimización de las moléculas se realizó mediante una infusión continua en “T”, de una disolución de cada molécula a una concentración de 10 µg/mL, tal y como muestra el esquema (fig. 45).

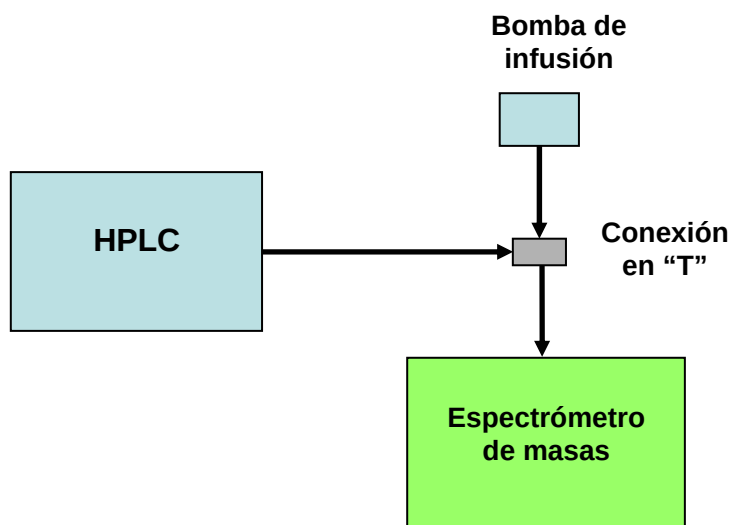


Figura 45. Representación esquemática del método de infusión continua en “T”.

Las condiciones generales de la fuente ESI, la interfase y de los analizadores, fueron optimizadas para garantizar la correcta formación del spray, así como la adecuada detección de las moléculas. La formación del spray depende del flujo de gas de desolvatación, voltaje del capilar y temperaturas del bloque y de desolvatación. El gas de cono evita la formación de aductos. Los parámetros óptimos fueron estudiados para todas las moléculas, eligiendo aquellos que implicaran una buena detección en todos los casos.

Los parámetros de la fuente ESI+ y de interfase elegidos fueron:

- Gas de desolvatación: 800 L/h
- Gas de cono: 0 L/h
- Voltaje del capilar: 3 KV
- Voltaje de cono: Variable V
- Voltaje del extractor: 2 V
- Radiofrecuencia RF de las lentes: 0.1
- Temperatura del bloque: 130°C
- Temperatura de la fuente: 400°C

Los parámetros seleccionados en los analizadores y en la célula de colisión fueron:

- Low mass resolution 1 (LM 1): 14
- High mass resolution 1 (HM 1): 14
- Ion Energy: 0.1
- Entrada célula de colisión: 2
- Energía de colisión: Variable
- Salida célula de colisión: 2
- Low mass resolution 2 (LM 2): 14
- High mass resolution 2 (HM 2): 14
- Ion Energy: 2
- Multiplicador: 650 V
- Presión del gas en la célula de colisión: 3.5×10^{-3} mbar

1.9. Recepción y preparación de las muestras

Las muestras que llegan al laboratorio de Toxicología son adecuadamente identificadas y almacenadas a 4°C si el análisis va a realizarse en los 15 días siguientes. Si no es así, las muestras son almacenadas a -18°C hasta su análisis.

Las muestras de sangre postmortem suelen estar parcialmente coaguladas, lo cual puede implicar problemas desde el punto de vista analítico. Los coágulos presentes en estas muestras de sangre impiden pipetear adecuadamente, y en el caso de realizar una extracción en fase sólida, provocan el colapso de las columnas de extracción. Para evitar esto, centrifugamos a 14500 rpm durante 10 minutos una alícuota de aproximadamente 1 mL de sangre, y recogemos el sobrenadante. De esta manera, la preparación de las muestras de sangre coagulada consiste en una centrifugación a altas revoluciones por minuto (rpm).

En el caso de las muestras de órganos la preparación previa de la muestra es más compleja. A partir de un órgano sólido, debemos obtener un homogeneizado del tejido, de consistencia líquida, que pueda ser sometido a los procesos de extracción habituales. En este caso, la homogeneización del tejido se realizó con ayuda de un aparato de dispersión UltraTurrax T8 (IKA). El procedimiento seguido fue el siguiente: en un tubo de polipropileno se pesaba 1g de tejido previamente cortado en trozos pequeños. A continuación se añade 3 mL de agua, y se tritura con ayuda de la UltraTurrax T8, durante 1 minuto a distintas velocidades (5000, 15000 y 25000 L/min). El homogeneizado resultante se centrifugaba a 4000 rpm durante 10 minutos. Un mL del sobrenadante (equivalente a 0.25g de tejido) se somete al proceso de extracción.



Figura 46. Fotografías de la centrífuga Minispin (izquierda) y del homogeneizador de tejidos UltraTurrax T8 (derecha), utilizados en la elaboración de este trabajo.

1.10. Métodos de extracción aplicados a las muestras biológicas

1.10.1. Extracción de drogas básicas de muestras de plasma

La extracción de las drogas básicas y sus metabolitos (morfina, 6-monoacetilmorfina, anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, benzoilecgonina y cocaína) fue realizada mediante un proceso de extracción en fase sólida con cartuchos OASIS HLB 3cc 60mg.

A 200 μ L de plasma se le añaden 25 μ L de una mezcla de los patrones internos (MDMA- d_5 , MBDB- d_5 y benzoilecgonina- d_3 a 1 μ g/mL, y cocaína- d_3 a 0.5 μ g/mL), y se acondiciona a pH básico añadiendo 1 mL de tampón borato a pH 9. Este acondicionamiento a pH básico de las muestras, permite que las drogas se encuentren principalmente en su forma no ionizada, favoreciendo así la retención de las mismas en el relleno de las columnas de extracción.

Las columnas fueron acondicionadas con 2 mL de metanol y 2 mL de agua. A continuación se procede a la carga la muestra, preparada tal y como se indicó anteriormente. El primer lavado fue realizado con 2 mL de una mezcla de agua: metanol (95:5, v/v), y el segundo con 2 mL de una mezcla agua: metanol: NH_4OH (80:18:2, v/v). Los cartuchos fueron secados durante 6 minutos mediante una corriente de nitrógeno, antes de realizar la elución de los analitos con 2 mL de metanol: ácido acético (98:2, v/v).

Los extractos fueron evaporados a seco a 40°C bajo una suave corriente de nitrógeno. El extracto seco fue reconstituido nuevamente en 100 µL de fase móvil (tampón formiato pH 3: acetonitrilo, 95:5), de los que 20µL fueron inyectados en el sistema cromatográfico.

El proceso de extracción en fase sólida fue realizado con un sistema de extracción automático ASPEC XL (Gilson), que aparece reflejado en la figura 47.



Figura 47. Fotografía del sistema automático de extracción en fase sólida ASPEC XL (Gilson).

1.10.2. Extracción de las anfetaminas de muestras de sangre, orina e hígado

La extracción de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB y PMA de muestras de sangre, orina e hígado se realizó mediante una simple extracción líquido-líquido.

A 0.5 mL de sangre y de orina, y a 1 mL de homogeneizado de hígado, se añadió el mismo volumen de una disolución de NaOH 1N y la correspondiente cantidad de la mezcla de patrones internos. En el caso de la sangre se añadió 50 µL de una mezcla de metanfetamina-d₅, MDMA-d₅ y MBDB-d₅ a 0.5 µg/mL; para la orina 50 µL de una mezcla de anfetamina-d₆,

MDA-d₅, MDMA-d₅ y MBDB-d₅ a 1 µg/mL, y para el homogeneizado de hígado 50 µL de una mezcla de metanfetamina-d₅, MDMA-d₅ y MBDB-d₅ a 2 µg/mL.

A las muestras así preparadas se añadieron 3 mL, para la sangre y la orina, o 5 mL, para el homogeneizado de hígado, de dietiléter. Con ayuda de un rotor se agitó durante 15 minutos, y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos.

Se recogió la fase orgánica (capa superior) en tubos cónicos, que fue evaporada a seco a 40°C bajo una suave corriente de nitrógeno. Antes de evaporar se añadieron 100 µL de la solución metanol: HCl (99:1, v/v), previniendo así la evaporación de los compuestos anfetamínicos.

El extracto seco fue reconstituido en 100 µL de fase móvil, de los que 20 µL (sangre e hígado) o 10 µL (orina) fueron inyectados en el sistema cromatográfico.

1.11. Validación de los métodos analíticos

La validación de un método analítico incluye todos los procedimientos necesarios para demostrar que el procedimiento analítico destinado a la determinación cuantitativa de un analito (o una serie de analitos), en una matriz biológica particular, es fiable para la aplicación buscada [413].

La fiabilidad de los hallazgos analíticos es de gran importancia en Toxicología Forense y Clínica, siendo un prerrequisito para realizar una correcta interpretación toxicológica de los mismos, puesto que en los casos judiciales, las consecuencias jurídicas dependerán de los valores detectados, y en los casos clínicos, los valores encontrados condicionarán el tratamiento del paciente [414]. Actualmente, cualquier estudio realizado basándose en un método no validado correctamente, carece de valor científico [415].

Los ensayos necesarios para validar correctamente un método bioanalítico, así como la terminología que debe ser utilizada, ha sido motivo de discusión desde los años noventa. Organismos como la estadounidense FDA (*Food and Drug Administration*) [416], y la internacional ICH (*International Conference Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) [417, 418] han establecido definiciones de los términos utilizados, así como los aspectos metodológicos y prácticos. Una completa revisión de los parámetros de validación ha sido realizada por Shah

et al. [413] y por Peters y Maurer [414]. Los criterios recomendados en estas revisiones, así como los establecidos por los organismos estadounidenses e internacionales, han sido utilizados en la elaboración de este trabajo.

Los parámetros estudiados han sido: la especificidad o selectividad, el modelo de calibración (linealidad), la precisión intradía e interdía, la exactitud intradía e interdía, los límites (límite de detección, límite inferior de cuantificación y límite superior de cuantificación), el rendimiento, el efecto matriz, la intensidad relativa de iones y la estabilidad.

1.11.1. Especificidad (Selectividad)

La especificidad o selectividad de un método analítico se define como la capacidad del método para distinguir y cuantificar el analito en presencia de otros componentes de la muestra.

La evaluación de la selectividad se realizó analizando plasma, sangre, orina e hígado, procedentes de nueve sujetos diferentes que no habían consumido las sustancias estudiadas (muestras blanco), y se comprobó que no existían interferencias con el método analítico.

Las interferencias pueden deberse a componentes endógenos presentes en las matrices biológicas, o a otras drogas o fármacos consumidas por el individuo. En las muestras postmortem el número de posibles interferentes aumenta considerablemente, debido a los fenómenos de autólisis y putrefacción.

1.11.2. Modelo de calibración (Linealidad)

La relación entre la concentración del analito en la muestra y la respuesta dada por el detector viene definida por la curva de calibración. La curva de calibración debe ser elaborada en la misma matriz que la muestra a cuantificar, y el rango de concentraciones debe incluir a la concentración estudiada.

Normalmente la relación concentración/respuesta sigue un modelo lineal. Otros modelos posibles son, por ejemplo, el cuadrático y el cúbico, aunque son más complejos y menos robustos.

En un modelo lineal la recta de calibrado ($y = A + Bx$) ha de ser elaborada con al menos de 5 a 8 niveles de concentración distintos. En los

modelos no lineales (cuadrático, cúbico), es necesario realizar un mayor número de niveles. En el modelo lineal, A es el punto de corte en el eje de ordenadas, y B la pendiente de la recta.

El modelo estadístico elegido normalmente para calcular la regresión lineal es el modelo de los mínimos cuadrados. Este modelo es aplicable a datos homocedásticos, es decir, que la varianza a lo largo del rango de calibración sea constante. En el caso de datos heterocedásticos (varianza variable a lo largo del rango), éstos deben ser matemáticamente transformados o ponderados, para poder aplicar el modelo de los mínimos cuadrados. Las ponderaciones más habituales son $1/x$ y $1/x^2$. La elección del modelo apropiado para nuestros datos fue realizado mediante un examen visual de la curva de calibrado, y un estudio de las residuales obtenidas aplicando el modelo. Las residuales se expresan normalmente en porcentaje, y se definen como la diferencia existente entre nuestro valor y el predicho por el modelo. Si el modelo es adecuado han de ser inferiores a un $\pm 15\%$.

Un parámetro que nos indica la calidad del ajuste de los puntos a una recta, es el coeficiente de determinación (r^2), cuyos valores oscilan entre 0 (no ajuste) y 1 (ajuste total); de tal modo que cuánto más se acerque a 1 dicho parámetro, más se aproximará la distribución de los puntos a una recta.

El estudio del modelo de calibración y la linealidad fueron realizados con los soportes informáticos QuanLynx V3.5 y QuanLynx V4.0.

1.11.3. Precisión

Según la ICH [417, 418], la precisión de un método analítico es la proximidad entre los valores obtenidos en una serie de medidas de muestras procedentes de la misma muestra madre, y analizadas bajo las mismas condiciones. La precisión fue estudiada a dos niveles:

- **Precisión intradía o repetibilidad:** es la precisión del método entre varias muestras obtenidas en el mismo proceso analítico.
- **Precisión interdía:** es la precisión del método dentro del laboratorio variando el día de análisis, el analista, etc.

La precisión debe evaluarse analizando, al menos, 5 replicados de una concentración el mismo día de análisis (precisión intradía) o en días distintos

(precisión interdía). Debe estudiarse la precisión, como mínimo, a tres niveles diferentes de concentración de la recta de calibrado (bajo, medio y alto).

La precisión suele medirse en términos de imprecisión, expresada como coeficiente de variación. El coeficiente de variación (CV) de los replicados debe ser menor de un 15%. En el caso de que el nivel estudiado sea el límite de cuantificación, se admite que el CV sea menor de un 20%.

El coeficiente de variación (CV) es la expresión en porcentaje de la desviación estándar (SD), que mide la variabilidad entre una serie de valores.

1.11.4. Exactitud

La exactitud de un método analítico nos indica en qué medida los valores medidos se diferencian del valor de referencia (valor verdadero o teórico). Al igual que la precisión, la exactitud puede ser medida a dos niveles, es decir, la exactitud intradía y la exactitud interdía.

La exactitud debe evaluarse analizando, al menos, 5 replicados de una concentración el mismo día (exactitud intradía) o en días distintos (exactitud interdía), para tres niveles de concentración (bajo, medio y alto).

La exactitud suele medirse en términos de inexactitud. La medida matemática es el denominado error medio relativo (MRE), que viene dado por la expresión:

$$\text{MRE} = \frac{(\text{MediaConcentracionesMedidas} - \text{ValorTeórico}) \times 100}{\text{ValorTeórico}}$$

El error medio relativo debe ser menor de un $\pm 15\%$, excepto en el caso de que el nivel estudiado sea el límite de cuantificación, dónde se admite que el error medio relativo sea menor de un $\pm 20\%$.

1.11.5. Límites

1.11.5.1. Límite de detección

El límite de detección de un método analítico (LOD) se define como la mínima cantidad del analito que presenta una relación señal/ruido (S/N) mayor de 3.

1.11.5.2. Límites de cuantificación

El **límite inferior de cuantificación** de un método analítico (*lower limit of quantitation*, LLOQ) se define como la menor cantidad de analito que puede ser medida con una imprecisión y una inexactitud menor del 20%. Normalmente su valor coincide con el del nivel más bajo de la recta de calibrado.

El **límite superior de cuantificación** de un método analítico (*upper limit of quantitation*, ULOQ) se define como la máxima cantidad de analito que puede ser medida con una imprecisión y una inexactitud menor del 15%. Normalmente su valor coincide con el nivel más alto de la recta de calibrado.

1.11.6. Rendimiento

El rendimiento o recuperación de un procedimiento analítico mide la eficacia del proceso de extracción. El rendimiento se calcula comparando la señal de replicados de la muestra blanco a los que se añadió una determinada cantidad de analito antes de la extracción, con la señal dada por otros replicados de muestra blanco a los que se les añadió esa determinada cantidad de analito después de realizar la extracción. Estas últimas muestras serían las correspondientes a un hipotético rendimiento del 100%.

El porcentaje de rendimiento se calcularía como: $\text{Rendimiento} = A \times 100 / P$, siendo A la media de los valores medidos de los replicados de muestra a los que se les añadió antes de la extracción una determinada cantidad del analito, y P la media de los valores medidos de los replicados de muestra a los que se les añadió posteriormente.

En el cálculo del rendimiento se utilizaron 5 replicados. Se consideraron adecuados valores del rendimiento de extracción superiores a un 50%.

1.11.7. Efecto matriz

Un aspecto muy importante en la validación de un método analítico realizado mediante LC-MS es el denominado efecto matriz. El efecto matriz se define como la alteración en la eficacia de ionización en presencia de sustancias que coeluyen con el analito de interés. El electrospray es la técnica de ionización más afectada por este fenómeno. El efecto matriz puede provocar la disminución de la señal del analito (comúnmente llamado supresión iónica), o

puede aumentar la señal del mismo (llamado aumento iónico), de tal modo que la eficiencia de la ionización depende en gran medida de la matriz de la que se trate. El fenómeno de supresión iónica es más común que el de aumento [419].

El efecto matriz es además compuesto-dependiente, viéndose más afectados por la supresión iónica los compuestos más polares que los menos polares. Así, en el caso de métodos que cuantifiquen analitos de distintas polaridades, es necesario utilizar múltiples patrones internos [420].

La precisión y exactitud de un método analítico pueden verse comprometidas debido al efecto matriz, así como el límite de detección y el límite inferior de cuantificación.

La existencia de efecto matriz puede estudiarse de dos maneras: por el método de la adición postextracción y por el método de la infusión postcolumna.

El método de la adición postextracción consiste en comparar la respuesta de las muestras blanco, a las que posteriormente a la extracción se les añadió un determinada cantidad del analito, con la respuestas dadas por soluciones preparadas en fase móvil que contienen la misma cantidad del analito. La diferencia entre estas respuestas multiplicada por 100, y dividida por la respuesta de la solución pura, nos indica el % del grado de efecto matriz que sufre el analito en esas condiciones [421-425]. Esta técnica sólo aporta información a cerca el efecto matriz existente en el punto de elución del analito de interés.

El otro método de determinación del efecto matriz es el método de la infusión postcolumna. Este método nos informa del efecto matriz existente a lo largo de todo el cromatograma. El método de infusión postcolumna se lleva a cabo inyectando muestras biológicas blanco, previamente extraídas, al tiempo que se hace una infusión post-columna de la sustancia a evaluar mediante una conexión en "T" [426-430], tal y como indica la figura 48.

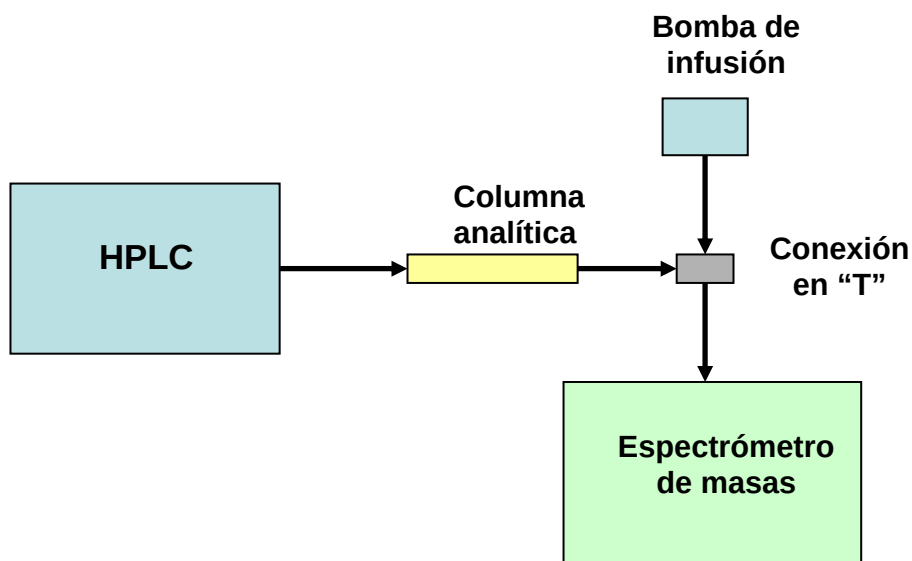


Figura 48. Representación esquemática del método de infusión postcolumna.

En la realización de este trabajo se han utilizado ambos métodos de determinación del efecto matriz.

1.11.8. Intensidad relativa de los iones

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas es una técnica altamente específica. Los criterios de identificación de un compuesto son su tiempo de retención, la presencia de dos iones o de dos transiciones características del mismo, y que la relación de las intensidades de los iones o de las transiciones obtenidas para este compuesto estén dentro de la tolerancia permitida [431].

Como acabamos de indicar, los iones detectados mediante espectrometría de masas, o las transiciones en MS-MS para un determinado compuesto en las condiciones estudiadas, deben guardar una determinada relación. Esta relación se expresa en forma de la denominada intensidad relativa, que es el porcentaje de la intensidad de la señal del ión cuantificación, o del pico base (intensidad de confirmación $\times 100$ / intensidad del ión de cuantificación). La desviación permitida será distinta en función del valor de esta intensidad relativa (tabla 17).

Tabla 17. Tabla de las máximas desviaciones toleradas de las intensidades relativas de iones para asegurar una correcta identificación [432].

Intensidad relativa (% del pico de base)	Desviación permitida
> 50%	± 20%
> 20-50%	± 25%
> 10-20%	± 30%
≤ 10%	± 50%

1.11.9. Estabilidad

La estabilidad de un analito depende de la matriz en la que se encuentre, del tiempo y de las condiciones de almacenamiento (temperatura, tipo de recipiente, tipo de anticoagulante, etc.).

En los laboratorios de Toxicología Forense el intervalo de tiempo desde la toma de muestra hasta la realización del análisis puede ser de varios días, o incluso de varios años. Además, debe de tenerse en cuenta, que es frecuente que las muestras sean sometidas a ciclos de congelación y de descongelación si es necesario repetir el análisis.

En este estudio la estabilidad de las sustancias fue evaluada después de varios ciclos de congelación/descongelación. Fueron realizados tres ciclos a dos concentraciones (5 ng/mL y 50 ng/mL), por triplicado, en el método de determinación de drogas básicas en plasma, y para la de determinación de los derivados anfetamínicos en sangre y orina. Los ciclos consistieron en mantener las muestras congeladas durante 48 horas, descongelarlas durante 2 horas, manteniéndolas a la temperatura del laboratorio, y volver a congelarlas, y así tres veces. Tras el último ciclo, se extrajeron e inyectaron las muestras del estudio de estabilidad, junto con las muestras de una recta de calibrado preparada ese mismo día.

Fueron preparados 2 mL de plasma a 5 y 50 ng/mL para la morfina, 6-MAM, benzoilecgonina, cocaína, anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA y MBDB, y 5 mL de sangre y orina a 5 y 50 ng/mL para la anfetamina, metanfetamina, PMA, MDA, MDMA, MDEA y MBDB. Estas muestras fueron almacenadas en tubos de polipropileno de 10 mL.

1.11.10. Aplicación a casos reales

Los métodos desarrollados han sido aplicados a casos reales del Instituto Universitario de Medicina Legal de Santiago de Compostela (IUML) y de la Delegación en Lisboa del Instituto Nacional de Medicina Legal.

La cuantificación de estas muestras se realizó con rectas de calibrado extraídas e inyectadas el mismo día que las muestras correspondientes. En el caso de muestras a concentraciones superiores al límite superior de cuantificación (ULOQ), fueron diluidas convenientemente con muestra blanco, y nuevamente analizadas. En el caso de las muestras de hígado, la dilución del homogeneizado se realizó con homogeneizado de hígado blanco.

1.11.10.1. Aplicación a casos reales del Instituto Universitario de Medicina Legal de Santiago de Compostela

El método de determinación de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, morfina, 6-monoacetilmorfina, cocaína y benzoilecgonina en plasma fue integrado plenamente en la rutina del laboratorio, como método de confirmación y de cuantificación de los casos presumiblemente positivos. Cuando se dispuso de una muestra de orina, se realizó un cribado previo mediante el enzimoimmunoensayo COBAS, de tal modo que si el cribado era positivo para alguna de las drogas estudiadas, se realizó la confirmación y cuantificación en la muestra de plasma o sangre. Si el cribado daba un resultado negativo, no se realizaban más estudios. Si no se disponía de una muestra de orina para realizar el cribado previo, se analizaba directamente la muestra de plasma recibida.

El método ha sido aplicado a los casos clínicos y forenses remitidos al Servicio de Toxicología del Instituto desde enero del año 2005 hasta junio del 2006 (208 casos), presumiblemente positivos. Este método también ha sido aplicado a los casos de muertes en accidentes de tráfico remitidos al servicio desde enero del año 2004 hasta junio de 2006 (237 casos).

1.11.10.2. Aplicación a casos reales de la Delegación en Lisboa del Instituto Nacional de Medicina Legal

Los métodos desarrollados para la detección de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB y PMA en sangre, orina e hígado,

fueron aplicados a todos los casos positivos a anfetaminas que llegaron al Servicio de Toxicología de la Delegación en Lisboa del Instituto Nacional de Medicina Legal, entre 2003 y 2005. Un total de 16 casos fueron analizados. La recogida de estos casos se realizó durante mi estancia en este laboratorio.

En el Servicio de Toxicología de la Delegación en Lisboa, el cribado inicial de las muestras de orina fue realizado mediante el inmunoensayo Syva® Rapid Test d.a.u.® (Dade Behring). La confirmación y cuantificación se realizó en las muestras de sangre correspondientes, mediante GC-MS, siguiendo los protocolos descritos en el laboratorio.

En la elaboración de esta Tesis, la determinación de los derivados anfetamínicos en sangre, orina e hígado, se realizó según los métodos descritos. Para la determinación de estas sustancias en riñón, se siguió el mismo procedimiento que el descrito para el hígado, y la cuantificación se realizó con una recta elaborada en riñón, pero una validación completa en esta matriz biológica no fue realizada. En el caso del estómago o del contenido gástrico, el valor cuantitativo reflejado se obtuvo por una aproximación hecha en base a la señal dada por su patrón interno, por lo que debemos considerarlo como un resultado semicuantitativo.

2. RESULTADOS

2.1. Condiciones del espectrómetro de masas

2.1.1. Condiciones del espectrómetro de masas simple ZMD 2000

Las moléculas estudiadas fueron optimizadas siguiendo las indicaciones explicadas anteriormente (en el apartado correspondiente de Material y Métodos). Los espectros obtenidos para cada una de las moléculas a diferentes voltajes de cono, así como las estructuras químicas de las moléculas protonadas y sus fragmentos, aparecen reflejados en las figuras 49-57. En el caso de la morfina y de la 6-monoacetilmorfina no se detalla su fragmentación (fig. 58), debido a que es muy compleja y se originan múltiples fragmentos. La protonación de estas dos moléculas ocurre, al igual que en el resto de los casos, a nivel de la amina terciaria.

Los espectros de masas obtenidos para los derivados deuterados de las moléculas están recogidos en las figuras 59-63. La disposición de los deuterios en el patrón interno elegido es un factor muy importante a tener en cuenta. Los fragmentos obtenidos de la molécula deuterada deben ser distintos de los fragmentos obtenidos de la molécula sin deutar, para evitar interferencias a nivel del ión de confirmación. Lo ideal es que los fragmentos de la molécula deuterada sigan manteniendo deuterios que los diferencien en dos o más u.m.a. (unidad de masa atómica) de los fragmentos de la molécula sin deutar. Esto ocurre en el caso de todos los derivados deuterados utilizados. La morfina- d_3 y $-d_6$, y la 6-monoacetilmorfina- d_3 y $-d_6$, fueron ensayados y desechados como patrones internos debido a que presentan los mismos fragmentos que sus respectivos compuestos sin deutar. Esto es así, ya que en la fragmentación se pierde la parte de la molécula que está deuterada (deuterios de los carbonos adyacentes al grupo amino).

Debido a que el modo de trabajo que se utilizó en el método analítico fue el modo SIM (*Selected Ion Monitoring*), la optimización de las moléculas consistió en la elección de dos iones, la molécula protonada $[M+H]^+$ y un fragmento característico del compuesto estudiado, a partir de los espectros obtenidos. La molécula protonada $[M+H]^+$ fue utilizada como el ión de cuantificación, y el fragmento como el ión de confirmación. La molécula

protonada fue utilizada como ión de cuantificación ya que en las condiciones de ionización suave ESI+, suele ser el ión más abundante. En el caso de los derivados deuterados, la molécula protonada fue el único ión elegido.

Anfetamina
PM = 135.21

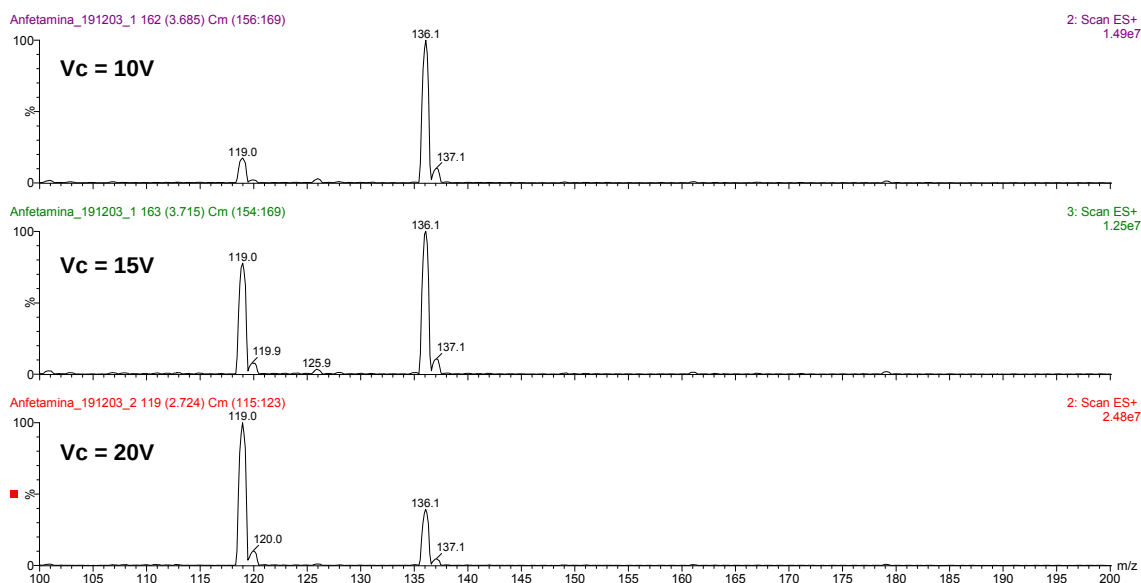
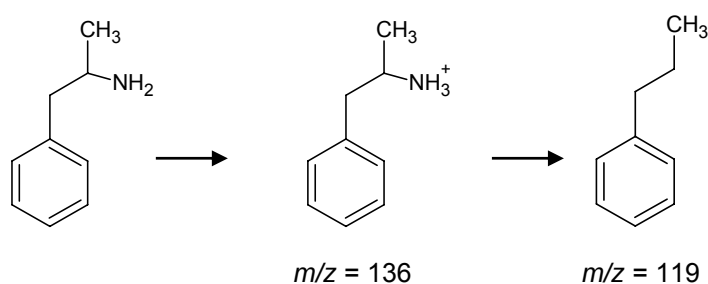


Figura 49. En la parte superior de la figura aparecen representadas las estructuras químicas de la anfetamina, de la anfetamina protonada y del fragmento de confirmación elegido. En la parte inferior de la figura aparecen representados los espectros de masas de la anfetamina obtenidos aplicando distintos voltajes de cono ($V_c = 10V$, $V_c = 15V$ y $V_c = 20V$).

Metanfetamina PM = 149.24

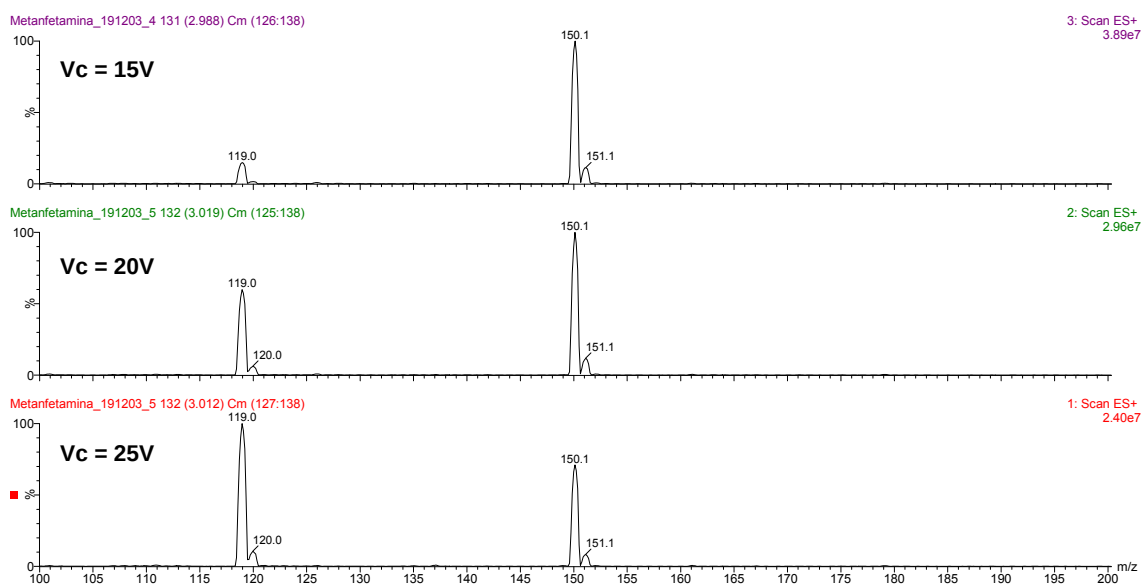
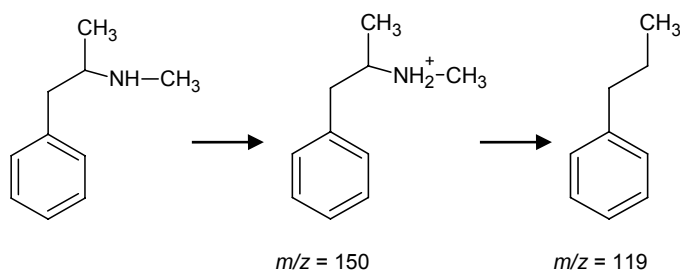


Figura 50. En la parte superior de la figura aparecen representadas las estructuras químicas de la metanfetamina, de la metanfetamina protonada y del fragmento de confirmación elegido. En la parte inferior de la figura aparecen representados los espectros de masas de la metanfetamina obtenidos aplicando distintos voltajes de cono ($V_c = 15V$, $V_c = 20V$ y $V_c = 25V$).

MDA
PM = 179.22

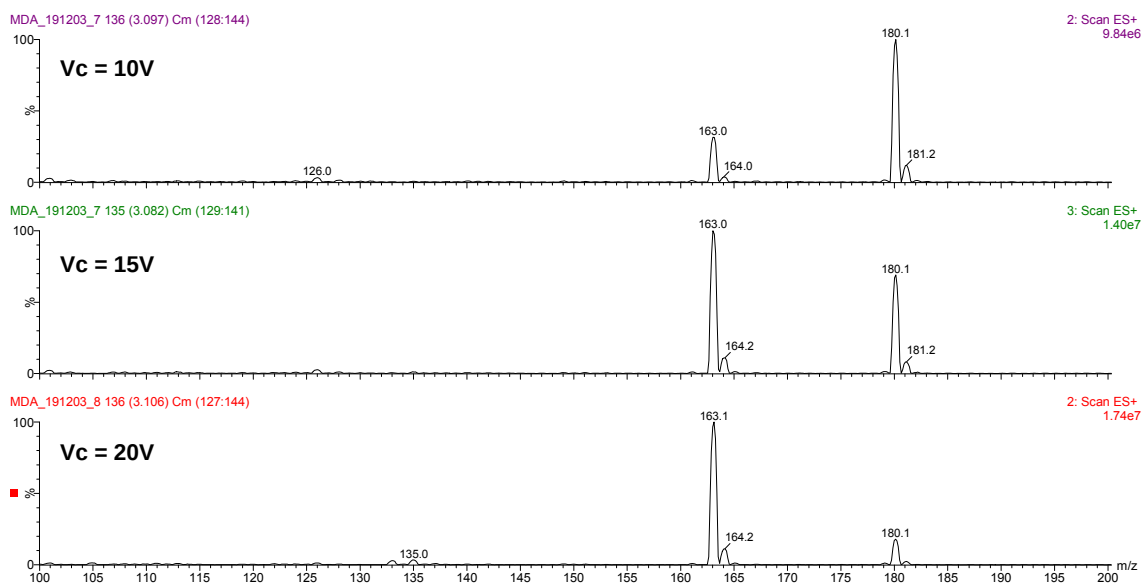
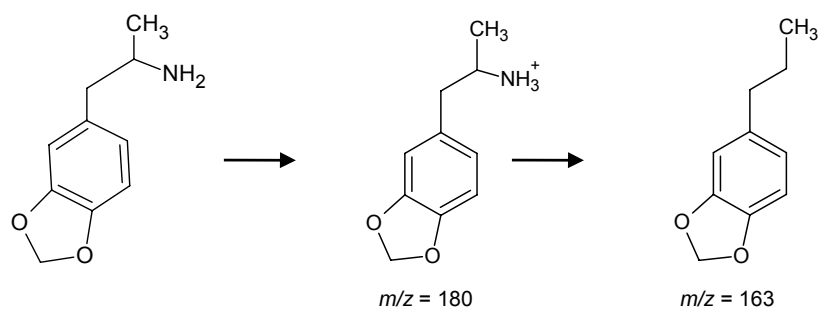


Figura 51. En la parte superior de la figura aparecen representadas las estructuras químicas de la MDA, de la MDA protonada y del fragmento de confirmación elegido. En la parte inferior de la figura aparecen representados los espectros de masas de la MDA obtenidos aplicando distintos voltajes de cono ($V_c = 10V$, $V_c = 15V$ y $V_c = 20V$).

MDMA
PM = 193.25

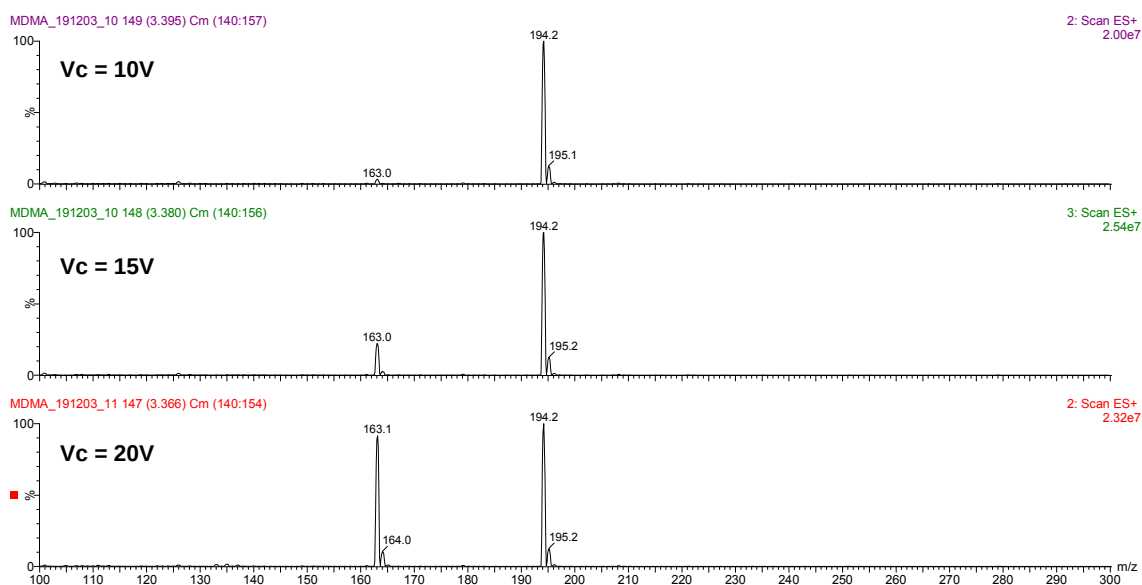
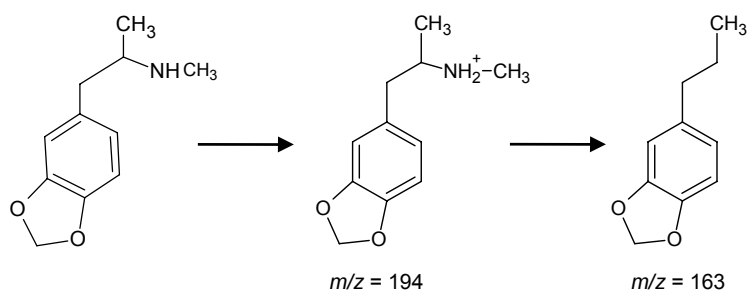


Figura 52. En la parte superior de la figura aparecen representadas las estructuras químicas de la MDMA, de la MDMA protonada y del fragmento de confirmación elegido. En la parte inferior de la figura aparecen representados los espectros de masas de la MDMA obtenidos aplicando distintos voltajes de cono ($V_c = 10V$, $V_c = 15V$ y $V_c = 20V$).

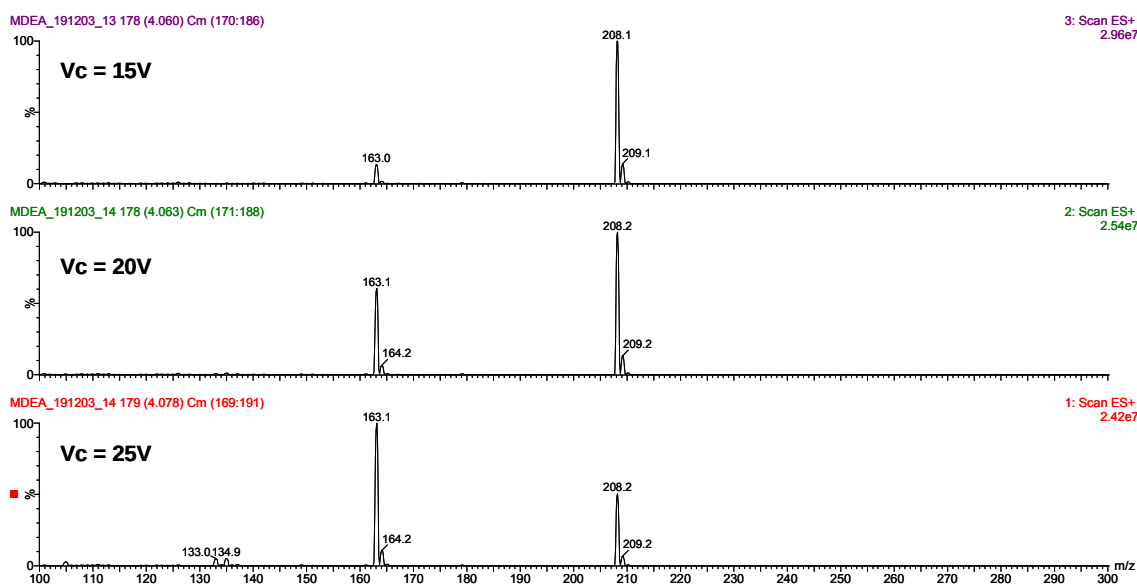
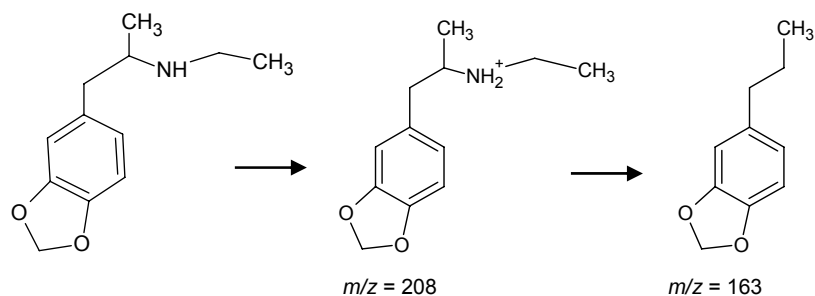
MDEA
PM = 207.27

Figura 53. En la parte superior de la figura aparecen representadas las estructuras químicas de la MDEA, de la MDEA protonada y del fragmento de confirmación elegido. En la parte inferior de la figura aparecen representados los espectros de masas de la MDEA obtenidos aplicando distintos voltajes de cono ($V_c = 15V$, $V_c = 20V$ y $V_c = 25V$).

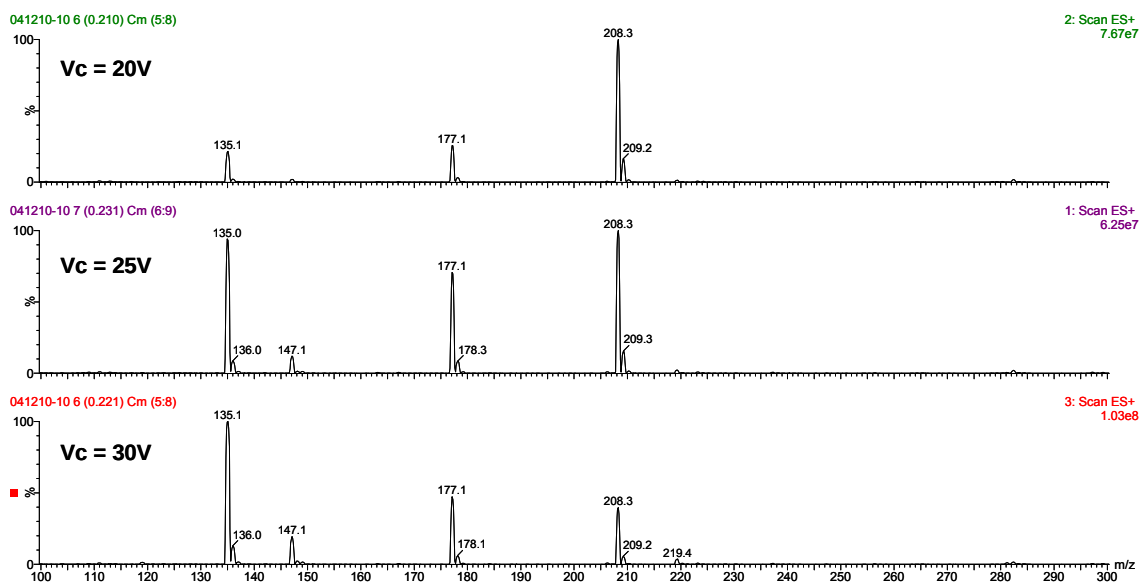
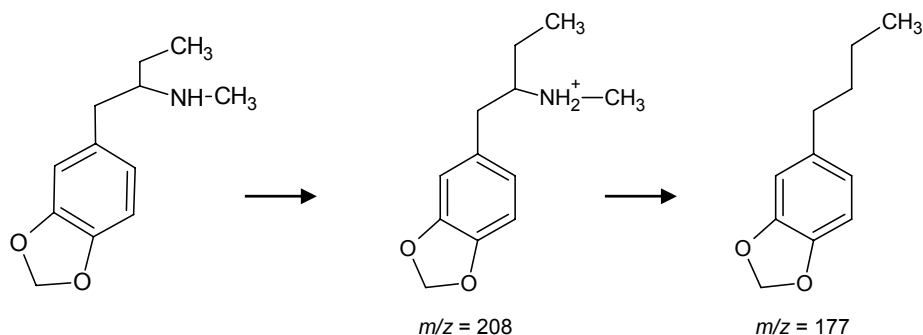
MBDB**PM = 207.27**

Figura 54. En la parte superior de la figura aparecen representadas las estructuras químicas de la MBDB, de la MBDB protonada y del fragmento de confirmación elegido. En la parte inferior de la figura aparecen representados los espectros de masas de la MBDB obtenidos aplicando distintos voltajes de cono ($V_c = 20V$, $V_c = 25V$ y $V_c = 30V$).

PMA
PM = 165.24

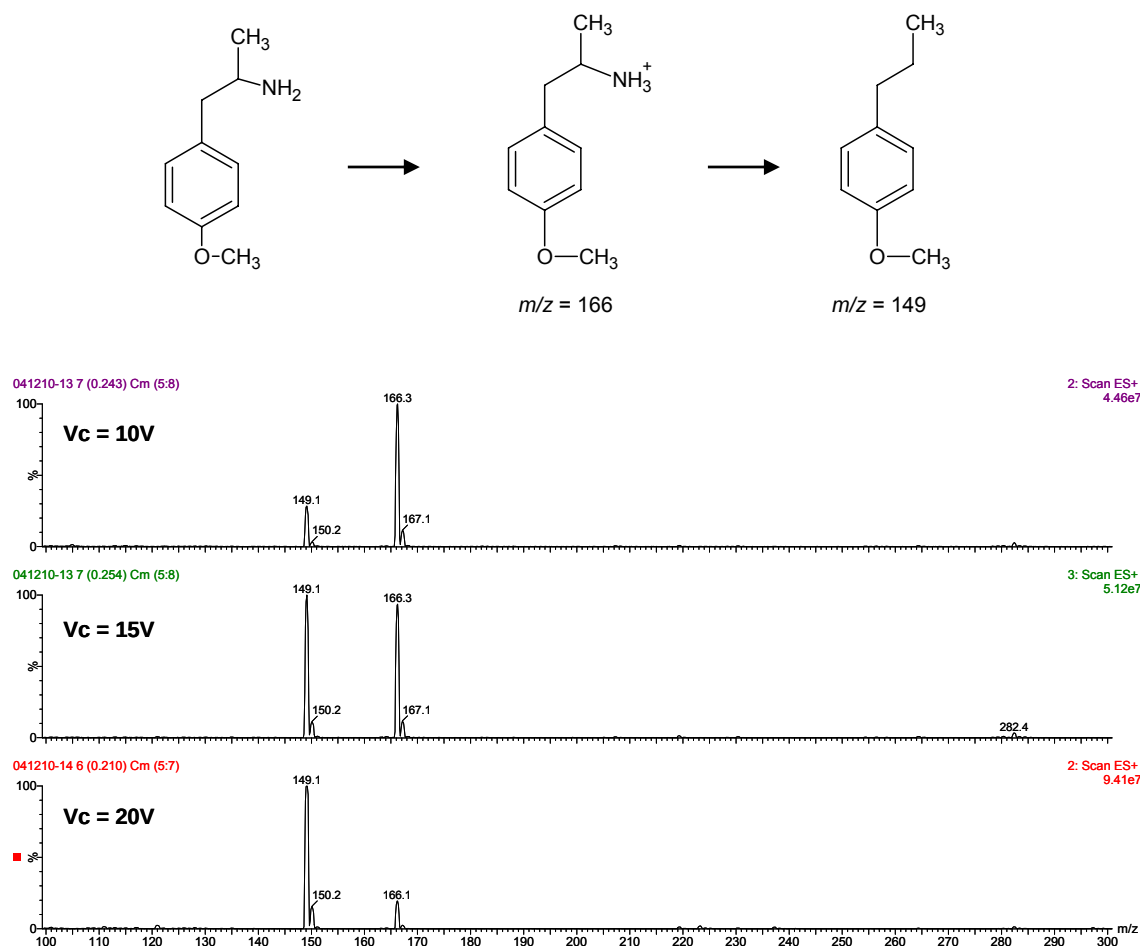


Figura 55. En la parte superior de la figura aparecen representadas las estructuras químicas de la PMA, de la PMA protonada y del fragmento de confirmación elegido. En la parte inferior de la figura aparecen representados los espectros de masas de la PMA obtenidos aplicando distintos voltajes de cono (Vc = 10V, Vc = 15V y Vc = 20V).

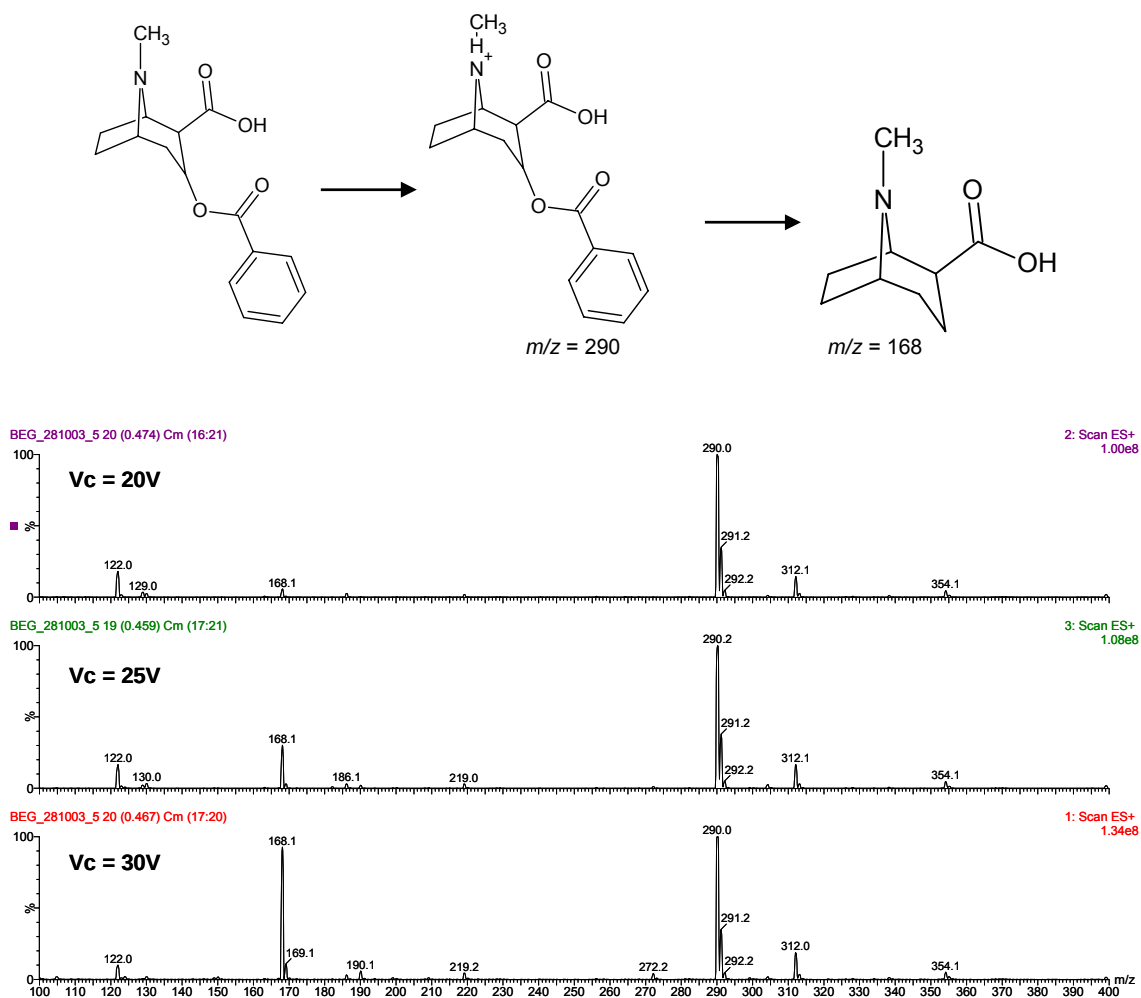
Benzoilecgonina**PM = 289.3**

Figura 56. En la parte superior de la figura aparecen representadas las estructuras químicas de la benzoilecgonina, de la benzoilecgonina protonada y del fragmento de confirmación elegido. En la parte inferior de la figura aparecen representados los espectros de masas de la benzoilecgonina obtenidos aplicando distintos voltajes de cono ($V_c = 20V$, $V_c = 25V$ y $V_c = 30V$).

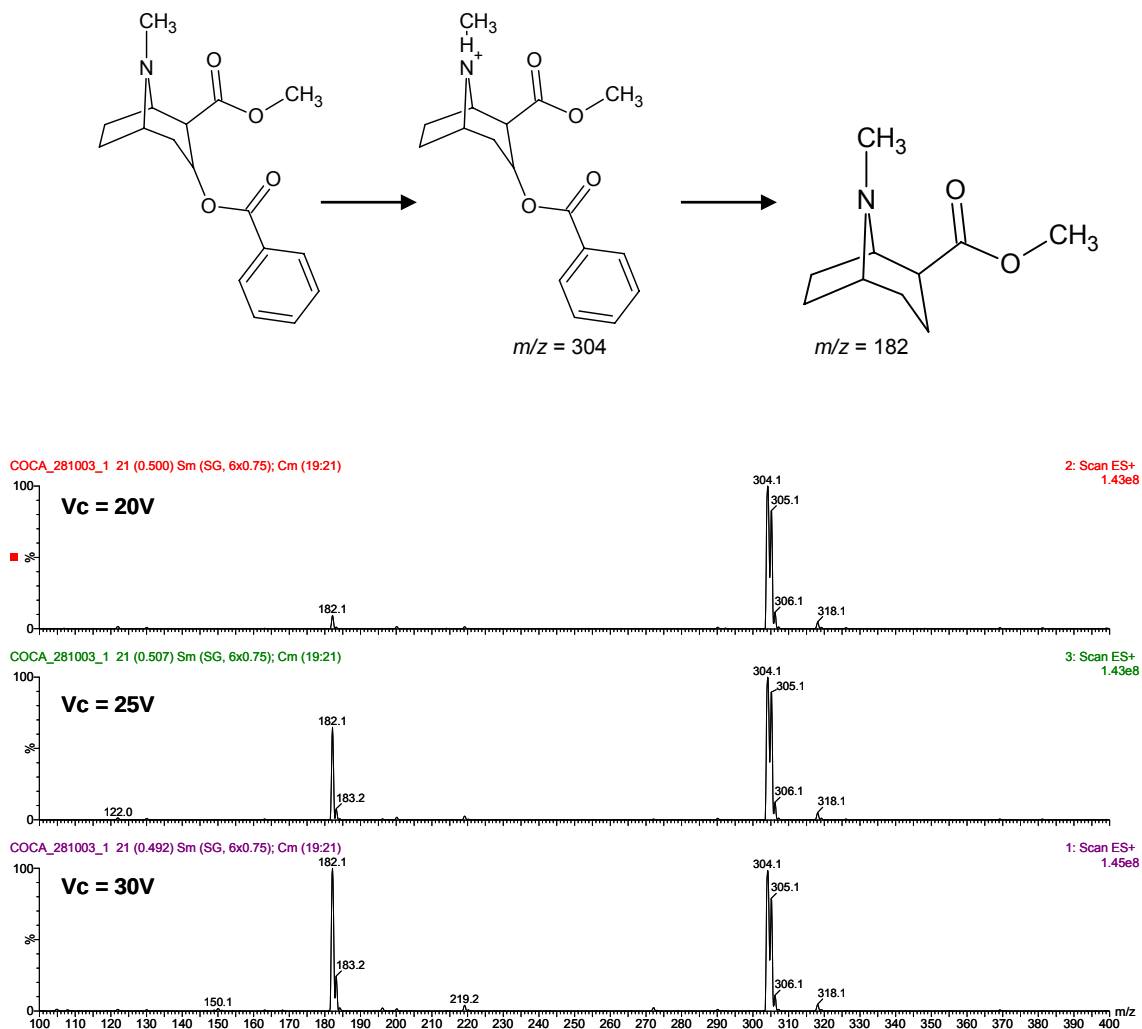
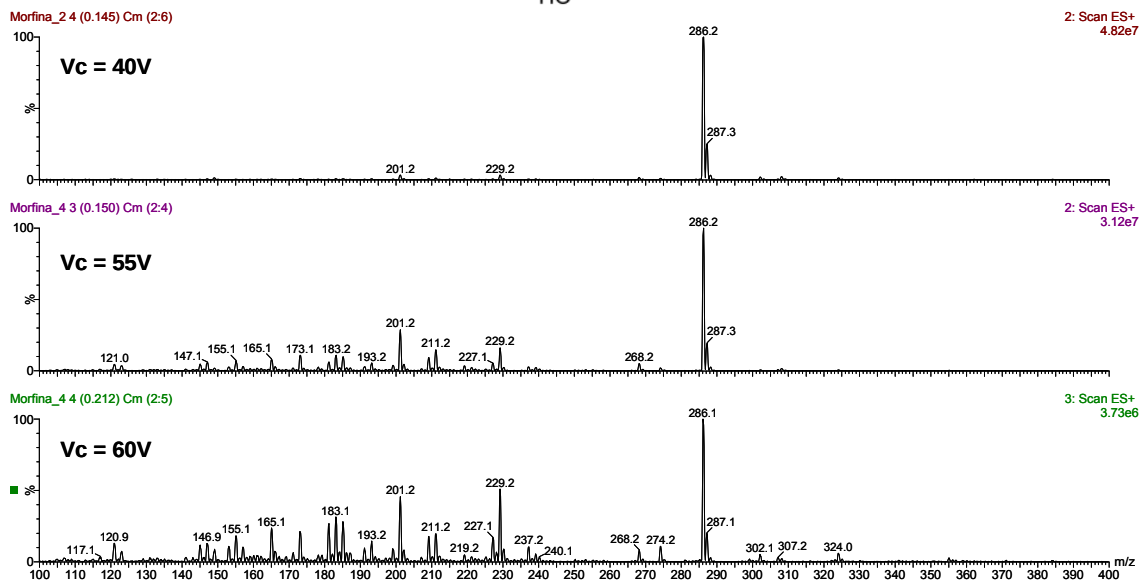
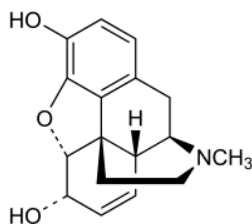
Cocaína
PM = 303.4

Figura 57. En la parte superior de la figura aparecen representadas las estructuras químicas de la cocaína, de la cocaína protonada y del fragmento de confirmación elegido. En la parte inferior de la figura aparecen representados los espectros de masas de la cocaína obtenidos aplicando distintos voltajes de cono ($V_c = 20V$, $V_c = 25V$ y $V_c = 30V$).

Morfina
PM = 285.14



6-Monoacetilmorfina
PM = 285.14

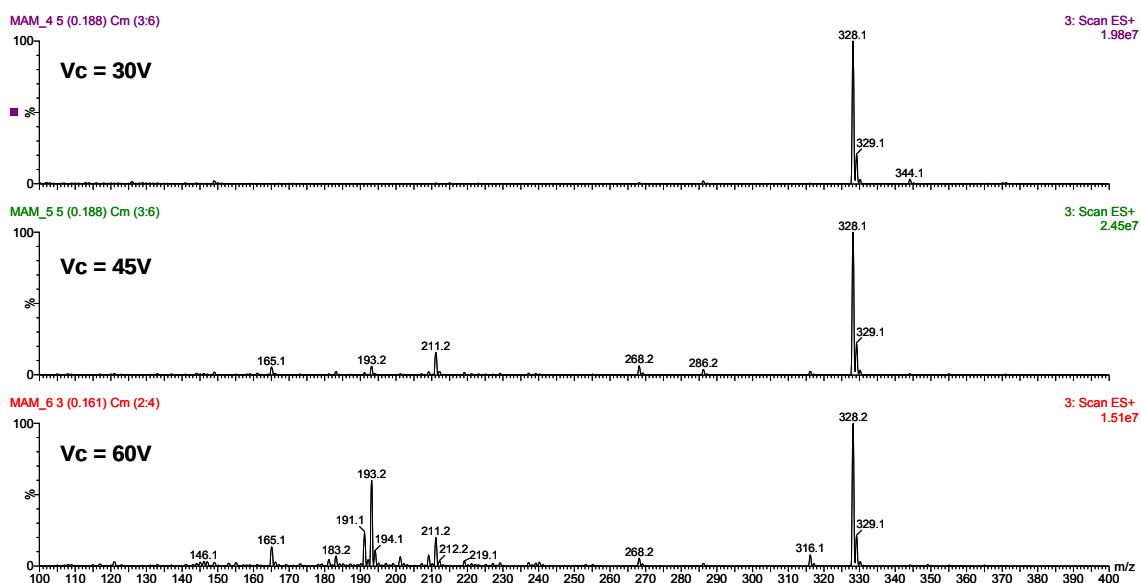
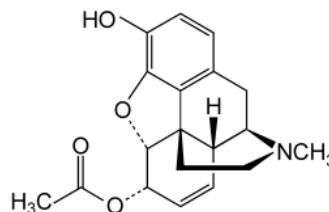


Figura 58. En la parte superior se recoge el espectro de masas de la morfina obtenido a distintos voltajes ($V_c = 40V$, $V_c = 55V$ y $V_c = 60V$), y su estructura química, y en la parte inferior el compuesto representado es el de la 6-monoacetilmorfina.

Metanfetamina-d₅
PM = 154.24

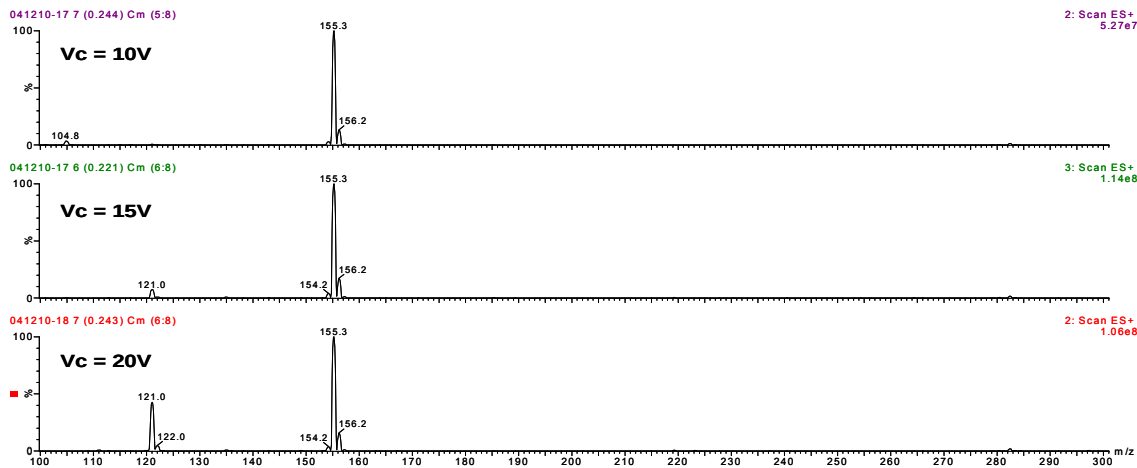
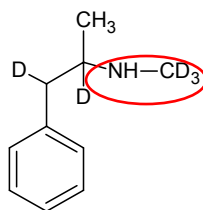


Figura 59. Estructura química y espectro de masas obtenido a distintos voltajes de la metanfetamina-d₅. En la estructura química enmarcada por de un círculo rojo, aparece indicado la parte de la molécula que se pierde en la fragmentación.

MDMA-d₅
PM = 198.25

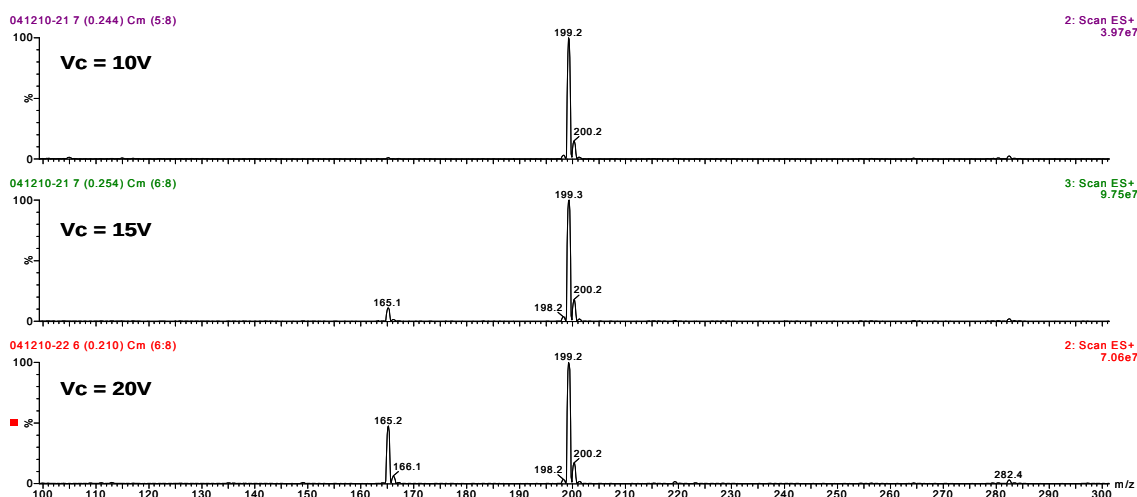
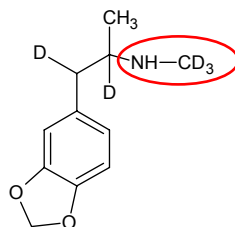


Figura 60. Estructura química y espectro de masas obtenido a distintos voltajes para la MDMA-d₅. En la estructura química enmarcada por un círculo rojo, aparece indicado la parte de la molécula que se pierde en la fragmentación.

MBDB-d₅
PM = 213.27

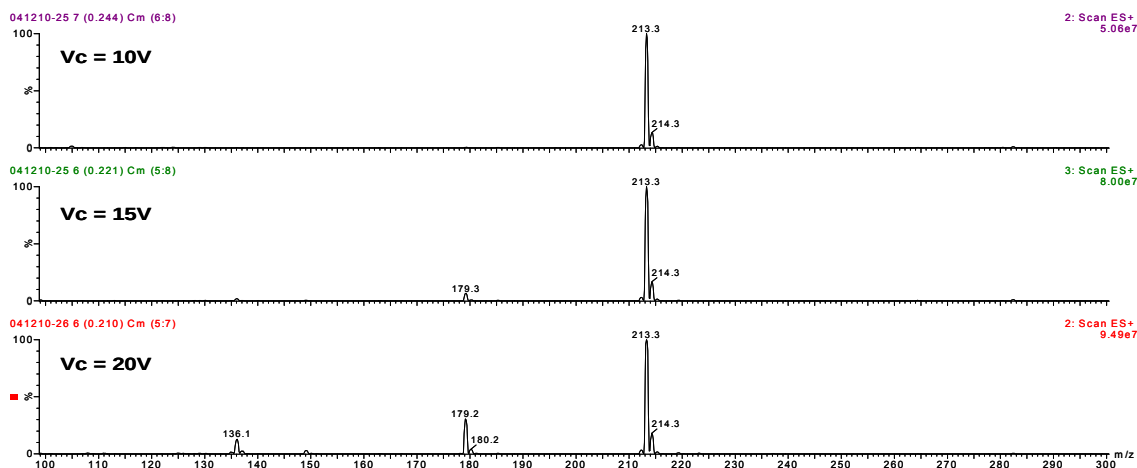
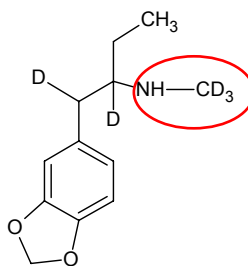


Figura 61. Estructura química y espectro de masas obtenido a distintos voltajes para la MBDB-d₅. En la estructura química enmarcado por un círculo rojo, aparece indicado la parte de la molécula que se pierde en la fragmentación.

Benzoilecgonina-d₃
PM = 292.3

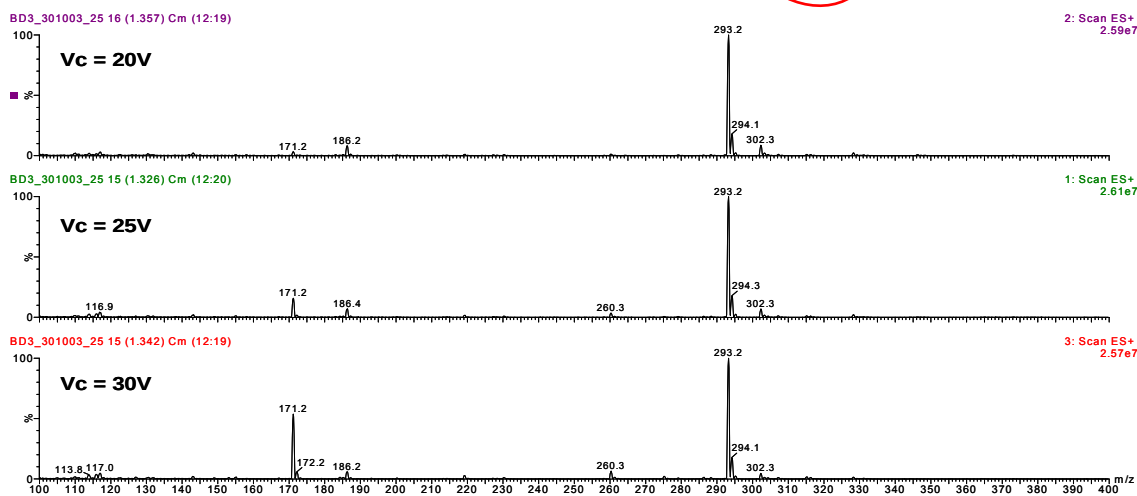
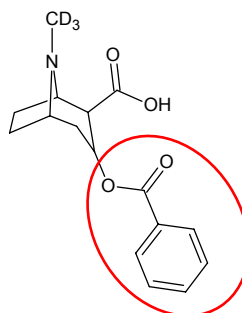


Figura 62. Estructura química y espectro de masas obtenido a distintos voltajes para la benzoilecgonina-d₃. En la estructura química enmarcada por un círculo rojo, aparece indicado la parte de la molécula que se pierde en la fragmentación.

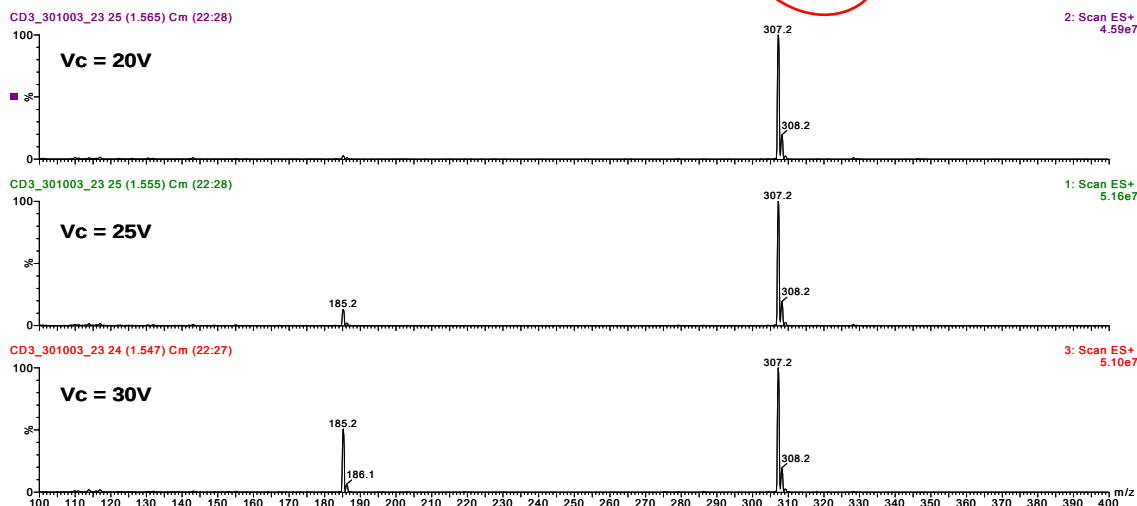
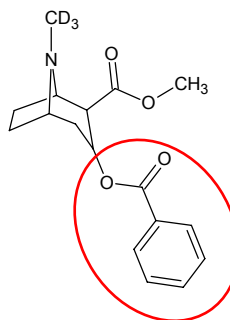
Cocaína-d₃
PM = 306.4

Figura 63. Estructura química y espectro de masas obtenido a distintos voltajes para la cocaína-d₃. En la estructura química enmarcado por un círculo rojo, aparece indicado la parte de la molécula que se pierde en la fragmentación.

A la hora de desarrollar un método de masas deben tenerse en cuenta conceptos como el “*dwell time*” y el “*inter-channel delay*”, que afectan a la sensibilidad, y al número de puntos por pico. Se entiende por *dwell time* el tiempo que el analizador está “mirando” una determinada *m/z*, de tal modo que al aumentar el *dwell time*, aumentamos la sensibilidad del método a esa *m/z*, ya que la está “mirando” durante más tiempo. El *inter-channel delay* es el tiempo que tarda el equipo en cambiar de *m/z* monitorizada, de manera que al aumentar su valor el equipo “enfoca” mejor la siguiente *m/z*. En un método de masas existen varias *m/z*, que el equipo debe barrer. Cada vez que hace un barrido, genera un punto del pico cromatográfico, y como mínimo un pico cromatográfico debe estar definido por nueve puntos. La velocidad de barrido de los equipos tiene un determinado valor, por lo que el método de masas SIM (*Selected Ion Monitoring*) deberá de tener un número de *m/z* tal que el equipo leyendo a su velocidad de barrido, los picos cromatográficos resultantes estén

definidos al menos por nueve puntos (nueve barridos durante el ancho del pico).

En el espectrómetro de masas ZMD el número máximo de m/z en un método de masas, con los valores límite de *dwell time* (0.1 s) y de *inter-channel delay* (0.05 s), es de aproximadamente diez. En los métodos desarrollados el número de m/z que se precisaban monitorizar era mayor que este valor. Para solucionar este problema, se dividió el método de masas en distintas funciones a lo largo del cromatograma, las cuales monitorizaban, en función del tiempo del cromatograma en el que nos encontráramos, distintas m/z . De esto se deduce que en el desarrollo de un método de LC-MS, más que la separación cromatográfica de los diferentes picos (como ocurre en HPLC-FD, HPLC-DAD, etc.), lo importante es separar grupos de compuestos que supongan como máximo la monitorización de diez m/z (fig. 64). Las tablas 18-20 recogen los distintos métodos de masas desarrollados en el espectrómetro de masas ZMD.

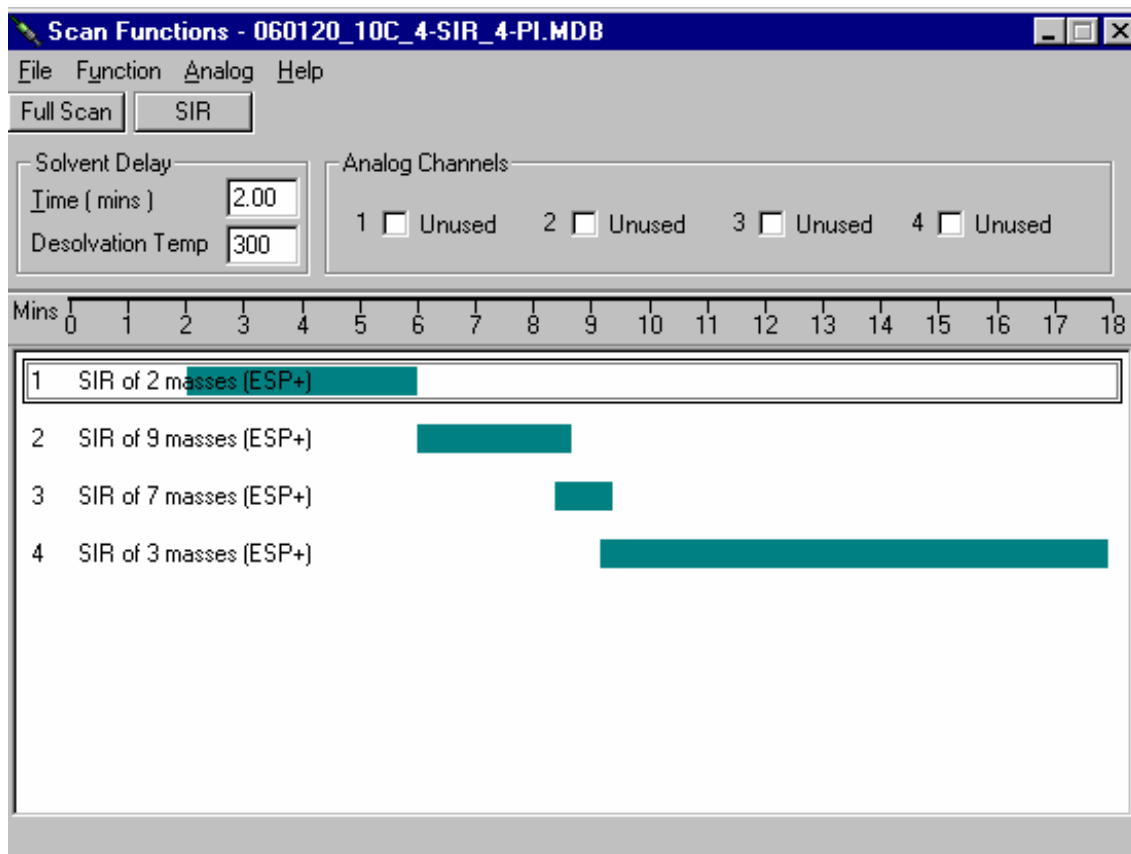


Figura 64. Ejemplo de método de masas del espectrómetro de masas ZMD, dividido en 4 funciones de masas a lo largo de los 18 minutos del método.

Tabla 18. Principales parámetros del espectrómetro de masas, el tiempo de retención y el patrón interno seleccionado en cada caso, en el método determinación de opiáceos, cocaína y anfetaminas en plasma.

Compuesto	Función SIR	Ventana detección funciones SIR (min)	m/z seleccionadas*	Voltaje de cono (V)	TR (min)	PI
Morfina	Función 1: SIR 2 m/z	2.0 – 5.0	286.0 201.0	40 55	3.7	Cocaína-d3
Anfetamina	Función 2:	5.0 – 8.2	136.1 119.0	15 20	7	MDMA-d5
Metanfetamina	SIR 9 m/z		150.1 119.0	15 20	7.4	MDMA-d5
MDA			180.2 163.2	15 20	7.4	MDMA-d5
6-Monoacetil morfina			328.1 211.0	30 60	7.5	MDMA-d5
MDMA			194.2 163.2	15 20	7.7	MDMA-d5
MDMA-d ₅			199.3	15	7.7	MDMA-d5
MDEA	Función 3:	8.0 – 12.0	208.3 163.2	20 20	8.3	MBDB-d5
MBDB	SIR 10 m/z		208.3 177.1	20 25	8.7	MBDB-d5
MBDB-d ₅			213.3	15	8.7	
Benzoilecgonina			290.0 168.2	20 25	8.6	Benzoilecgonina- d3
Benzoilecgonina- d ₃			293.2	25	8.6	
Cocaína			304.2 182.1	20. 30	9.5	Cocaína-d3
Cocaína-d ₃			307.1	25	9.5	

* El ión de cuantificación figura en negrita

Tabla 19. Principales parámetros del espectrómetro de masas, el tiempo de retención y el patrón interno seleccionado en cada caso, en el método de determinación de los siete derivados anfetamínicos en sangre.

Compuesto	Función SIR	Ventana detección funciones SIR (min)	m/z seleccionadas*	Voltaje de cono (V)	TR (min)	PI
Anfetamina	Función 1:	2.0-5.0	136.1 119	15 20	3.2	Metanfetamina- d ₅
MDA	SIR 10 m/z		180.2 163.2	15 20	3.7	MDMA- d ₅
Metanfetamina			150.1 119	15 20	3.8	Metanfetamina- d ₅
PMA			166.3 149.1	10 12	3.8	Metanfetamina- d ₅
MDMA			194.2 163.2	15 20	4.3	MDMA- d ₅
Metanfetamina- d ₅			155.3	15	3.8	
MDMA- d ₅			199.3	15	4.3	
MDEA	Función 2:	4.6-9	208.3 163.2	20 20	5.6	MBDB-d ₅
MBDB	SIR 4 m/z		208.3 177.1	20 25	7.0	MBDB-d ₅
MBDB-d ₅			213.3	15	7.0	

* El ión de cuantificación figura en negrita

Tabla 20. Principales parámetros del espectrómetro de masas, el tiempo de retención y el patrón interno seleccionado en cada caso, en el método de determinación de los siete derivados anfetamínicos en hígado.

Compuesto	Función SIR	Ventana detección funciones SIR (min)	m/z seleccionadas*	Voltaje de cono (V)	TR (min)	PI
Anfetamina	Función 1:	4-7.2	136.1 119	15 20	5.3	Metanfetamina- d ₅
Metanfetamina	SIR 10 m/z		150.1 119	15 20	6.1	MDMA- d ₅
MDA			180.2 163.2	15 20	6.1	Metanfetamina- d ₅
PMA			166.3 149.1	10 12	6.4	MDMA- d ₅
MDMA			194.2 163.2	15 20	6.6	MDMA- d ₅
Metanfetamina- d ₅			155.3	15	6.1	
MDMA-d ₅			199.3	15	6.6	
MDEA	Función 1:	6.8-18	208.3 163.2	20 20	7.3	MBDB-d ₅
MBDB	SIR 4 m/z		208.3 177.1	20 25	7.8	MBDB-d ₅
MBDB-d ₅			213.3	15	7.8	

* El ión de cuantificación figura en negrita

2.1.2. Condiciones del espectrómetro de masas en tandem Quattro Micro™

La optimización de los siete derivados anfetamínicos en MS/MS, fue realizada tal y como se indicó en el correspondiente apartado en Material y Métodos. El modo de trabajo elegido en el método analítico fue MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), por lo que la optimización de cada molécula consistió en la elección de dos transiciones ión padre > ión hijo, excepto en el caso de los derivados deuterados, dónde una sola transición fue necesaria.

En todos los casos la molécula protonada fue elegida como ión padre, optimizando el voltaje de cono que produce la señal más intensa. A partir del ión padre optimizado, fueron elegidos dos iones hijos, los cuales fueron obtenidos en la célula de colisión aplicando distintas energías de colisión. Las figuras 65-71 muestran los espectros de masas obtenidos para cada molécula, y sus correspondientes iones hijos. Las figuras 72-75 representan los espectros obtenidos para los derivados deuterados anfetamina-d₆, MDA-d₅, MDMA-d₅ y MBDB-d₅.

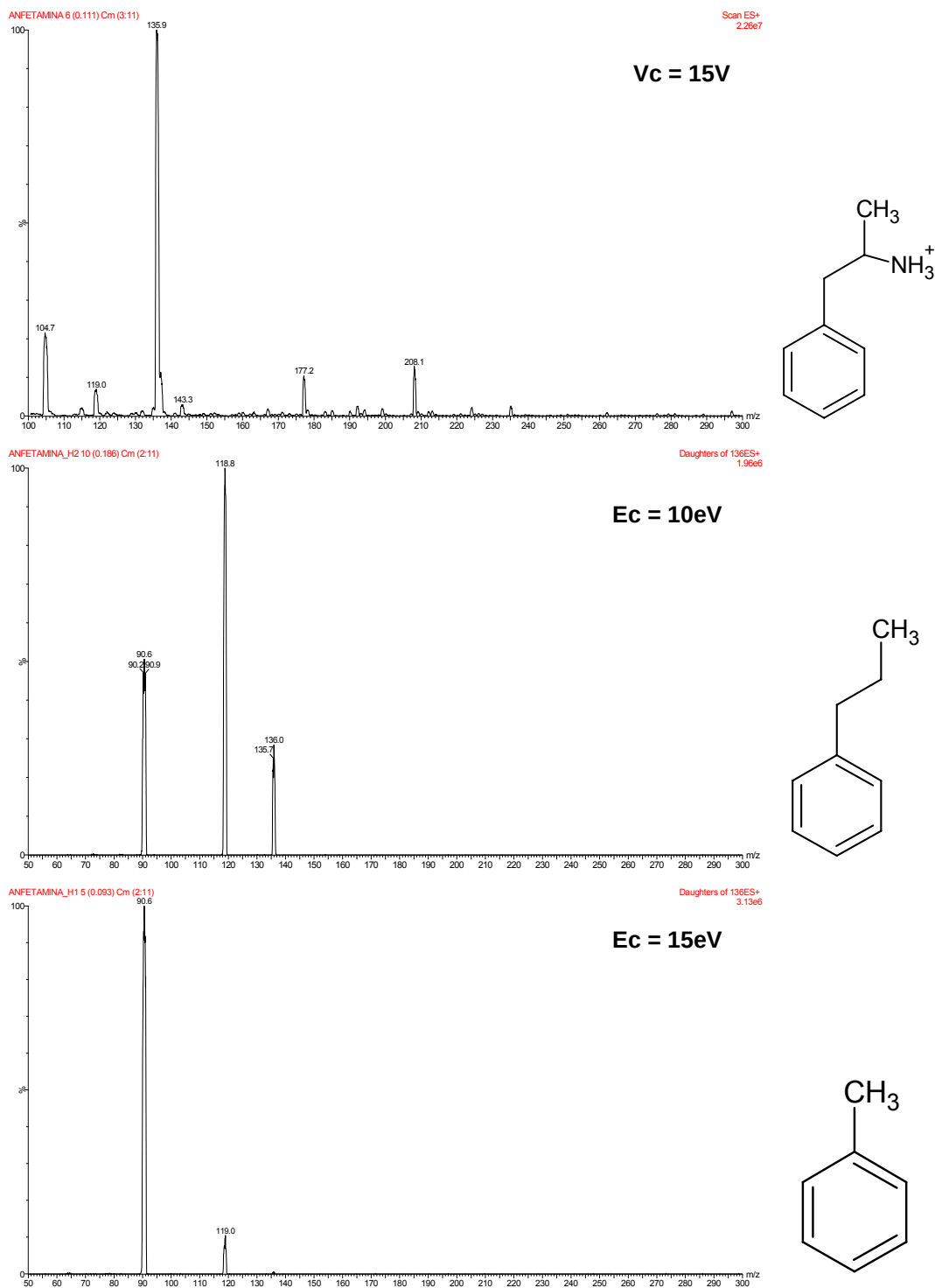


Figura 65. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la anfetamina. Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.

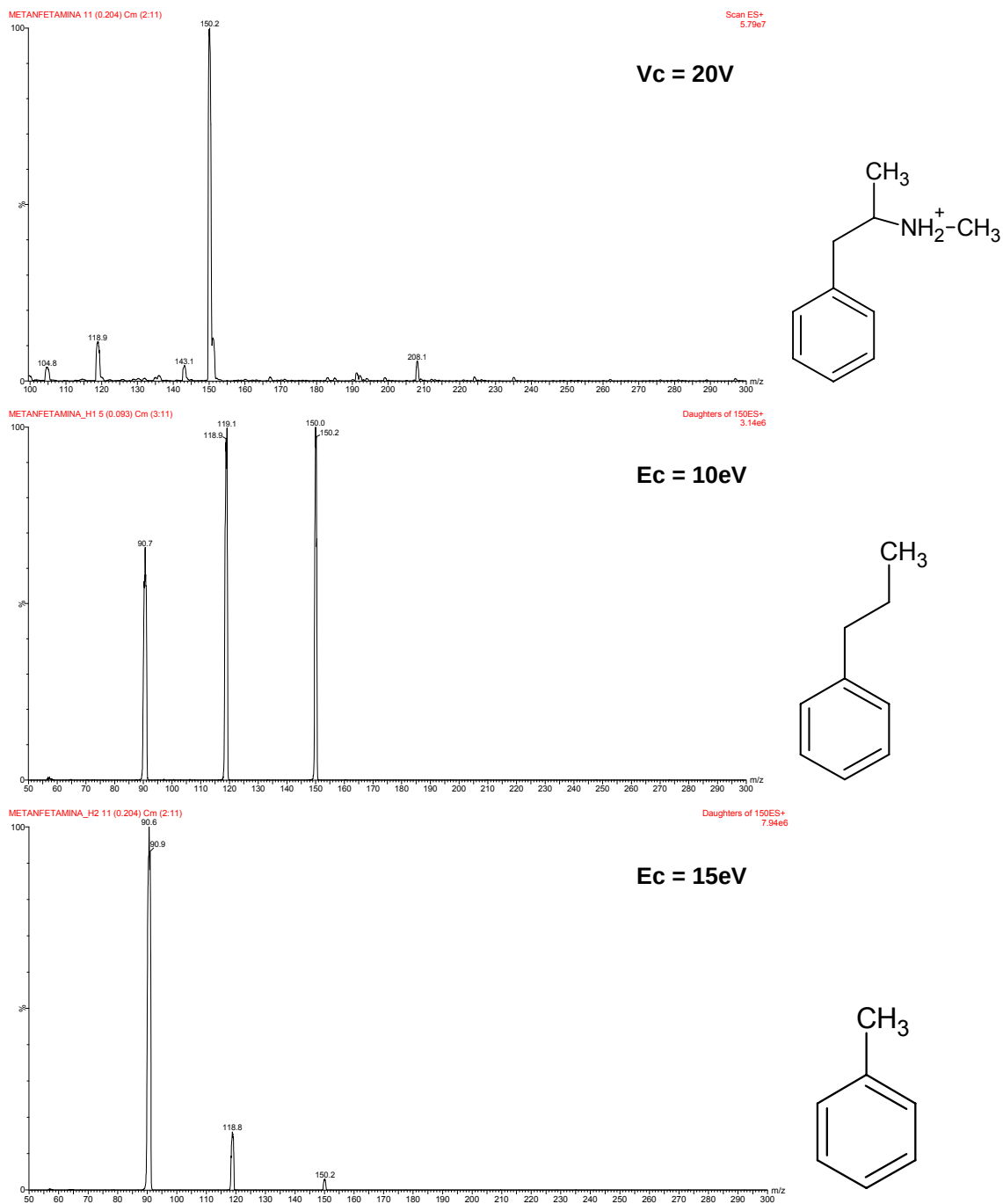


Figura 66. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la metanfetamina. Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.

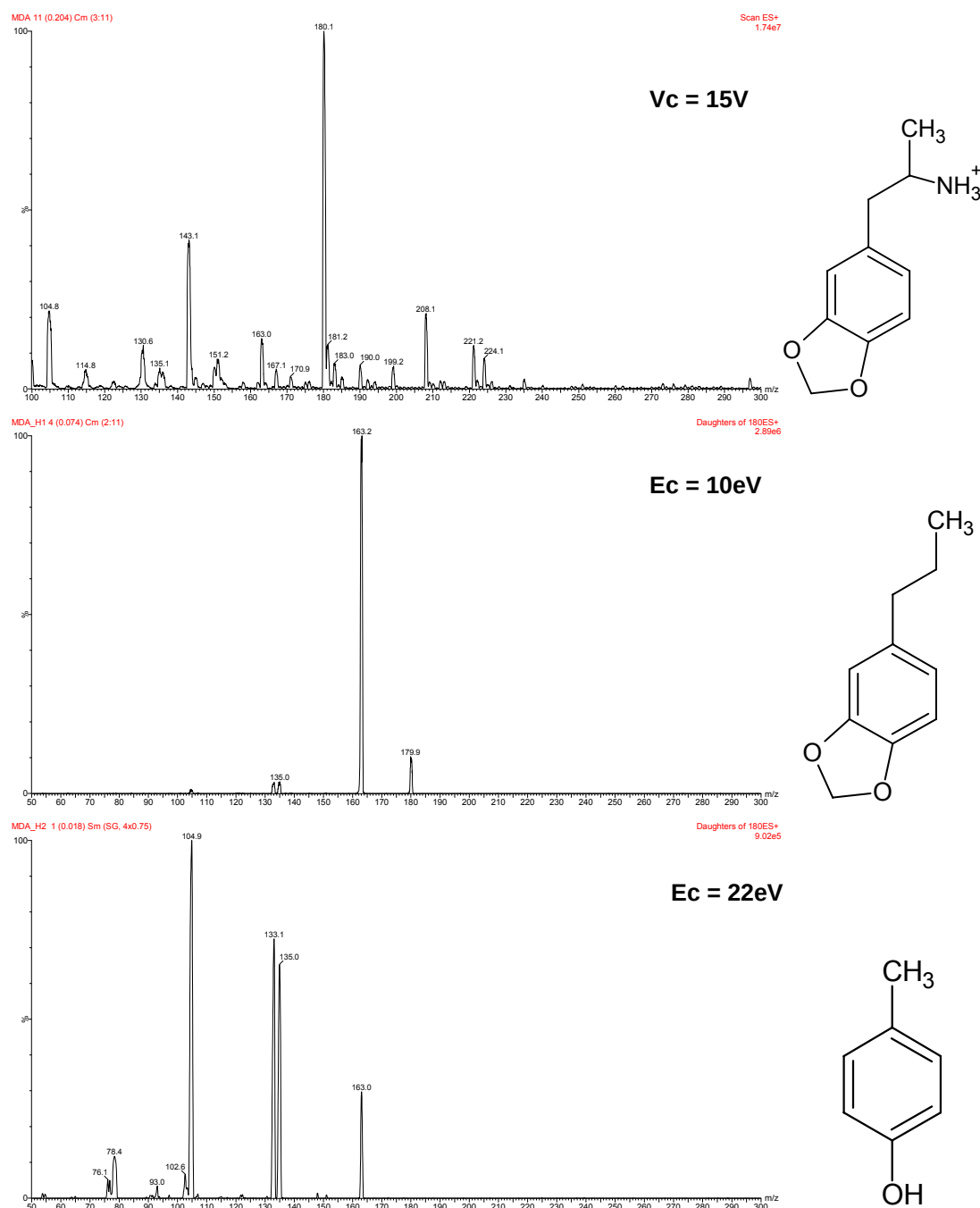


Figura 67. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la MDA. Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.

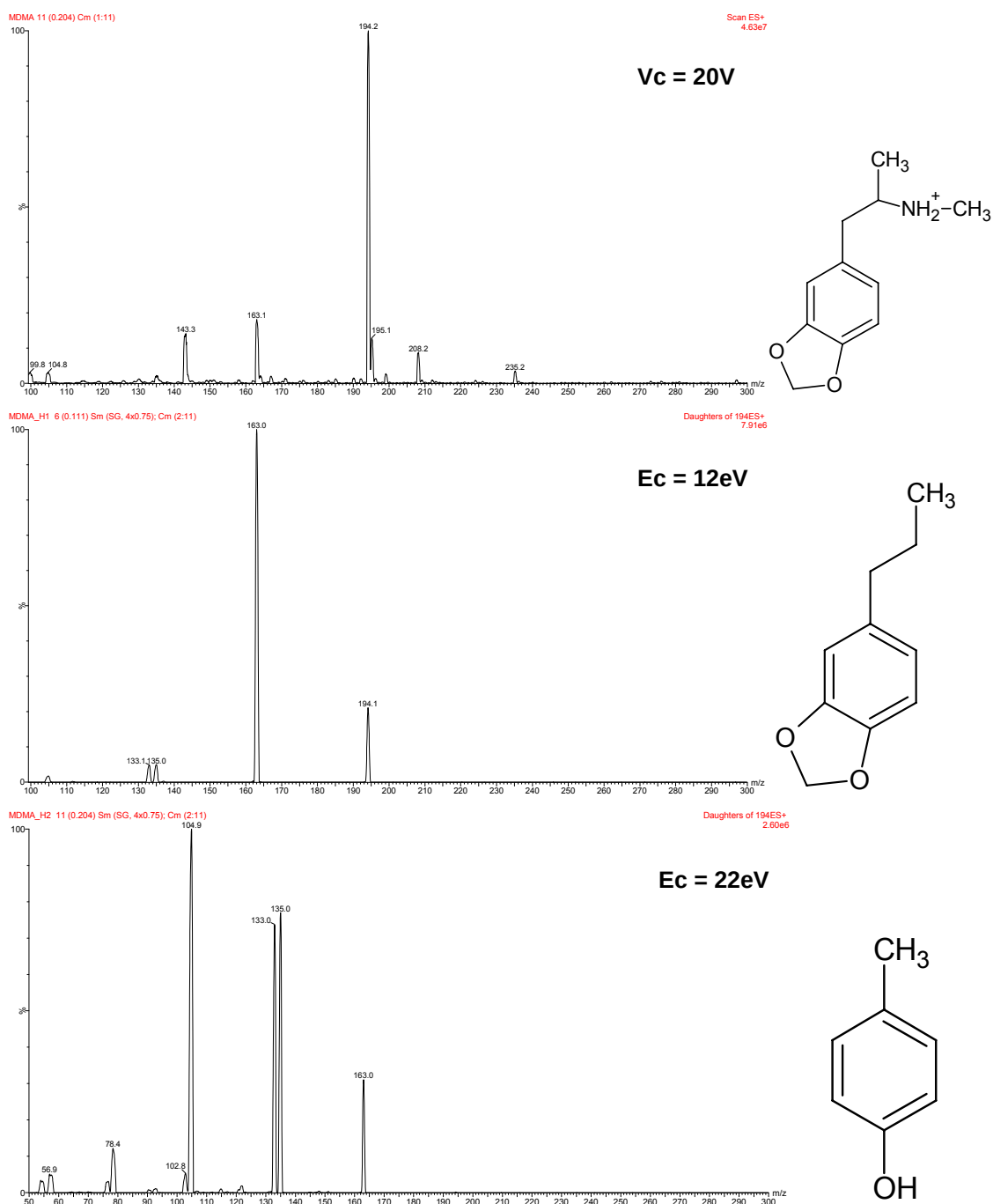


Figura 68. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la MDMA. Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.

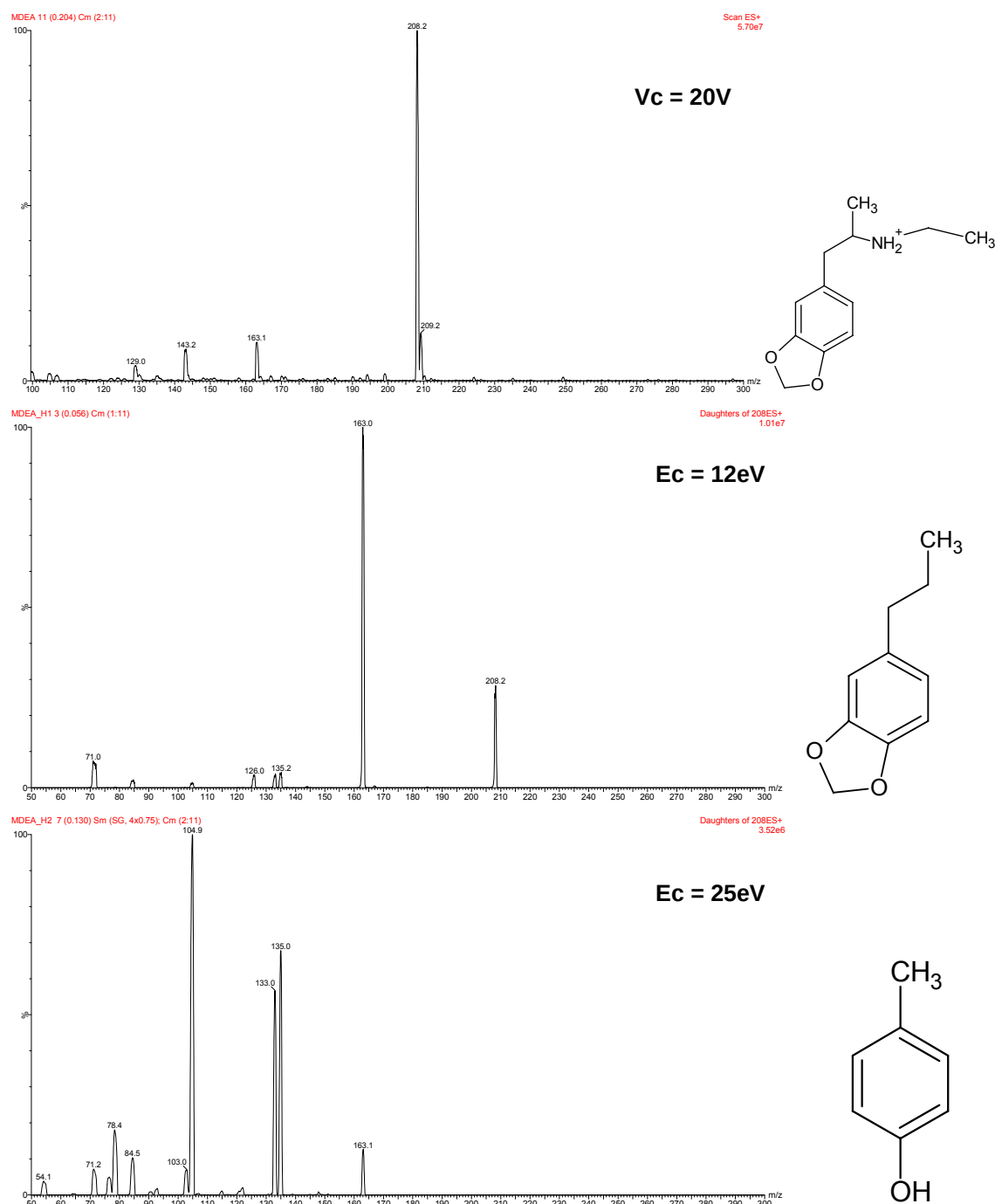


Figura 69. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la MDEA. Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.

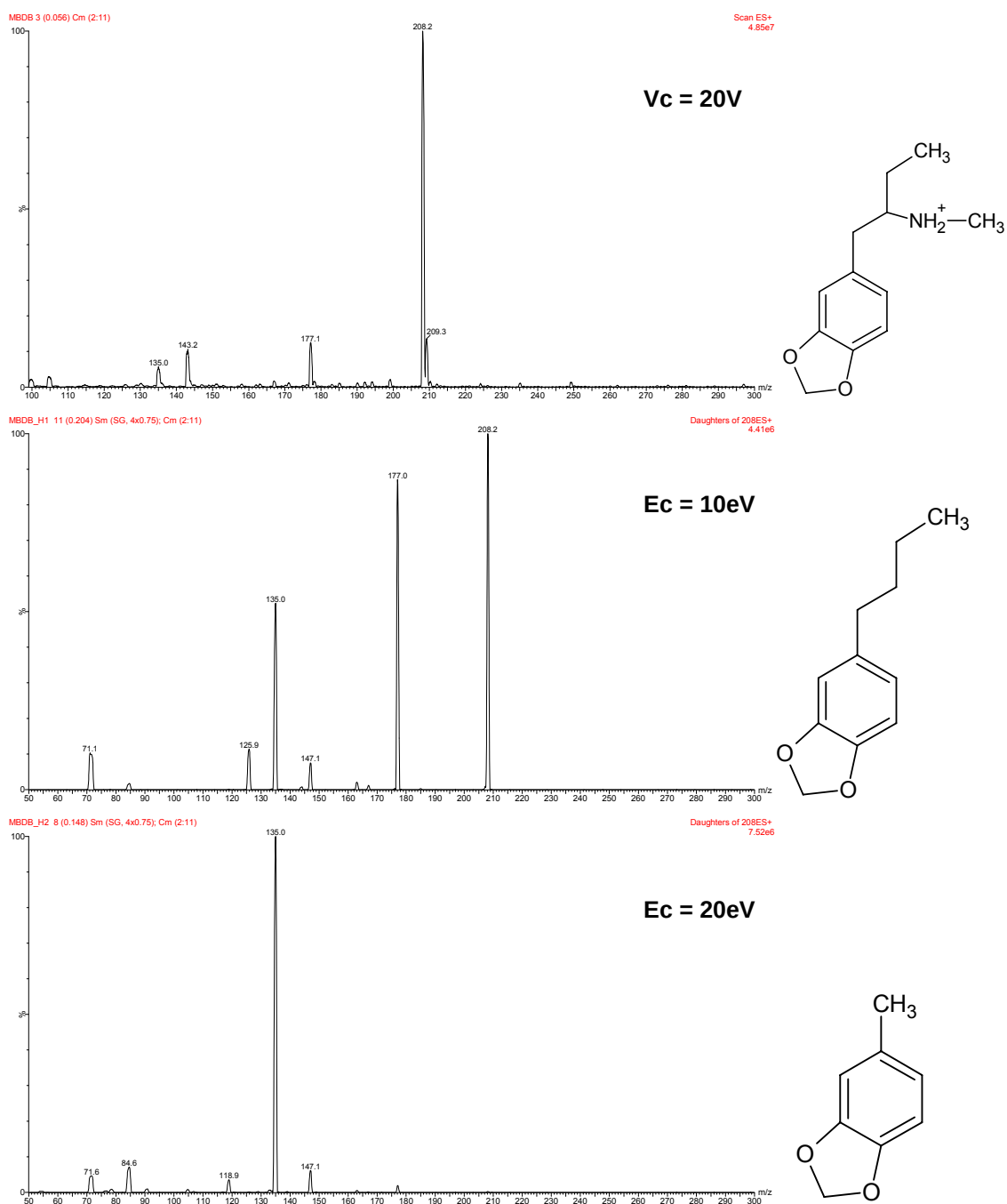


Figura 70. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la MBDB. Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.

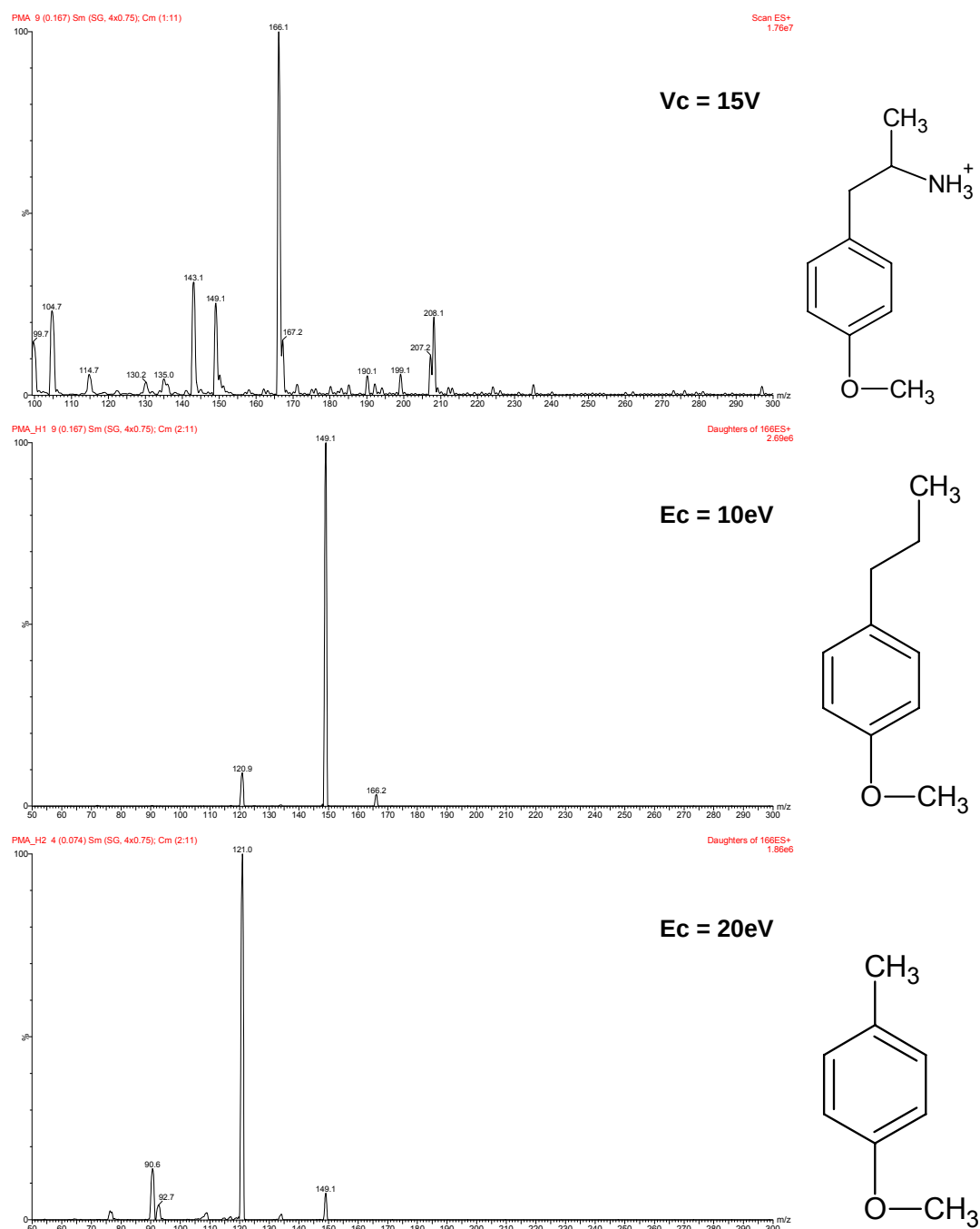


Figura 71. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la PMA. Se indican los valores del voltaje de cono (V_c) o de la energía de colisión (E_c), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.

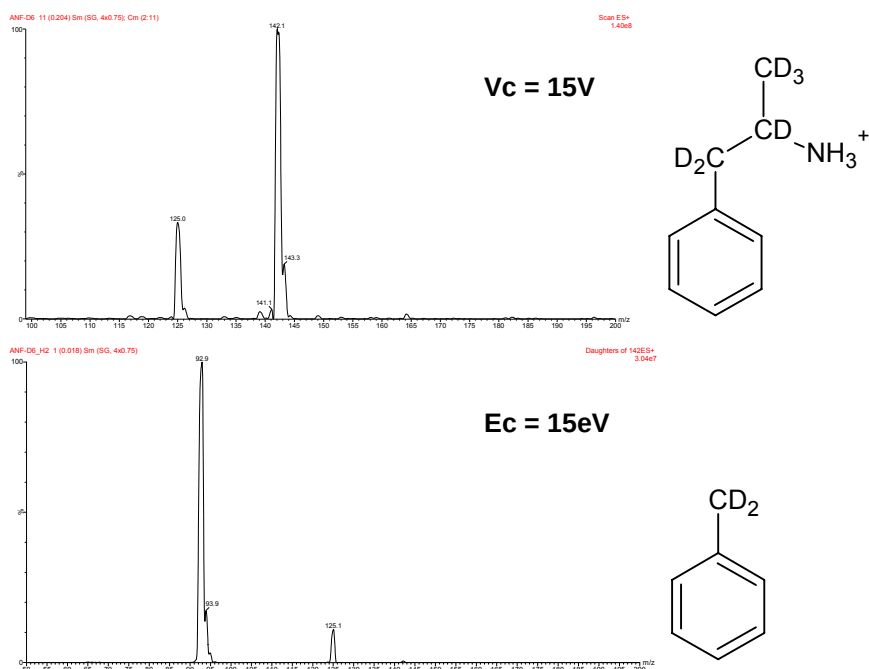


Figura 72. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la anfetamina-d₆. Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.

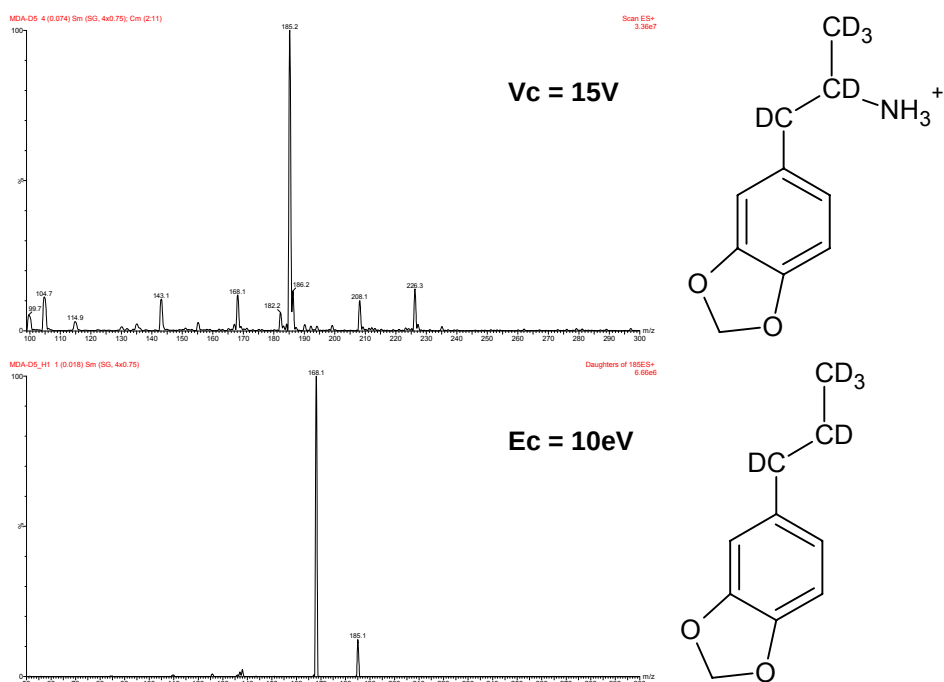


Figura 73. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la MDA-d₅. Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.

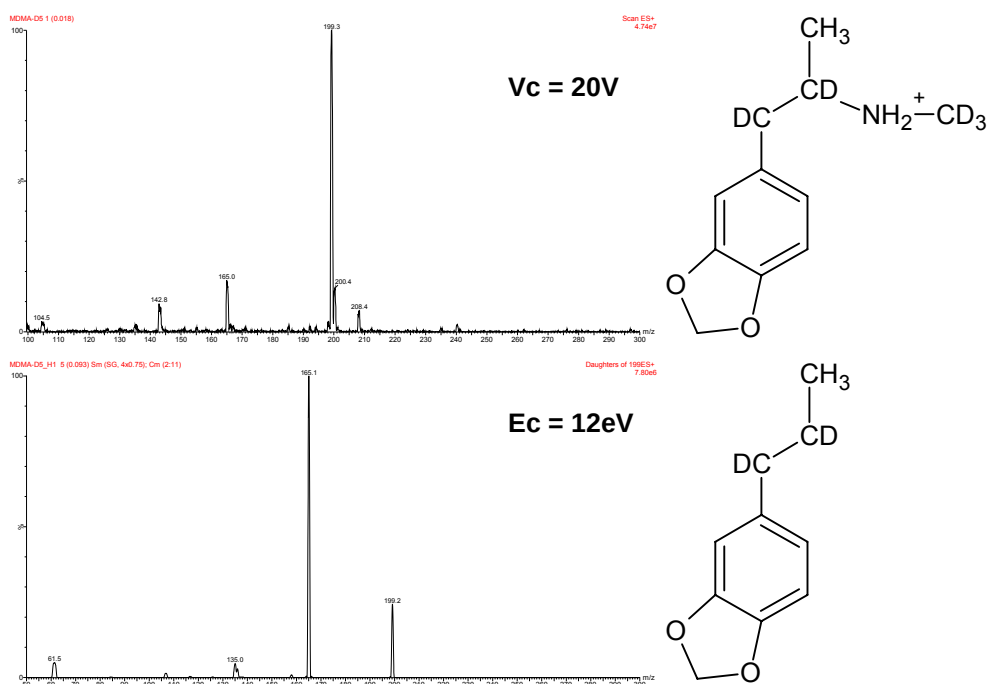


Figura 74. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la MDMA-d₅. Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.

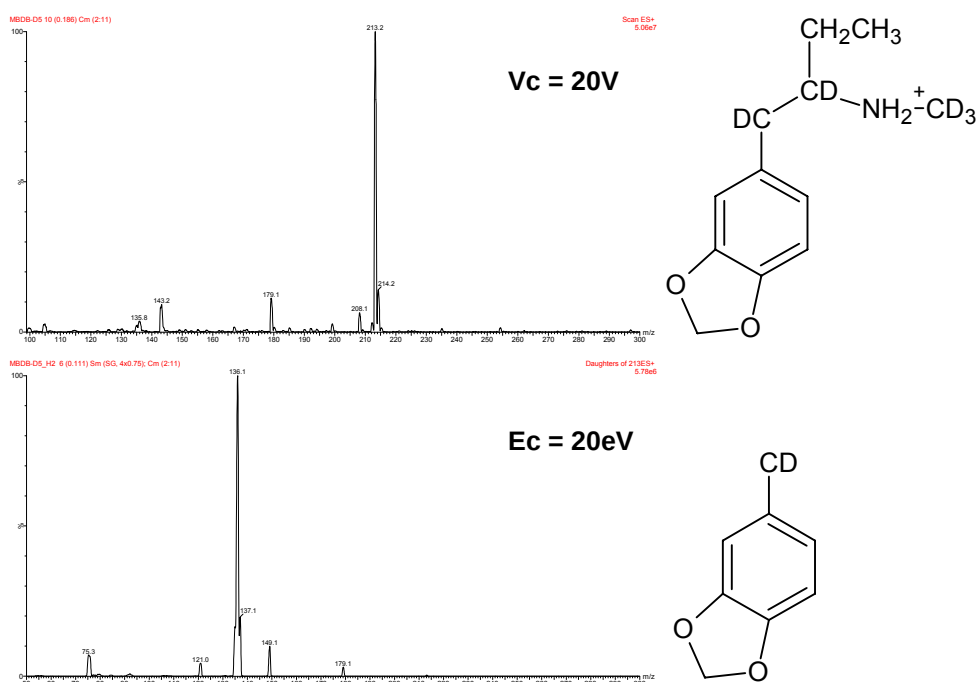


Figura 75. Espectros de masas del ión padre y de los dos iones hijos de la MBDB-d₅. Se indican los valores del voltaje de cono (Vc) o de la energía de colisión (Ec), a los que se obtuvieron los espectros. Al lado de cada espectro se representa la supuesta estructura química del compuesto más abundante del espectro.

Al igual que lo que ocurría en el caso del espectrómetro de masas ZMD, con el espectrómetro de masas Quattro MicroTM también es necesario dividir al método de masas en distintas funciones, para conseguir el adecuado número de puntos por pico. El Quattro MicroTM presenta una velocidad de barrido mayor, con unos valores límite de *dwell time* (0.05 s) y de *interchannel delay* (0.02 s) menores, lo que permitirá por ejemplo, introducir un mayor número de transiciones por función, lo que hace no que no sea necesaria una separación cromatográfica más cuidadosa. El modo de trabajo ha sido MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), y las condiciones utilizadas aparecen recogidas en la tabla 21.

Tabla 21. Principales parámetros del espectrómetro de masas-masas, el tiempo de retención y el patrón interno seleccionado en cada caso, en el método de determinación de los siete derivados anfetamínicos en orina.

Compuesto	Función MRM	Ventana detección funciones (min)	Transición seleccionada*	Cono (V)	Energía de colisión (eV)	TR (min)	PI
Anfetamina	Función 1:	0-2.6	135.9>90.6	15	15	2.3	Anfetamina-d ₆
Anfetamina-d ₆	3 MRM		135.9>118.9	15	10		
			142.2>92.7	15	15	2.2	
Metanfetamina		2.4-3.3	150.1>90.6	20	15	2.6	MDMA-d ₅
			150.1>119.1	20	10		
MDA			180.1>104.7	15	22	2.8	MDA-d ₅
	Función 2:		180.1>163.1	15	10		
PMA			166.1>120.9	15	20	2.9	Anfetamina-d ₆
	10 MRM		166.1>149	15	10		
MDMA			194.2>104.5	20	22	3	MDMA-d ₅
			194.2>163	20	12		
MDA-d ₅			185.2>168.1	15	10	2.8	
MDMA-d ₅			199.2>165.1	20	12	3	
MDEA		3.1-8	208.2>104.7	20	25	3.3	MBDB-d ₅
	Función 3:		208.2>162.9	20	12		
MBDB			208.2>134.8	20	20	3.7	MBDB-d ₅
	5 MRM		208.2>176.9	20	10		
MBDB-d ₅			213.3>136	20	20	3.7	

*La transición de cuantificación figura en negrita

2.2. La separación cromatográfica

Los cromatogramas obtenidos en los distintos métodos desarrollados han sido los siguientes:

2.2.1. La separación cromatográfica en el método de determinación de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, morfina, 6-monoacetilmorfina, cocaína y benzoilecgonina en plasma

La separación cromatográfica fue realizada en las condiciones descritas en el apartado correspondiente de Material y Métodos. Se utilizó el modo gradiente, y la separación de los picos cromatográficos se logró en menos de 10 minutos. El gradiente se mantuvo hasta el minuto 18, teniendo en cuenta el tiempo de acondicionamiento bajo las condiciones iniciales del gradiente. En los cromatogramas (fig. 76 y 77), vemos que algunos de los compuestos se solapan con el tiempo, lo cual no es importante en LC-MS, a diferencia de lo que ocurre con otras técnicas cromatográficas, ya que la m/z monitorizada es distinta. En el caso de presentar la misma m/z , como en el caso del ión de cuantificación de la MDEA y la MBDB, o como del ión de confirmación de la anfetamina y la metanfetamina, y de la MDA y la MDMA, la separación de los picos cromatográficos correspondientes es completa (Resolución > 1).

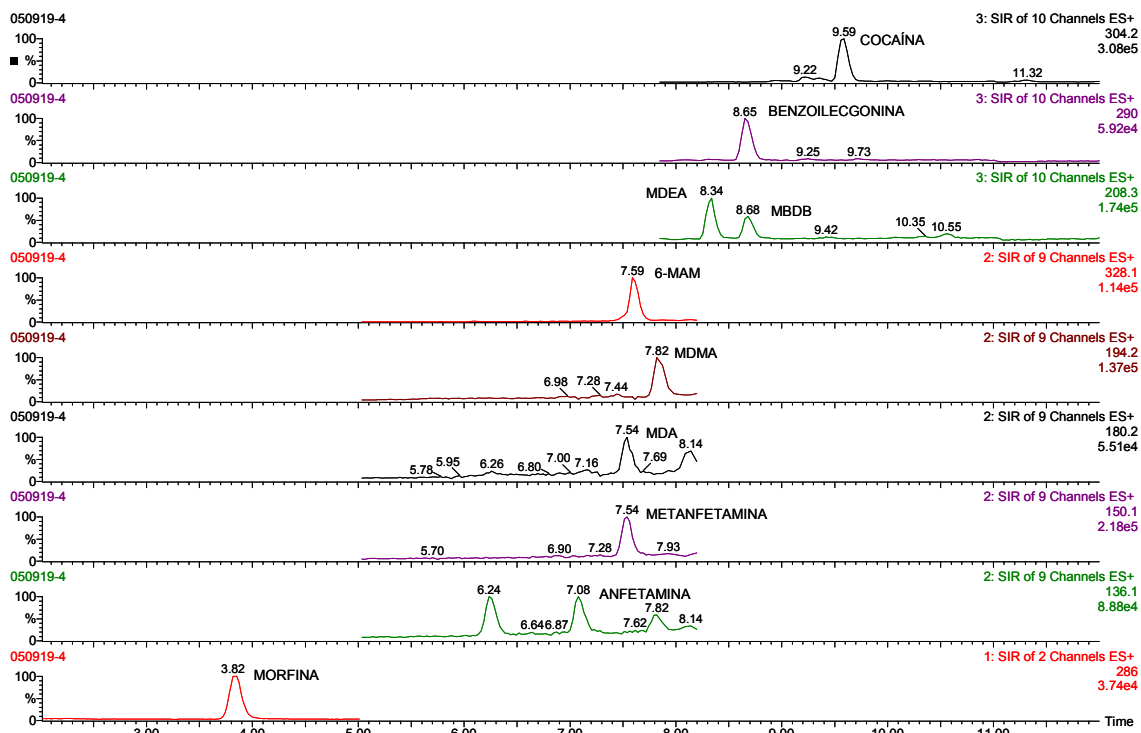


Figura 76. Muestra de plasma preparada a 2 ng/mL. Se muestran los cromatogramas en modo SIM del ión de cuantificación de cada uno de los compuestos detectados.

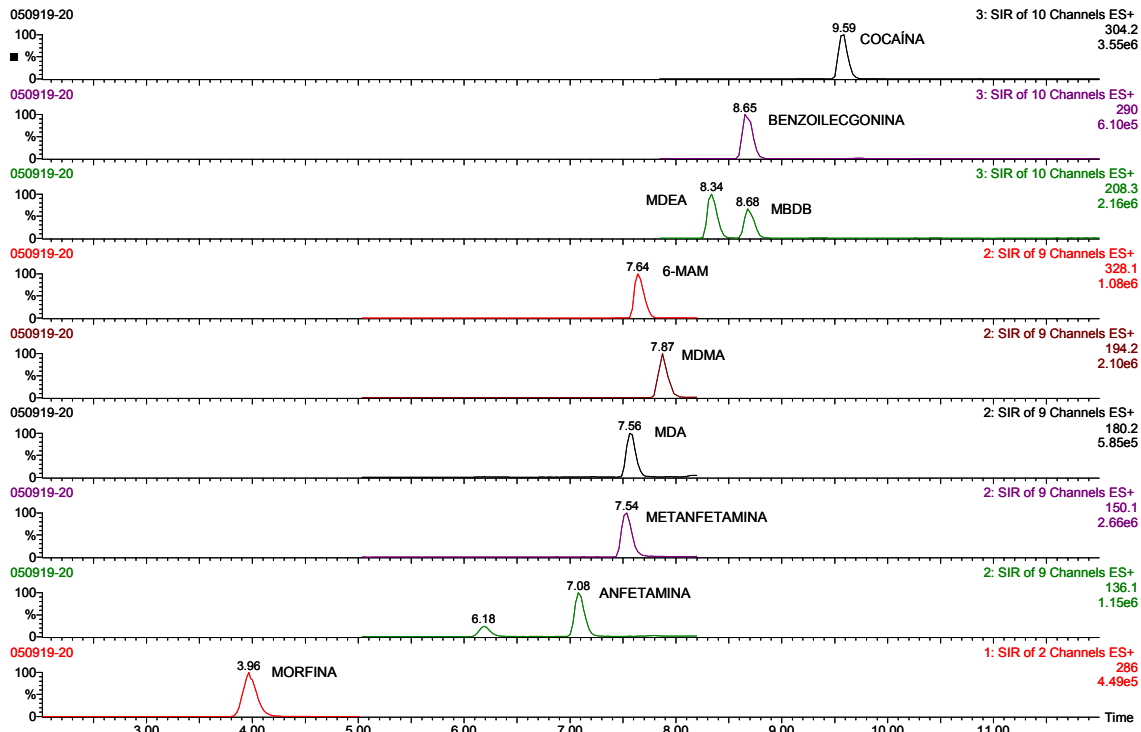


Figura 77. Muestra de plasma preparada a 50 ng/mL. Se muestran los cromatogramas en modo SIM del ión de cuantificación de cada uno de los compuestos detectados.

2.2.2. La separación cromatográfica en el método de determinación de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB y PMA en sangre

El modo de trabajo elegido en este método fue el isocrático, siguiendo las condiciones previamente descritas en el apartado correspondiente de Material y Métodos. La separación cromatográfica de los siete derivados anfetamínicos en muestras de sangre, se alcanzó en menos de 8 minutos. Los compuestos que presentan la misma m/z como ión de cuantificación (MDEA y MBDB), o como ión de confirmación (anfetamina y metanfetamina, MDA y MDMA), fueron completamente resueltos (Resolución > 1). Los cromatogramas obtenidos a dos concentraciones distintas se muestran en la figuras 78 y 79.

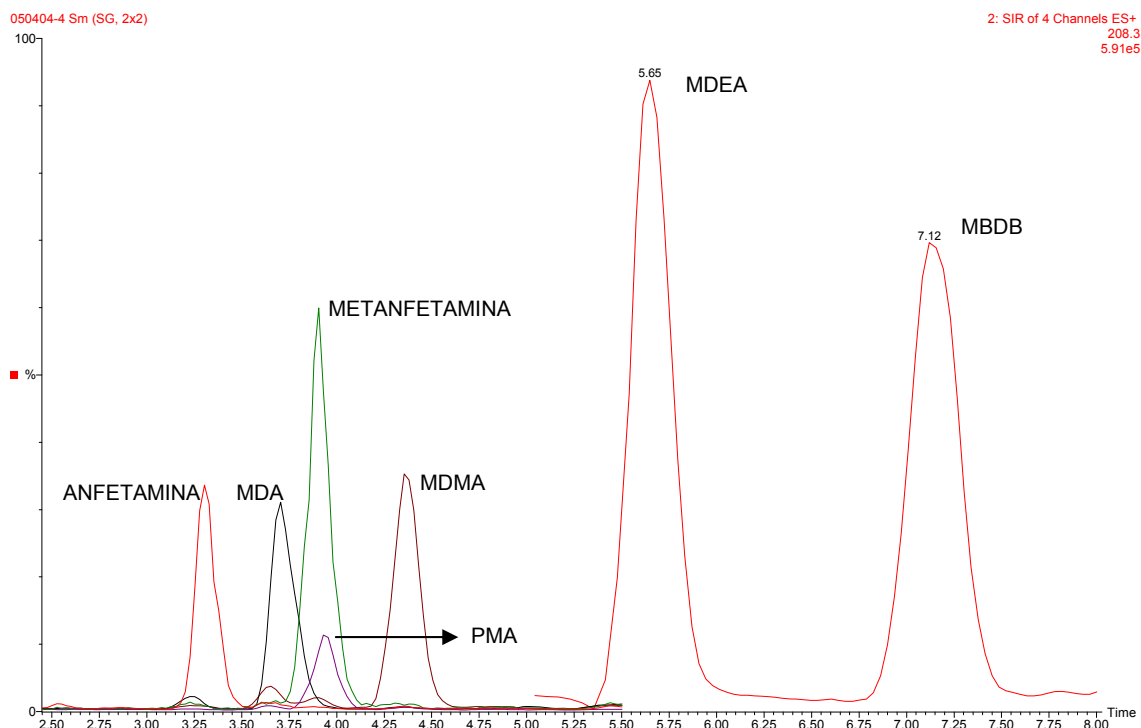


Figura 78. Imagen superpuesta de los cromatogramas en modo SIM del ión de cuantificación de la anfetamina, la MDA, la metanfetamina, la PMA, la MDMA, la MDEA y la MBDB, de una muestra de sangre preparada a 5 ng/mL.

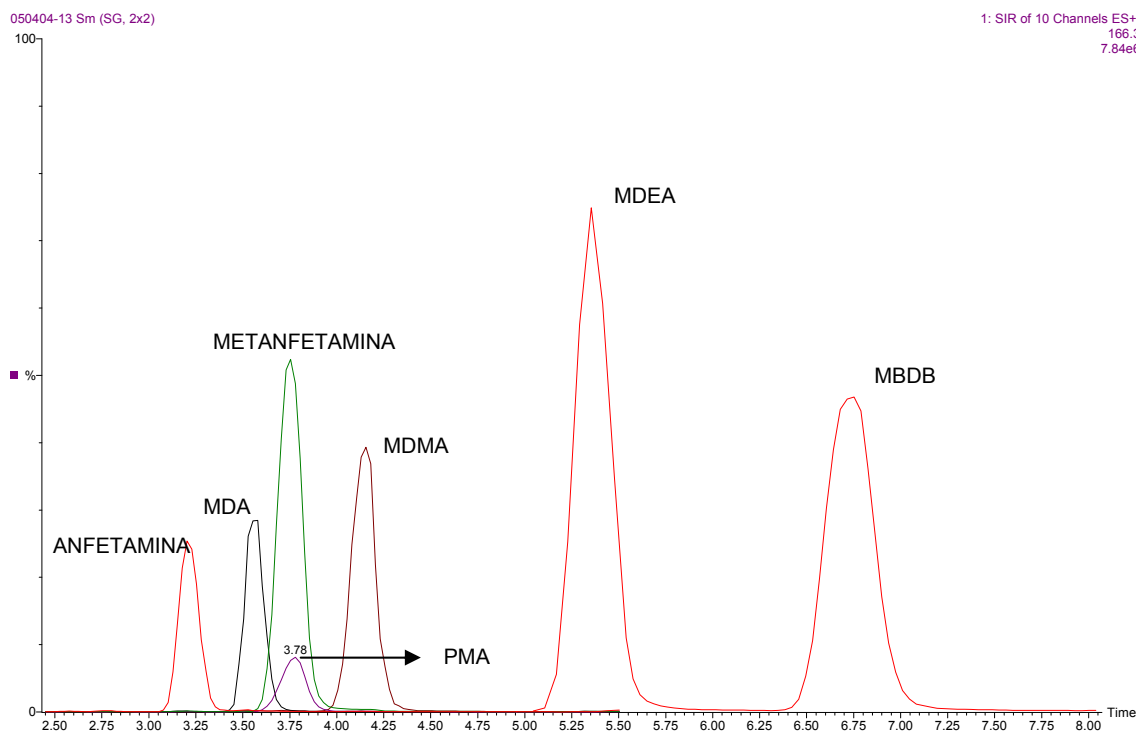


Figura 79. Imagen superpuesta de los cromatogramas en modo SIM del ión de cuantificación de la anfetamina, la MDA, la metanfetamina, la PMA, la MDMA, la MDEA y la MBDB, de una muestra de sangre preparada a 50 ng/mL.

2.2.3. La separación cromatográfica en el método de determinación de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB y PMA en hígado

En este caso, se trabajó en modo gradiente, según las condiciones previamente descritas en Material y Métodos. Debido a que se trata de una muestra muy compleja fue necesario desarrollar un gradiente que llegase a un alto porcentaje de acetonitrilo, para de esta manera “limpiar” la columna entre inyecciones. La separación cromatográfica de los siete derivados anfetamínicos se alcanzó en menos de 10 minutos, con un tiempo total de gradiente de 18 minutos. Los compuestos que presentan la misma m/z como ión de cuantificación (MDEA y MBDB), o como ión de confirmación (anfetamina y metanfetamina, MDA y MDMA), fueron complementemente resueltos (Resolución > 1). Los cromatogramas obtenidos a dos concentraciones distintas se muestran en la figuras 80 y 81.

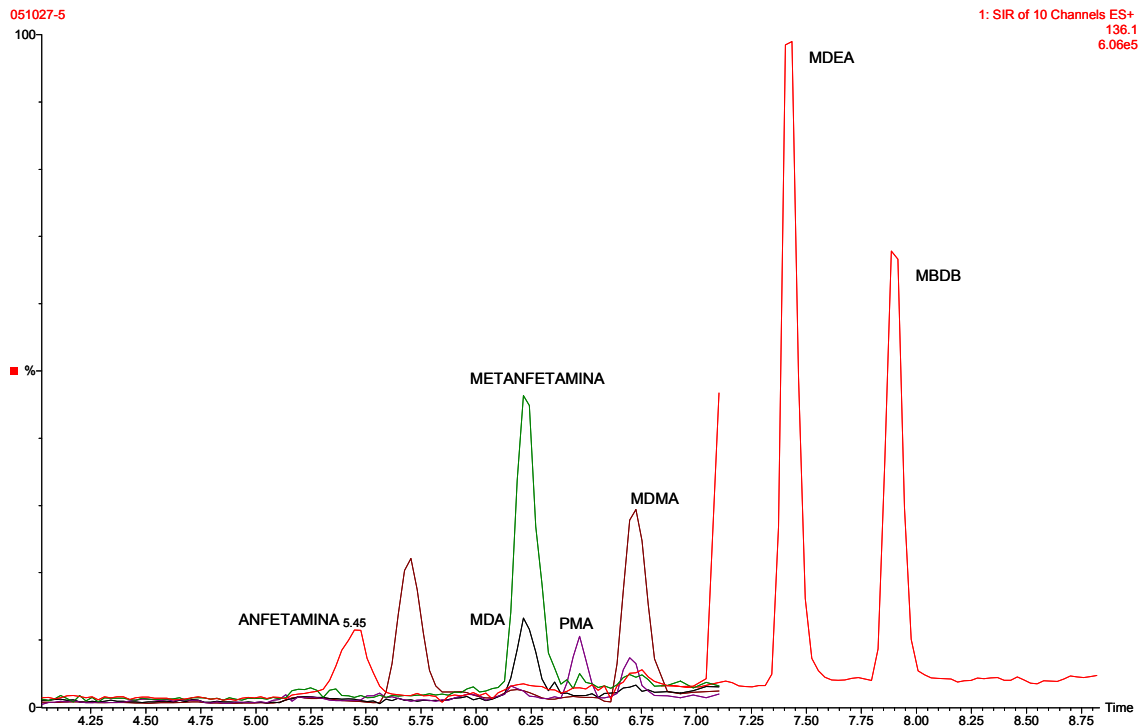


Figura 80. Imagen superpuesta de los cromatogramas en modo SIM del ión de cuantificación de la anfetamina, el MDA, la metanfetamina, el PMA, el MDMA, el MDEA y el MBDB, de una muestra de hígado preparada a 8 ng/g.

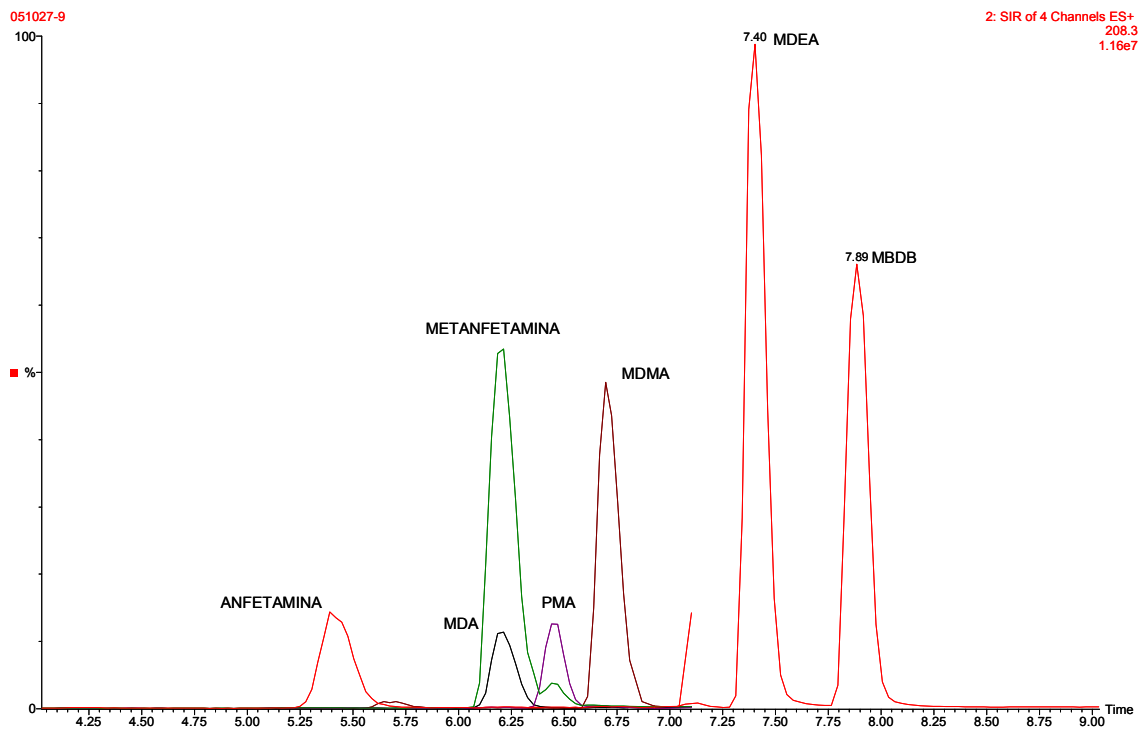


Figura 81. Imagen superpuesta de los cromatogramas en modo SIM del ión de cuantificación de la anfetamina, el MDA, la metanfetamina, el PMA, el MDMA, el MDEA y el MBDB, de una muestra de hígado preparada a 200 ng/g.

2.2.4. La separación cromatográfica en el método de determinación de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB y PMA en orina

La separación cromatográfica de los siete derivados anfetamínicos en muestras de orina, fue realizada en modo gradiente utilizando una columna ISTM (*Intelligent Speed*), tal y como fue descrito en el apartado correspondiente de Material y Métodos. Estas columnas se caracterizan por presentar una longitud de tan sólo 20 mm (las columnas utilizadas en el resto de los métodos desarrollados son de 100 mm de longitud). La reducción de la longitud de la columna permite desarrollar métodos más rápidos (menor recorrido cromatográfico, y posibilidad de utilizar flujos más altos), sin sacrificar la resolución cromatográfica. El diámetro interno de 2.1 mm permite utilizar flujos compatibles con ESI sin necesidad de splitless. En el método desarrollado, la separación cromatográfica de los siete derivados anfetamínicos se alcanzó en menos de 4 minutos, con un tiempo total de gradiente de 8 minutos. Los cromatogramas obtenidos a dos concentraciones distintas se muestran en la figuras 82 y 83.

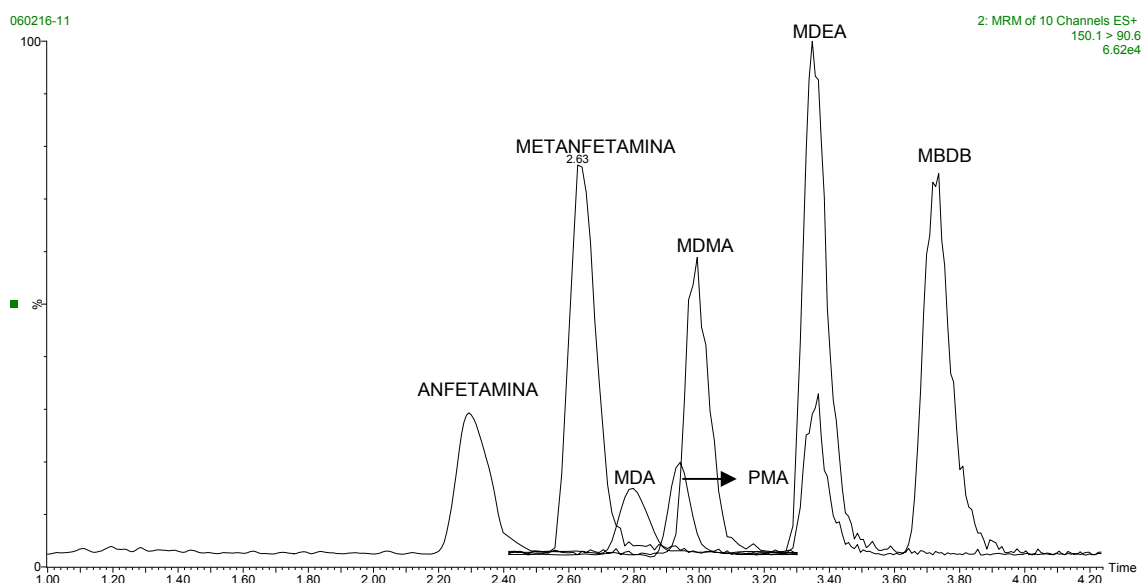


Figura 82. Imagen superpuesta de los cromatogramas en modo MRM de la transición de cuantificación de la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la PMA, la MDMA, la MDEA y la MBDB, de una muestra de orina preparada a 2 ng/mL.

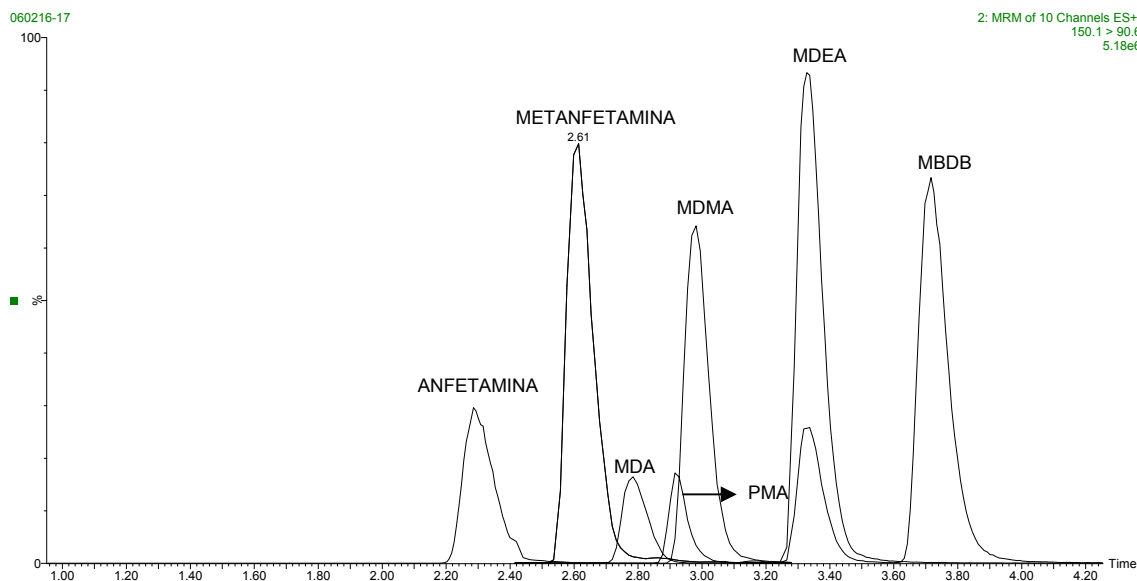


Figura 83. Imagen superpuesta de los cromatogramas en modo MRM de la transición de cuantificación de la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la PMA, la MDMA, la MDEA y la MBDB, de una muestra de orina preparada a 200 ng/mL.

2.3. Resultados de la validación de los métodos analíticos

2.3.1. Especificidad (Selectividad)

La especificidad o selectividad de los métodos analíticos fue estudiada analizando las muestras de plasma, sangre, orina o hígado, procedentes de nueve individuos distintos, que no habían consumido las sustancias investigadas. En todos los casos se comprobó que no existían interferencias con los analitos de interés, tanto para el ión de cuantificación como para el ión de confirmación. Las figuras 84-87, muestran cromatogramas de muestras blanco aplicando el correspondiente método analítico. Al observar los cromatogramas obtenidos en modo MRM por MS/MS (fig. 87), el ruido de fondo es mucho más bajo que en los cromatogramas obtenidos en modo SIM por MS (fig. 84-86).

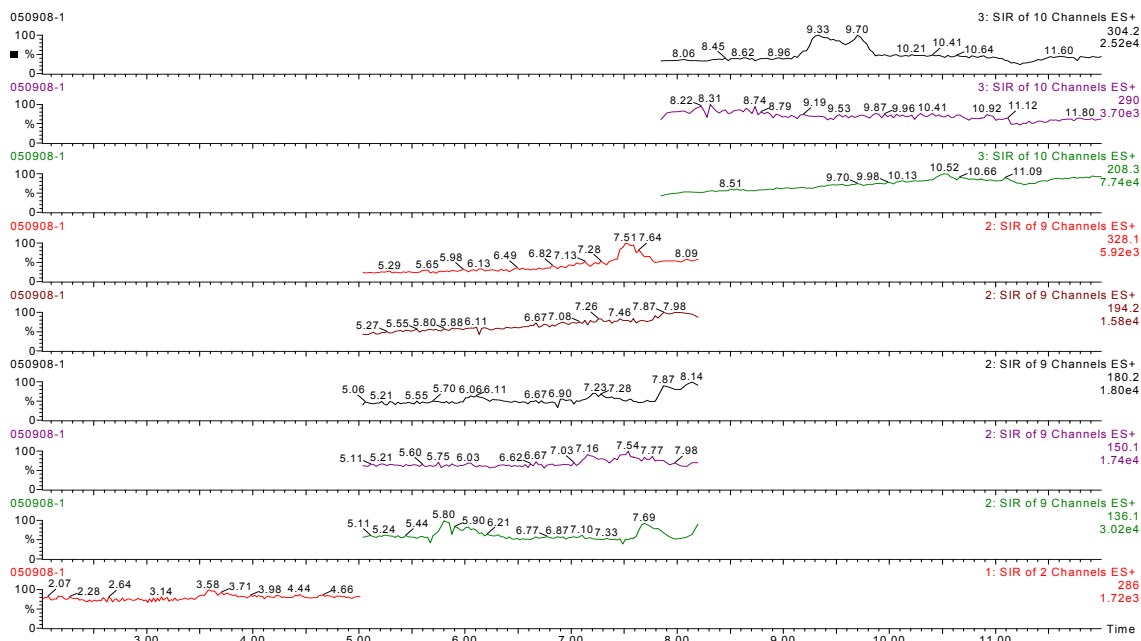


Figura 84. Cromatogramas en modo SIM de los iones de cuantificación de la morfina, la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la MDMA, la 6-monoacetilmorfina, la MDEA, la MBDB, la benzoilecgonina y la cocaína (en orden ascendente), de una muestra de plasma blanco. Se observa que no existe ninguna interferencia con los analitos estudiados.

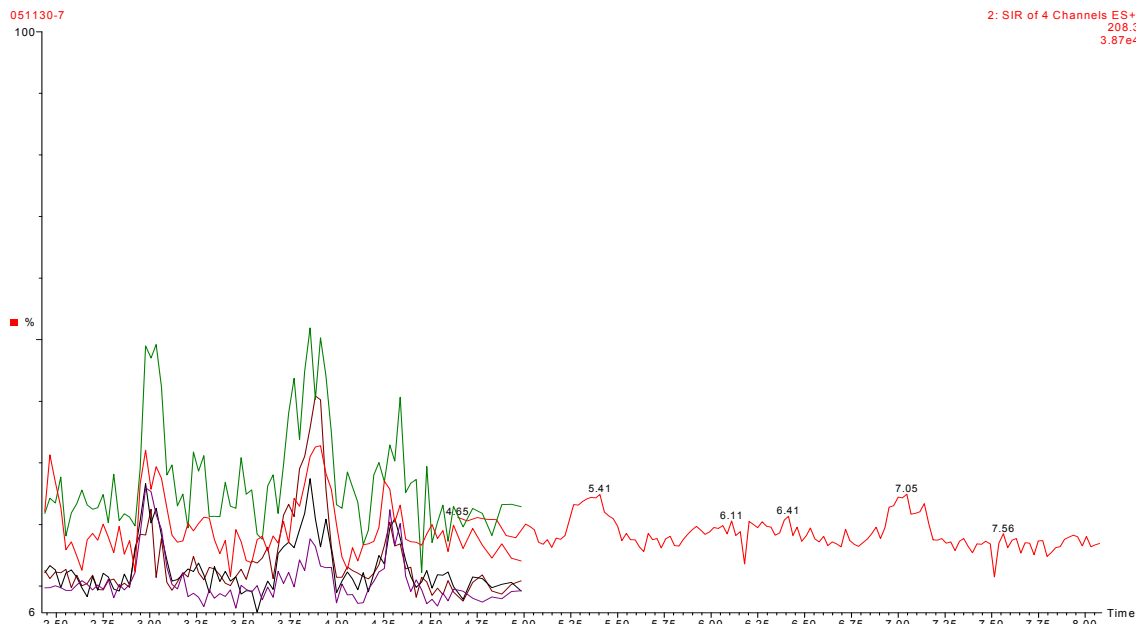


Figura 85. Cromatogramas superpuestos en modo SIM de los iones de cuantificación de la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la PMA, la MDMA, la MDEA y la MBDB, de una muestra de sangre blanco. Se observa que no existe ninguna interferencia con los analitos estudiados.

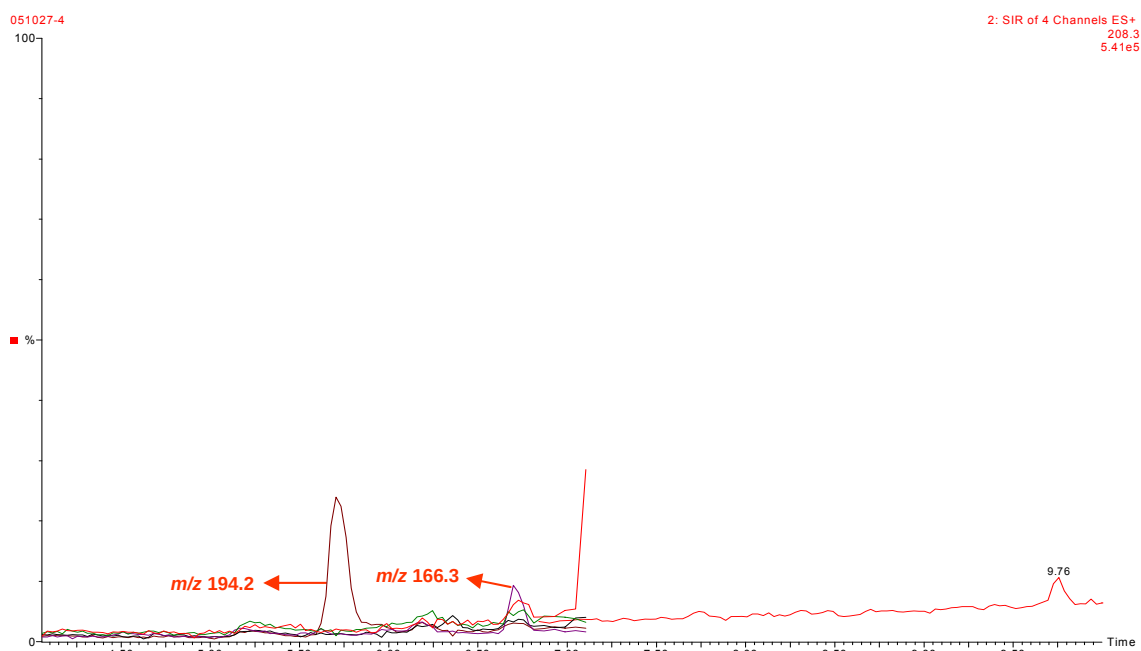


Figura 86. Cromatogramas superpuestos en modo SIM de los iones de cuantificación de la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la PMA, la MDMA, la MDEA y la MBDB, de una muestra de hígado blanco. En el cromatograma de la muestra blanco se pueden ver dos picos, uno correspondiente a la m/z 194.2 al minuto 5.7, y otro correspondiente a la m/z 166.3 al minuto 6.7. La m/z 194.2 es el ión de cuantificación del MDMA, pero el tiempo de retención de este compuesto es de 6.6 minutos, por lo que la posible interferencia (tiempo de retención de 5.7) no le afecta. Lo mismo le ocurre al PMA, cuyo ión de confirmación es la m/z 166.3. El tiempo de retención del PMA es de 6.45 minutos, y el de la posible interferencia 6.7 minutos, por lo que tampoco se ve afectado.

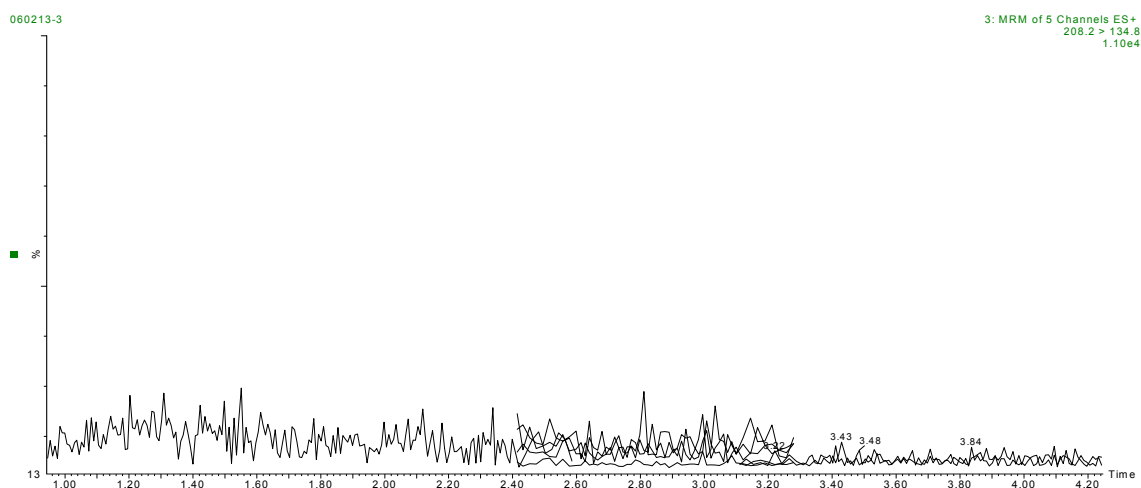


Figura 87. Cromatogramas superpuestos en modo MRM de las transiciones de cuantificación de la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la PMA, la MDMA, la MDEA y la MBDB, de una muestra de orina blanco. Se observa que no existen interferencias con ninguno de los analitos estudiados.

2.3.2. Linealidad, precisión, exactitud, rendimiento e intensidad relativa de los iones

La linealidad de la relación compuesto/patrón interno frente a la concentración teórica, fue verificada en los cuatro métodos propuestos usando un modelo de regresión lineal con ponderación $1/x$. Los coeficientes de determinación (r^2) fueron superiores a 0.99 en todos los casos.

La precisión intradía e interdía expresada como CV, y la exactitud intradía e interdía expresada como MRE, fueron menores del 15%, o del 20% en el caso del LLOQ, para todos los compuestos investigados. La precisión y la exactitud fueron estudiadas para los límites de cuantificación inferior y superior, y para al menos, un punto intermedio de la recta.

El rendimiento de los procesos de extracción ha sido en todos los casos superior al 50%, entre 69.7 y 108%. El rendimiento fue calculado a una o varias concentraciones intermedias.

La intensidad relativa de los iones fue calculada para todas las concentraciones de la recta de calibrado. Se calculó la media y la desviación estándar, expresada como CV, de la intensidad relativa de los iones determinada en seis días distintos. Algunos de los compuestos estudiados, especialmente cuando se trata de concentraciones bajas, presentaron una desviación mayor de la permitida.

Todos estos parámetros, obtenidos para cada compuesto y para cada uno de los métodos desarrollados, han sido recogidos en las tablas 22-25.

Tabla 22. Principales parámetros de validación para el método de determinación de las drogas básicas en plasma.

Compuesto	Concentración (ng/ml)	Rendimiento (%)	Precisión y exactitud intradía (n=6)			Precisión y exactitud interdía (n=5)			Intensidad relativa de iones (n=5)	
			Media	CV	MRE	Media	CV	MRE	Media	CV
Morfina	2	96	1.9	7.2	-4.2	1.7	10.3	-13.4	16	20.7
	5					4.8	8.4	-2.7	17.8	22.8
	10		10.9	7.4	8.5	10.9	7	9.2	18.7	27.5
	25					26.1	4.3	4.6	20.5	30.2
	50	87,1	53.5	7.1	7.1	51.9	4.3	3.8	21.1	36
	125					124.9	9.1	-0.1	20.9	33.1
	250		260.6	9.2	4.2	246.6	4.6	-1.4	21	34
Curva de calibración (n=5): B =0.2998±0.0768, A=0.3562±0.1965, r ² =0.9954±0.0034										
6-MAM	2	88.8	1.9	9.5	-3.3	1.8	7.5	-11	12.1	21.4
	5					5	7.3	-0.2	11.1	4.8
	10		10.8	4.9	7.5	10.7	5.2	7.3	11.5	9.6
	25					26.1	4.7	4.3	11.4	11.9
	50	73.5	53	5.6	6	49.6	9.6	-0.7	11.2	16
	125					127.2	7	1.8	10.9	13.2
	250		249.1	6.8	-0.4	246.6	3.3	-1.4	11.1	13
Curva de calibración (n=5): B=0.5517±0.1570, A=1.1254±0.3899, r ² =0.9970±0.0020										
Benzoilecgonina	2	99.7	2	7.2	-1.6	1.9	17.1	-7.4	45.5	4.6
	5					4.98	10.9	-0.5	63.1	21.3
	10		9.8	3.4	-2.2	10.5	5.9	5	68.2	19.4
	25					25.7	6.1	2.8	73.8	11.6
	50	103.4	53.1	6.7	6.2	51.1	7.5	2.1	70.8	15.6
	125					121.8	4.2	-2.6	73.5	8.1
	250		263.8	8.6	5.5	251.2	2.4	0.5	75.1	4.2
Curva de calibración (n=5): B=0.2256±0.0928, A=0.4062±0.1525, r ² =0.9985±0.0012										
Cocaína	2	92.7	1.9	10.3	-5.7	2	13.9	0.9	59.5	23.1
	5					4.8	4.2	-3.6	52.7	3.7
	10		11	3	9.9	10.4	6.2	4.4	49.6	4.2
	25					24.7	9.5	-1.4	52.2	4.4
	50	83	52.3	5.5	4.6	51.3	4.4	2.5	52.3	8
	125					119.3	3.5	-4.6	51	2.8
	250		250.8	5.2	0.3	254.5	2.8	1.8	53.3	6.1
Curva de calibración (n=5): B=2.7447±0.8394, A=-0.6488±2.7220, r ² =0.9978±0.0019										

(Continuación de la tabla 22)

Compuesto	Concentración (ng/ml)	Rendimiento (%)	Precisión y exactitud intradía (n=6)			Precisión y exactitud interdía (n=5)			Intensidad relativa de iones (n=5)	
			Media	CV	MRE	Media	CV	MRE	Media	CV
Anfetamina	2		2.1	6.05	3.3	1.8	4.2	-9.7	118	14
	5	72.6				5	7.4	-1.1	125.8	9
	10		10.6	2.8	6.1	10.5	6.1	4.6	140.5	12.2
	25					26.5	7.9	5.9	142.9	0
	50		54.6	2.7	9.1	52.1	4.8	4.3	147.6	7.2
	125	78.8				118.7	5.1	-5	147.6	7.2
	250		269.4	2.5	7.8	252.5	2.9	1	142.9	0
Curva de calibración (n=5): A=0.5927±0.1173, B=0.4665±0.2377, r ² =0.9975±0.0033										
Metanfetamina	2		1.9	8.2	-5.3	1.9	8.1	-5.7	51.2	5.9
	5	86				4.9	6.7	-1.6	54.5	5.1
	10		10.5	4.9	5.3	10.6	4.3	5.8	56.4	6.5
	25					25.9	6.4	3.5	59.1	7.7
	50		53.8	3.1	7.7	50.7	4.3	1.5	61.2	6.9
	125	92.3				118.5	6.2	5.2	61.8	2.7
	250		263.7	3.3	5.5	254.5	3.5	1.8	60.3	3.3
Curva de calibración (n=5): A=1.5822 ±0.3101, B=0.5984±0.6689, r ² =0.9966±0.0021										
MDA	2		1.8	7.5	-10.3	1.7	4.5	-14.2	195	22.9
	5	74.2				4.8	7.3	-4.5	273.3	21.4
	10		10.9	5	9.1	10.5	4.5	5.1	273.3	21.4
	25					27.3	5.5	9.3	300	15.2
	50		53.9	4.1	7.8	53.3	4.7	6.6	283.3	16.1
	125	69.8				124.9	2.7	-0.1	283.3	16.1
	250		247.2	5.1	-1.1	244.5	1.2	-2.2	290	21.5
Curva de calibración (n=5): A=0.2433±0.0381, B=0.5748±0.2830, r ² =0.9985±0.0006										
MDMA	2		1.9	8.1	-5.3	1.8	4.8	-12.3	80.2	23.6
	5	100				4.9	5.6	-2.9	87	21.7
	10		10.5	6	4.6	11	2.6	9.5	85.3	26
	25					25.7	4.4	2.6	93.4	19.9
	50		53.9	3	7.7	53.3	2.3	6.6	83.4	26.6
	125	78.3				120.2	4	-3.9	88.6	18.1
	250		266.9	2.4	6.8	250.3	2	0.1	92.2	13.3
Curva de calibración (n=5): A=0.9281±0.0903, B=0.7802±0.5812, r ² =0.9985±0.0007										

(Continuación de la tabla 22)

Compuesto	Concentración (ng/ml)	Rendimiento (%)	Precisión y exactitud intradía (n=6)			Precisión y exactitud interdía (n=5)			Intensidad relativa de iones (n=5)	
			Media	CV	MRE	Media	CV	MRE	Media	CV
MDEA	2		2	11.2	-2.3	1.8	11	-9.1	102.6	8.4
	5	92.5				4.9	6.44	-1.9	107.2	10.3
	10		10.5	4.5	5.3	10.7	5.7	6.6	113	15.6
	25					25.7	5.1	2.9	107.2	10.3
	50		53.4	4.3	6.8	52.4	3	4.9	107.2	10.3
	125	83				120.5	2	-3.6	109.4	9.4
	250		266.1	2.6	6.4	251	1.4	0.4	111.7	7.9
Curva de calibración (n=5): A=0.9979±0.0921, B=0.6042±0.1015, r ² =0.9991±0.0005										
MBDB	2		1.8	5.5	-12.4	1.8	8.1	-8.7	77.2	33.4
	5	83.5				4.8	6.5	-3.2	66.7	14.1
	10		11	2.5	9.7	10.9	3.3	8.6	60.2	18.7
	25					25.7	3.5	2.7	61.6	3
	50		53.7	2.2	7.4	52.4	3.5	4.8	61.8	7.5
	125	69.7				118.3	2.3	-5.3	64.6	3.7
	250		256	2	2.4	253.1	0.8	1.2	64.7	6.9
Curva de calibración (n=5): A=0.6817±0.0337, B=0.2706±0.1602, r ² =0.9985±0.001										
A: punto de corte en el eje de ordenadas; B: pendiente de la curva.										

Tabla 23. Principales parámetros de validación para el método de determinación de los siete derivados anfetamínicos en sangre.

Compuesto	Concentración (ng/ml)	Rendimiento (%)	Precisión y exactitud intradía (n=6)			Precisión y exactitud interdía (n=6)			Intensidad relativa de iones (n=6)	
			Media	CV	MRE	Media	CV	MRE	Media	CV
Anfetamina	1	102.8	0.87	19.2	-12.8	0.9	20.3	-10	154.4	37.7
	2								146.5	35.3
	5								138.2	23.1
	10								135.6	14.4
	25	93.4	27.9	4.2	11.5	28.6	7.2	14.4	125.7	8
	50								126.3	11.3
	125								126.3	11.3
	250								122.7	4.6
Curva de calibración (n=6): B =0.3493±0.0263, A=0.3293±0.1706, r²=0.9966±0.0016										
Metanfetamina	1	99.2	0.9	9.5	-9	0.9	17.5	-10.8	83.5	5.3
	2								81.3	13.1
	5								80.7	10.2
	10								79.7	10.3
	25	101.4	27.3	4.2	9.3	26	5.3	3.9	83.9	8.5
	50								74.7	9.4
	125								74.7	9.4
	250								71.2	9.3
Curva de calibración (n=6): B =0.8955±0.0603, A=0.3551±0.104, r²=0.9978±0.002										
MDA	2	76.5	2	9.4	-0.1	2.3	9.6	15	188.9	9.1
	5								176.6	21.1
	10								182.1	20.8
	25		24	13.6	-4.2	24.9	13.9	-0.6	194.4	7
	50	93.5							194.4	7
	125								190.5	12.2
	250								188.9	9.1
Curva de calibración (n=6): B =0..2057±0.0121, A=0.1423±0.1409, r²=0.9926±0.0045										

(Continuación tabla 23)

Compuesto	Concentración (ng/ml)	Rendimiento (%)	Precisión y exactitud intradía (n=6)			Precisión y exactitud interdía (n=6)			Intensidad relativa de iones (n=6)	
			Media	CV	MRE	Media	CV	MRE	Media	CV
MDMA	1		0.8	8.5	-17.3	1	12.4	-1.2	62.6	4
	2								58.8	10.4
	5								58.7	9.7
	10	92.5							55.8	7.9
	25		24.1	12.8	-3.7	23.5	13.9	-5.9	58	8.1
	50								58.7	9.4
	125	94							59.2	8.4
	250		260.7	4.7	4.3	250	4.5	0.4	58.4	12.8
Curva de calibración (n=6): B =0.7739±0.0502, A=0.1127±0.3038, r ² =0.9966±0.002										
PMA	1		0.9	7.2	-10.2	1	18.6	1.3	113.1	21.4
	2								122.6	15.7
	5								123.6	19.7
	10	108							115.8	16.3
	25		23.1	8.1	-7.5	26.1	8.8	4.3	121.5	12
	50								121.5	12
	125	85.7							121.5	12
	250		259.7	3.4	3.9	250.1	2.4	0	121	10.5
Curva de calibración (n=6): B =0.15±0.0166, A=0.1213±0.505, r ² =0.9961±0.0042										
MDEA	1		0.8	5.2	-18.3	1	13.2	-4.8	75.2	13.7
	2								77.5	9.2
	5								76.4	8.6
	10	88.7							78.1	5.8
	25		27.5	4.9	10.1	26.1	9.5	4.5	77.1	4.9
	50								76.9	0
	125	97							78	3.4
	250		245.8	2.8	-1.7	241.7	3.2	-3.3	78.1	5.8
Curva de calibración (n=6): B =0.997±0.1113, A=0.2644±0.1163, r ² =0.9964±0.0044										
MBDB	1		0.9	3.2	-11.2	1	14.2	-1.3	45.7	14.4
	2								46.9	16.6
	5								43.2	9.6
	10	96.6							41.1	9
	25		27.9	3.2	11.6	25.5	8.5	2	41.1	9
	50								39.7	8.5
	125	94.6							39.7	8.5
	250		253.4	1.9	1.4	244	2.7	-2.4	38.7	9.3
Curva de calibración (n=6): B =0.867±0.0942, A=0.2914±0.0737, r ² =0.9978±0.0026										

A: punto de corte en el eje de ordenadas; B: pendiente de la curva.

Tabla 24. Principales parámetros de validación para el método de determinación de los siete derivados anfetamínicos en hígado.

Compuesto	Concentración (ng/g)	Rendimiento (%)	Precisión y exactitud intradía (n=6)			Precisión y exactitud interdía (n=6)			Intensidad relativa de iones (n=6)	
			Media	CV	MRE	Media	CV	MRE	Media	CV
Anfetamina	8		7.5	12.8	-5.9	9.1	6.8	14.2	122.82	20.9
	16								116.2	9
	40								111.6	7.1
	80	92.6							109.3	4.2
	200		179	5.6	-10.5	183.4	4.9	-8.3	111.6	7.1
	400	85.4							114.7	11.8
	1000								112.4	11.2
	2000		2252.5	2	12.6	2023.2	3.2	1.2	136.7	16.3
Curva de calibración (n=6): B =0.2708±0.0362, A=-0.3611±0.5151, r ² =0.9979±0.0032										
Metanfetamina	8		7.2	7.6	-10.5	7.5	8.2	-6.6	44.2	14
	16								42.5	8.6
	40								42.8	7.3
	80	95.2							41.1	9.4
	200		191.9	4.4	-4	204.3	5.5	2.1	40.3	3
	400	94.8							39.4	6.9
	1000								38.8	4.9
	2000		2067	2	3.4	2038.7	2.9	1.9	35.6	5.7
Curva de calibración (n=6): B =0.8608±0.0314, A=2.2459±0.36, r ² =0.9965±0.0031										
MDA	8		7.4	12.8	-7.2	7.6	11.9	-5	184.9	13.3
	16								211.1	15.5
	40								227.8	15.8
	80	84.9							225	12.2
	200		194.2	2.8	-2.9	202.1	6.5	1.1	225	12.2
	400	87.9							208.3	9.8
	1000								216.7	11.9
	2000		2245.6	3.5	12.3	2060.3	3	3	233.3	11.1
Curva de calibración (n=6): B =0.1773±0.009, A=1.1287±0.3964, r ² =0.9961±0.0032										

(Continuación tabla 24)

Compuesto	Concentración (ng/g)	Rendimiento (%)	Precisión y exactitud intradía (n=6)			Precisión y exactitud interdía (n=6)			Intensidad relativa de iones (n=6)	
			Media	CV	MRE	Media	CV	MRE	Media	CV
MDMA	8		7.4	6	-7.6	7.3	8.7	-9.1	74.3	22.8
	16								77.4	9.2
	40								87.6	9.2
	80	101.1							89.2	12.5
	200		197.1	8.4	-1.4	196.1	8.8	-1.9	85	9.1
	400	100.4							82.5	6.3
	1000								82.5	6.3
	2000		2065.4	3.7	3.3	2018.4	2	0.9	78.1	5.8
Curva de calibración (n=6): B =0.8556±0.026, A=2.356±1.6521, r ² =0.9982±0.001										
PMA	8		8.9	4.1	11.4	8.8	15.6	9.7	88.2	17
	16								77.9	18.1
	40								74.2	24.5
	80	80							68.9	22.7
	200		180.1	7.7	-9.9	186.2	11	-6.9	73.3	12.1
	400	79.6							73.2	11.8
	1000								73.2	11.8
	2000		2212.2	1.4	10.6	2048.4	2.6	2.4	90.8	28.4
Curva de calibración (n=6): B =0.2622±0.0552, A=-0.8129±1.3043, r ² =0.9974±0.0027										
MDEA	8		6.9	7.7	-13.7	6.5	4.3	-18.5	52.9	13.5
	16								52.5	8.4
	40								52.8	6.4
	80	92.3							56.5	13.4
	200		221	2.4	10.5	209.7	4.4	4.8	54	9.7
	400	96.7							55.3	12.1
	1000								55.3	12.1
	2000		1979.8	1.1	-1	1996.3	1.4	-0.2	52	8.4
Curva de calibración (n=6): B =1.0479±0.1417, A=5.4125±1.4429, r ² =0.9987±0.0008										
MBDB	8		6.6	3.2	-17.1	7.3	9.9	-8.9	40.6	43.5
	16								42.4	28
	40								45.1	19.3
	80	101							45.8	12.6
	200		209.4	3.8	4.7	202.5	4.6	1.3	47.2	8.6
	400	96.7							47.1	6.7
	1000								47.1	6.7
	2000		2094.5	1.4	4.7	2013.3	0.4	0.6	47.7	5
Curva de calibración (n=6): B =0.8127±0.055, A=2.4563±0.5448, r ² =0.9987±0.0008										

A: punto de corte en el eje de ordenadas; B: pendiente de la curva.

Tabla 25. Principales parámetros de validación para el método de determinación de los siete derivados anfetamínicos en orina.

Compuesto	Concentración (ng/ml)	Rendimiento (%)	Precisión y exactitud intradía (n=6)			Precisión y exactitud interdía (n=6)			Intensidad relativa de iones (n=6)	
			Media	CV	MRE	Media	CV	MRE	Media	CV
Anfetamina	1		0.9	14.3	-5.8	0.8	3.8	-16.5	44.9	14
	2								43.5	15.5
	5								40.7	16.3
	10								44	7.9
	20								43.5	8.9
	50	86.9	49.2	2.3	-1.7	49.8	4	-0.5	44.5	4.7
	100								45.9	4.4
	200								46	6.7
	500								46.2	4.9
	1000		992.7	2	-0.7	1002	2	0.2	48.1	3.6
Curva de calibración (n=6): B =1.0057±0.0444, A=0.4344±0.2918, r ² =0.9984±0.0009										
Metanfetamina	1		0.9	11.1	-8	0.9	7.7	-13.2	21.8	34.9
	2								21.4	30.7
	5								22.3	30.9
	10								22.42	24.1
	20								24.3	26.6
	50	92.3	47.9	2.3	-4.2	50.3	3	0.6	24.1	19.8
	100								27	16.8
	200		183.3	6.1	-8.3	197.1	1.1	-1.5	29.1	12.7
Curva de calibración (n=6): B =1.4912±0.1179, A=0.4383±0.321, r ² =0.9983±0.001										
MDA	2		1.8	9.2	-9.3	1.8	7.3	-9.8	39.2	16.1
	5								34.3	3.9
	10								33.8	4.9
	20								33.6	4.9
	50	85.9	48.9	3.2	-2.2	49.1	5.7	-1.8	32.6	3.4
	100								32.1	1.3
	200								33	4
	500								32.3	2
	1000		1001.8	1.5	0.2	993.7	2.4	-0.6	32	1.6
Curva de calibración (n=6): B =0.7493±0.0307, A=0.369±0.35, r ² =0.9982±0.0008										

(Continuación tabla 25)

Compuesto	Concentración (ng/ml)	Rendimiento (%)	Precisión y exactitud intradía (n=6)			Precisión y exactitud interdía (n=6)			Intensidad relativa de iones (n=6)	
			Media	CV	MRE	Media	CV	MRE	Media	CV
MDMA	1		0.8	8.1	-16.8	1	11.9	-3.3	30.3	13.1
	2								29.2	9.9
	5								29	8.7
	10								29.5	4.2
	20								29.7	6.8
	50	88.8	45.7	2.6	-8.6	48.6	4.3	-2.8	29	3.9
	100								29.4	2.6
	200								30.2	3.7
	500								29.3	2.2
	1000		991.6	1.8	-0.8	1005.2	2.1	0.5	29.3	1.2
Curva de calibración (n=6): B =0.9496±0.0439, A=0.0504±0.2129, r ² =0.9984±0.0007										
PMA	2		1.9	5.2	-6.7	1.8	9.52	-10	232.1	29.5
	5								171.4	18.3
	10								151.8	11.6
	20								148.8	13.9
	50	81.1	48.5	4.8	-2.9	50.6	4.8	1.1	142.9	0
	100								139.9	5.2
	200								143.9	9.2
	500								142.9	0
	1000		954.3	3.5	-4.6	1012.8	2.5	1.3	139.9	5.2
Curva de calibración (n=6): B =0.3132±0.0335, A=0.1821±0.1463, r ² =0.9969±0.0018										
MDEA	1		0.9	5	-5.8	0.9	7.4	-13.3	41.7	12.7
	2								41.1	12.8
	5								39.9	7.2
	10								39	8.6
	20								38.5	4.7
	50	88.3	48.1	3.2	-3.8	47.7	7.4	-4.6	38.8	4.3
	100								37.5	3
	200								36.6	3
	500								36.4	3.8
	1000		1004.8	7.5	0.5	1009.2	3.3	0.9	36	4.3
Curva de calibración (n=6): B =1.3052±0.0415, A=0.2675±0.2621, r ² =0.997±0.0013										
MBDB	1		0.8	4.5	-17.2	0.9	9.2	-6.3	49.6	2
	2								49.2	2.5
	5								50.4	2.1
	10								52.2	2
	20								51.3	2.8
	50	88.5	46.6	2.1	-6.9	47.9	4.6	-4.2	50.4	2.1
	100								51.8	2.6
	200								52.2	2
	500								53.1	2.3
	1000		1004.3	2.9	0.4	1021.9	1.9	2.2	53.2	4
Curva de calibración (n=6): B =1.2179±0.0286, A=0.1254±0.1312, r ² =0.997±0.0021										

A: punto de corte en el eje de ordenadas; B: pendiente de la curva.

2.3.3. Límites

En el método de determinación de anfetaminas, opiáceos y cocaína en plasma, el LOD fue de 0.5 ng/mL para la metanfetamina, la MDMA, la benzoilecgonina y la cocaína, y de 1 ng/mL para la morfina, la 6-monoacetilmorfina, la anfetamina, la MDA, la MDEA y la MBDB. El LLOQ y el ULOQ, que se corresponden respectivamente con el valor inferior y superior de la recta de calibrado, fueron 2 y 250 ng/mL para todos los compuestos.

En el método de determinación de los siete derivados anfetamínicos en sangre, el LOD fue de 0.5 ng/mL para todos ellos (anfetamina, metanfetamina, MDMA, PMA, MDEA y MBDB), excepto para la MDA, que fue de 1 ng/mL. El LLOQ y el ULOQ fueron 1 y 250 ng/mL. En el caso de la MDA, fueron 2 y 250 ng/mL.

Todos los derivados anfetamínicos presentaron como LOD en el método en hígado 4 ng/g. Los límites de cuantificación (LLOQ y ULOQ) fueron 8 y 2000 ng/g.

En el método de determinación de los siete derivados anfetamínicos en orina, el LOD fue de 0.2 ng/mL para la MDMA, la MDEA y la MBDB, de 0.5 ng/mL para la anfetamina, la metanfetamina y la PMA, y de 1 ng/mL para la MDA. Los límites de cuantificación (LLOQ y ULOQ) fueron 1 y 1000 ng/mL para la anfetamina, la MDMA, la MDEA y la MBDB, 1 y 200 ng/mL para la metanfetamina, y 2 y 1000 ng/mL para la MDA y la PMA.

2.3.4. Efecto matriz

El efecto matriz fue evaluado mediante el ensayo de infusión postcolumna, o bien, mediante el método de la adición postextracción. En ninguno de los métodos desarrollados para ninguno de los compuestos estudiados, se observó supresión iónica ni aumento iónico a su correspondiente tiempo de retención.

El método de infusión postcolumna se realizó separadamente para cada compuesto, monitorizando las *m/z* correspondientes al ión de cuantificación y al ión de confirmación del compuesto estudiado, a lo largo de todo el cromatograma. La infusión postcolumna de cada analito a una concentración de 10 µg/mL y a un flujo de 10 µL/min, se unió al flujo procedente de la fase

móvil, tras la inyección de una muestra blanco o de fase móvil, mediante una “T”, y la mezcla resultante se introdujo en el espectrómetro de masas.

Esta técnica fue empleada en el estudio del efecto matriz en el método de determinación de morfina, 6-monoacetilmorfina, anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, benzoilecgonina y cocaína en plasma, y en los métodos de determinación de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, PMA, MDEA y MBDB en sangre y en hígado, mediante LC-MS. Algunos de los cromatogramas obtenidos aparecen reflejados en las figuras 88-90.

El método de la adición postextracción consistió en comparar las señales obtenidas tras la adición de patrones a muestras blanco, previamente extraídas según el método descrito, con las señales de los patrones preparados a una concentración equivalente en fase móvil.

Este método fue aplicado en el estudio del efecto matriz en el método de determinación de los siete derivados anfetamínicos en orina mediante LC-MS/MS. El estudio fue realizado a una concentración de 50 ng/mL, utilizando tres replicados de los patrones en fase móvil, y nueve orinas blanco procedentes de individuos distintos, a las que tras la extracción se les añadió la correspondiente cantidad de patrón. El porcentaje de efecto matriz fue calculado como $(\text{Área media patrones en fase móvil} - \text{Área media blancos orina dopados postextracción}) \times 100 / \text{Área media patrones en fase móvil}$ (tabla 26). Si el efecto matriz calculado de esta manera es menor que $\pm 15\%$, se considera que no hay efecto matriz.

Tabla 26. Efecto matriz de la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la PMA, la MDMA, la MDEA, la MBDB, la anfetamina-d₆, la MDA-d₅, la MDMA-d₅ y la MBDB-d₅ en el método de determinación de estos compuestos en orina.

Compuesto	Área patrón 50ng/mL (n=3)		Área orina dopada post extracción 50ng/mL (n=9)		Efecto matriz (%)
	Media	CV	Media	CV	
Anfetamina	82845.33	4.53	71341.00	5.56	-13.89
Metanfetamina	163348.33	2.08	145707.89	6.58	-10.80
MDA	26589.00	6.11	29191.67	10.29	9.79
PMA	19490.00	3.81	21577.22	8.39	10.71
MDMA	83572.00	4.21	90077.44	7.98	7.78
MDEA	178239.67	2.61	170137.89	6.66	-4.55
MBDB	163972.67	3.39	148943.22	6.32	-9.17
Anfetamina-d ₆	71342.67	4.26	87599.44	7.21	-5.25
MDA-d ₅	32320.33	5.63	37141.11	11.78	14.92
MDMA-d ₅	86019.67	3.18	95131.58	7.29	10.59
MBDB-d ₅	132097.33	3.00	124624.78	5.46	-5.66

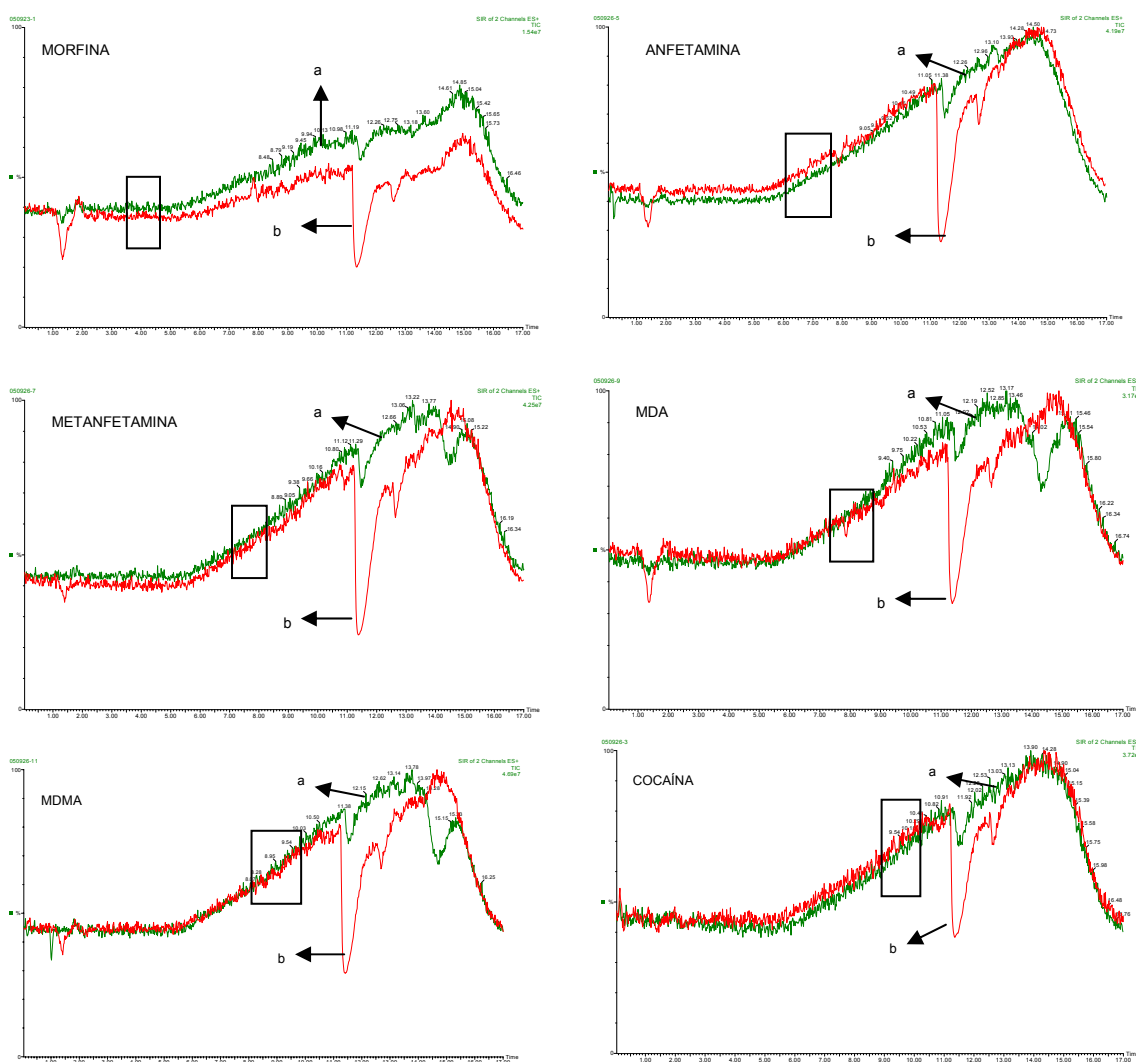


Figura 88. Evaluación del efecto matriz para la morfina, la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la MDMA y la cocaína en el ensayo de infusión postcolumna tras la inyección de fase móvil (a, cromatograma verde) y de un plasma blanco previamente extraído (b, cromatograma rojo). El recuadro negro indica el tiempo de retención del compuesto correspondiente.

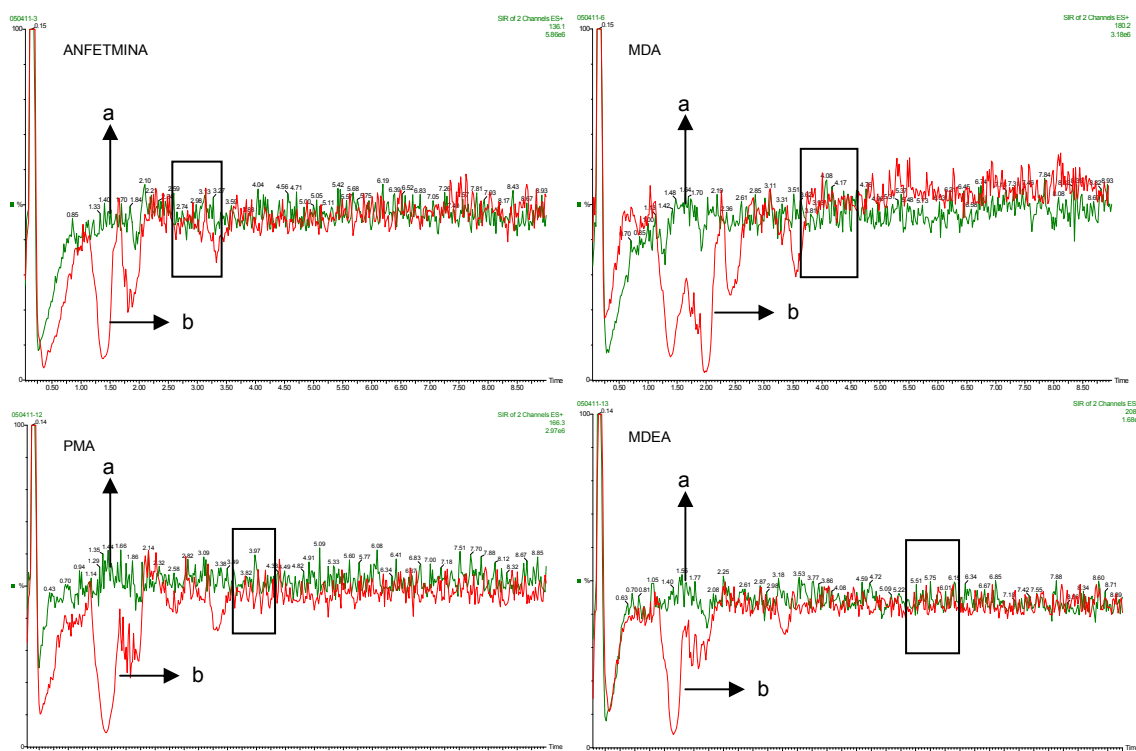


Figura 89. Evaluación del efecto matriz para la anfetamina, la MDA, la PMA y la MDEA en el ensayo de infusión postcolumna tras la inyección de fase móvil (a, cromatograma verde) y de una sangre blanca previamente extraída (b, cromatograma rojo). El recuadro negro indica el tiempo de retención del compuesto correspondiente.

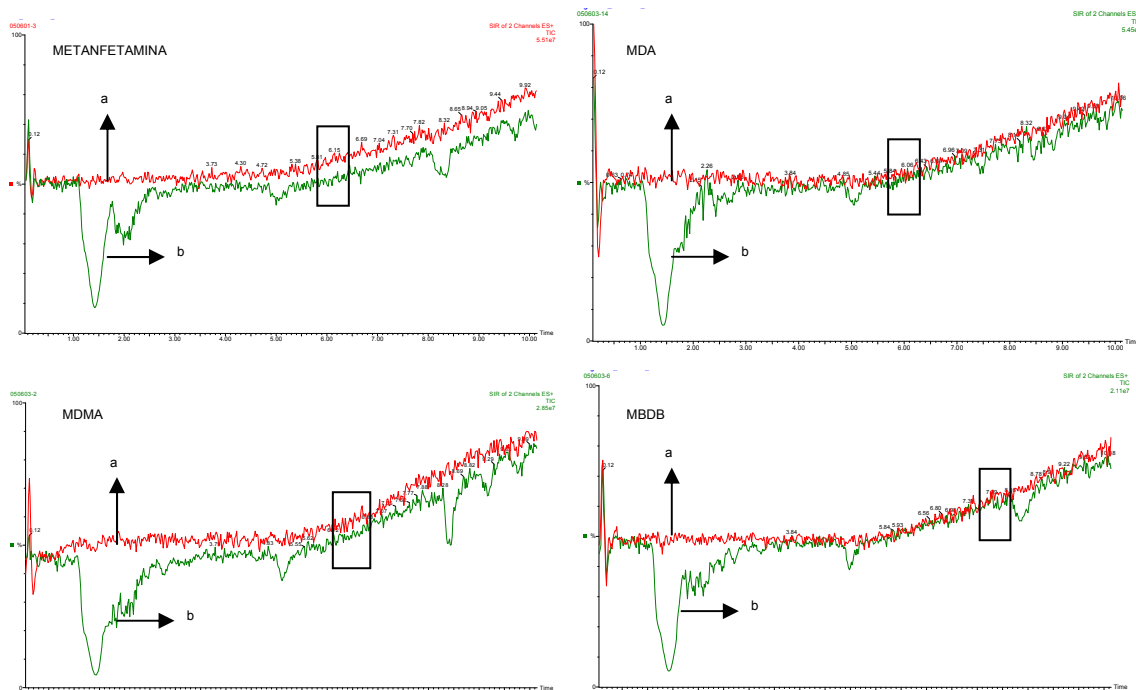


Figura 90. Evaluación del efecto matriz para la metanfetamina, la MDA, la MDMA y la MBDB en el ensayo de infusión postcolumna tras la inyección de fase móvil (a, cromatograma verde) y de un hígado blanco previamente extraído (b, cromatograma rojo). El recuadro negro indica el tiempo de retención del compuesto correspondiente.

2.3.5. Estabilidad

El estudio de estabilidad fue realizado tras tres ciclos de congelación y descongelación para los siguientes compuestos y matrices: morfina, 6-MAM, cocaína, benzoilecgonina, anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA y MBDB en plasma; anfetamina, metanfetamina, PMA, MDA, MDMA, MDEA y MBDB en sangre y en orina. Los resultados obtenidos aparecen recogidos en las tablas 27-29.

Tabla 27. Estabilidad de las drogas básicas en plasma a 5 y 50 ng/mL tras tres ciclos de congelación/descongelación.

Compuesto	5 ng/mL		50 ng/mL	
	CV	MRE	CV	MRE
Morfina	5,8	4,7	2,1	-8,4
6-MAM	3,2	16,7	3,4	-1,6
Benzoilecgonina	2,4	-3	6	0,5
Cocaína	1,6	-6	7,3	-15,6
Anfetamina	5,6	49,2	6,1	-3,5
Metanfetamina	10,2	30,8	7,1	-7,4
MDA	1,7	13,3	7,2	-4,9
MDMA	7,6	0,7	4,2	-6
MDEA	6,3	15,7	5,9	-4,9
MBDB	3,6	0,7	5,8	-4,7

Tabla 28. Estabilidad de los siete derivados anfetamínicos en sangre a 5 y 50 ng/mL tras tres ciclos de congelación/descongelación.

Compuesto	5 ng/mL		50 ng/mL	
	CV	MRE	CV	MRE
Anfetamina	11,5	1,4	8,9	2,3
Metanfetamina	6,8	0,1	7,4	3,5
MDA	2,3	-1,3	5,2	-8
MDMA	9,5	11,3	7,6	-4,1
PMA	20,8	2,6	11,2	6,9
MDEA	6	-1,8	3,4	-15,7
MBDB	12	18,3	0,7	0,9

Tabla 29. Estabilidad de los siete derivados anfetamínicos en orina a 5 y 50 ng/mL tras tres ciclos de congelación/descongelación.

Compuesto	5 ng/mL		50 ng/mL	
	CV	MRE	CV	MRE
Anfetamina	2,5	-1,5	1,6	-5,7
Metanfetamina	2	1,9	1,1	-0,8
MDA	0,5	0,9	0,9	-4
MDMA	1	-2,3	3,2	-6
PMA	2,7	-2,1	1,6	-6,9
MDEA	5,3	-11,7	5	-7,5
MBDB	2,8	-1,1	1,5	-5,1

En todos los casos los compuestos estudiados fueron estables tras tres ciclos de congelación/descongelación. Sin embargo, en el caso de la anfetamina y de la metanfetamina en el método de determinación de anfetaminas, opiáceos y cocaína en muestras de plasma, se observó un ligero aumento de la señal correspondiente a la concentración de 5 ng/mL. Al no observarse ninguna sustancia interferente en los cromatogramas de las muestras blanco sometidas igualmente a los tres ciclos de congelación/descongelación, este aumento puede deberse a la aparición, en estas condiciones, de compuestos coeluyentes que producían un efecto matriz con aumento de la señal de los iones. Como consecuencia de estos hallazgos, deberá profundizarse en estudios de estabilidad tras largos períodos de almacenamiento,

2.3.6. Aplicación a casos reales

2.3.6.1. Aplicación a casos reales del Instituto Universitario de Medicina Legal de Santiago de Compostela

El método de determinación de anfetaminas, opiáceos y cocaína en plasma, ha sido aplicado a los casos clínicos y forenses remitidos al Servicio de Toxicología del IUML presumiblemente positivos a alguno de estos compuestos. En este trabajo se recogen los casos analizados desde enero de 2005 a junio de 2006 (208 casos). De estos 208 casos, 65 resultaron positivos para alguna de las sustancias estudiadas, siendo 41 positivos a cocaína y/o a su metabolito benzoilecgonina, 9 positivos a morfina y/o 6-monoacetilmorfina, 1 positivo a anfetaminas, 9 a una combinación cocaína + opiáceos, 4 a una combinación cocaína + anfetaminas, y 1 caso positivo a una combinación de cocaína + opiáceos + anfetaminas. Según estos datos, la prevalencia de anfetaminas en casos de importancia clínica o judicial en nuestro entorno es muy baja (2.9% de los casos estudiados), siendo la cocaína la droga ilegal que ocupa el lugar más destacado (26% de los casos estudiados). La tabla 30 recoge los resultados obtenidos en los casos positivos.

Tabla 30. Resultados analíticos de los casos clínico/judiciales del IUML positivos, indicando el lugar de procedencia del mismo, la edad/sexo del sujeto, el resultado cuantitativo en plasma de las sustancias estudiadas, y otros hallazgos, como alcohol y otras sustancias presentes.

Nº de caso	Procedencia	Edad/Sexo	Droga y/o metabolito (ng/mL)	Otros hallazgos
33/05	CHUS (Urgencias)	22 años/H	Benzoilecgonina = 8	-
36/05	Juzgado nº 1 de Betanzos	? años/H	Morfina = 387 6-MAM = 8.6 Benzoilecgonina = 70	-
77/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	41 años/H	Benzoilecgonina = 1000	Alcohol = 0.75 g/L
153/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	? años/M	Anfetamina = 3.3 Metanfetamina < LOQ	-

(Continuación tabla 30)

Nº de caso	Procedencia	Edad/Sexo	Droga y/o metabolito (ng/mL)	Otros hallazgos
207/05	Juzgado nº 6 de Vigo	? años/M	Benzoilecgonina = 50	-
234/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	22 años/H	Benzoilecgonina = 110.7	Alcohol = 1.18 g/L
277/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	36 años/H	Benzoilecgonina = 217	Alcohol = 1.42 g/L
317/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	40 años/M	Morfina = 10 Benzoilecgonina = 1027	-
481/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	36 años/H	Morfina = 23 Benzoilecgonina = 645	Alcohol = 0.43 g/L
513/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	19 años/H	Benzoilecgonina = 380 Anfetamina < LOQ Metanfetamina = 4.6 MDA = 8 MDMA = 3.1	Alcohol = 0.67 g/L
583/05	CHUS (Urgencias)	36 años/H	Morfina = 15 Benzoilecgonina = 786	-
615/05	CHUS (Urgencias)	22 años/H	Morfina = 6 Benzoilecgonina = 400	-
651/05	CHUS (Urgencias)	21 años/H	Benzoilecgonina = 36 Anfetamina = 84 MDA = 22 MDMA = 570 MDEA = 16	-
711/05	CHUS (Urgencias)	32 años/H	Benzoilecgonina = 24 Cocaína = 12	Alcohol = 1.78 g/L
790/05	CHUS (Urgencias)	26 años/H	Benzoilecgonina = 11	-
806/05	CHUS (Psiquiatría)	41 años/H	Morfina = 5.6	-
940/05	CHUS (Urgencias)	18 años/M	Benzoilecgonina = 40	Alcohol = 1.71 g/L
980/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	36 años/H	Benzoilecgonina = 140 Morfina = 10	-
995/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	42 años/H	Benzoilecgonina = 70	Alcohol = 1.83 g/L
1105/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	34 años/H	Morfina = 17.4 6-MAM = 2	Alcohol = 0.73 g/L
1118/05	CHUS (Psiquiatría)	29 años/H	Benzoilecgonina = 3600	-

(Continuación tabla 30)

Nº de caso	Procedencia	Edad/Sexo	Droga y/o metabolito (ng/mL)	Otros hallazgos
1266/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	31 años/M	Benzoilecgonina = 147.6	Alcohol = 2.38 g/L
1382/05	CHUS (Urgencias)	25 años/M	Benzoilecgonina = 541.5	-
1387/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	20 años/M	Benzoilecgonina = 20 Metanfetamina = 2 MDA = 2.6 MDMA = 231	Alcohol = 0.68 g/L
1404/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	32 años/M	Benzoilecgonina = 573.4	-
1430/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	25 años/H	Benzoilecgonina = 984.9	-
1445/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Pediatria)	23 años/M	Benzoilecgonina = 176.8	-
1446/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	22 años/H	Benzoilecgonina = 45.4	-
1509/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	22 años/H	Benzoilecgonina = 20.6	Alcohol = 1.99 g/L
1526/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	31 años/H	Benzoilecgonina = 4574	-
1531/05	CHUS (UCI)	34 años/H	Benzoilecgonina = 10424	-
1532/05	CHUS (Urgencias)	39 años/H	Benzoilecgonina = 10.9	-
1551/05	CHUS (UCI)	34 años/H	Benzoilecgonina = 238.3	-
1561/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	35 años/H	Benzoilecgonina = 1616.2	Alcohol = 3.56 g/L
1629/05	CHUS (Psiquiatria)	26 años/H	Benzoilecgonina = 1927.5	-
1655/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	34 años/H	Benzoilecgonina = 1844.7 Cocaína = 6.2 Morfina = 67.2 6-MAM = 26.6	-
1698/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	40 años/H	Benzoilecgonina = 618.3	Alprazolam = 109.5 ng/mL Diazepam = 26 ng/mL

(Continuación tabla 30)

Nº de caso	Procedencia	Edad/Sexo	Droga y/o metabolito (ng/mL)	Otros hallazgos
1733/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	34 años/H	Morfina = 3.8	-
1759/05	Juzgado nº 5 de Santiago	21 años/H	Benzoilecgonina = 60.8	-
1769/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	27 años/H	Benzoilecgonina = 176 Morfina = 198.4	Alcohol = 1.21 g/L
1784/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	28 años/M	Benzoilecgonina = 15.5	Alcohol = 0.16 g/L
1819/05	Juzgado nº 1 de Betanzos	54 años/H	Morfina = 160.7 6-MAM = 3.8	-
1984/05	CHUS (Urgencias)	43 años/H	Morfina = 2.4	Alprazolam = 47 ng/mL Diacepam = 10 ng/mL
1993/05	CHUS (Críticos)	38 años/H	Benzoilecgonina = 1192 Cocaína = 87	-
2012/05	Juzgado nº 2 de Lalín	32 años/H	Benzoilecgonina = 264 Cocaína = 14	Alcohol = 1.41 g/L
2053/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	24 años/H	Benzoilecgonina = 112	Alcohol = 1.52 g/L
2055/05	CHUS (Urgencias)	27 años/M	Benzoilecgonina = 464	Alcohol = 1.29 g/L
2104/05	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	25 años/H	Benzoilecgonina = 12	Alcohol = 3.22 g/L
70/06	Juzgado nº 1 de Corcubión	24 años /H	Benzoilecgonina = 129 Cocaína = 5.7	Alcohol = 1.64 g/L
193/06	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	20 años/H	Benzoilecgonina = 19.2	Alcohol = 1.78 g/L
306/06	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	26 años/H	Benzoilecgonina = 423.2 Cocaína = 16.7	Alcohol = 2.04 g/L
489/06	CHUS (UCI)	48 años/H	Morfina = 11.7	Alcohol = 1.16 g/L
504/06	CHUS (Urgencias)	? años/H	Benzoilecgonina = 18	Alcohol = 2.17 g/L
551/06	CHUS (Unidad Coronarias)	39 años/H	Morfina = 27.2	-
558/06	CHUS (Urgencias)	24 años/H	Benzoilecgonina = 1197	-

(Continuación tabla 30)

Nº de caso	Procedencia	Edad/Sexo	Droga y/o metabolito (ng/mL)	Otros hallazgos
581/06	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	25 años/H	Benzoilecgonina = 10.5	Alcohol = 1.26 g/L
582/06	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	25 años/H	Benzoilecgonina = 1210.4	-
842/06	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	43 años/H	Morfina = 13	Alcohol = 1.45 g/L
897/06	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	40 años/H	Benzoilecgonina = 13.3	-
935/06	CHUS (UCI)	23 años/H	Morfina = 51.3 Benzoilecgonina = 604.4 MDA = 6.2 MDMA = 43.7	-
1064/06	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	26 años/H	Benzoilecgonina = 838.8 Cocaína = 39.1	-
1120/06	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	27 años/M	Morfina = 25 Benzoilecgonina = 143.3	-
1143/06	CHUS (Anatomía Patológica)	? años/H	Morfina = 65.6	-
1292/06	Hospital Comarcal del Barbanza (Urgencias)	25 años/H	Benzoilecgonina = 3100 MDMA = 4.2	-

CHUS: Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela; H: Hombre; M: Mujer.

Este método también ha sido aplicado en los casos de muertes en accidentes de tráfico, remitidos al Servicio de Toxicología del IUML desde enero del año 2004 hasta junio del año 2006. Fueron estudiados un total de 237 casos. Un 44.7% de las muestras analizadas presentaron algún tipo de sustancia psicoactiva. Dentro de este 44.7%, un 80.2% presentó sólo alcohol, un 13.2% alcohol y drogas de abuso, y un 6.6% sólo drogas. De los 21 casos positivos a alguna de las sustancias estudiadas, 17 lo fueron a cocaína, 1 a anfetaminas, 1 a la combinación cocaína+opiáceos, y 2 a la combinación cocaína+anfetamina. La tabla 31 recoge los resultados obtenidos para estos 21 casos.

Tabla 31. Resultados cuantitativos de los casos de muertes en accidentes de tráfico del IUML positivos a alguna de las drogas investigadas, indicando además la edad, el sexo, y otros hallazgos del laboratorio.

Nº de caso	Edad/Sexo	Droga y/o metabolito (ng/mL)	Otros hallazgos
7/04	? años/H	Benzoilecgonina = 47.3	Alcohol = 0.2 g/L
447/04	19 años/H	Benzoilecgonina = 12.8	THC = 14 ng/mL
591/04	21 años/H	Benzoilecgonina = 38.7 Cocaína = 8.4	Alcohol = 1.86 g/L
918/04	28 años/H	Benzoilecgonina = 36	Alcohol = 1.66 g/L
1313/04	? años/H	Benzoilecgonina = 680	-
1355/04	28 años/M	Benzoilecgonina = 310	-
1459/04	32 años/H	Benzoilecgonina = 15	Alcohol = 3.19 g/L
104/05	26 años/M	Benzoilecgonina = 1600	-
114/05	24 años/H	Benzoilecgonina = 1200 Cocaína = 30	Alcohol = 1.1 g/L
490/05	24 años/H	Metanfetamina = 6 MDA = 13	Alcohol = 2.52 g/L
642/05	35 años/H	Benzoilecgonina = 1600 Cocaína = 18	Alcohol = 2.05 g/L
926/05	16 años/H	Benzoilecgonina = 1042 Cocaína = 108.9	Alcohol = 0.99 g/L
1247/05	21 años/H	Benzoilecgonina = 130.6	-
1818/05	24 años/H	Benzoilecgonina = 342.8	Alcohol = 0.89 g/L
1975/05	? años/H	Morfina = 15 Benzoilecgonina = 333	-
2044/05	? años/H	Benzoilecgonina = 111.9 MDMA < LOQ	Alcohol = 0.39 g/L
2104/05	24 años/H	Benzoilecgonina = 11.6	Alcohol = 3.22 g/L
27/06	37 años/H	Benzoilecgonina = 176	Alcohol = 1.28 g/L
86/06	23 años/H	Benzoilecgonina = 66.4	Alcohol = 1.14 g/L
750/06	25 años/H	Benzoilecgonina = 596 Anfetamina = 19 MDA = 30.7 MDMA = 327.9	-
1037/06	42 años/H	Benzoilecgonina = 813 Cocaína = 23.9	Alcohol = 0.39 g/L

H: Hombre; M: Mujer.

A continuación se muestran los cromatogramas correspondientes a algunos de los casos analizados (fig. 91-95):

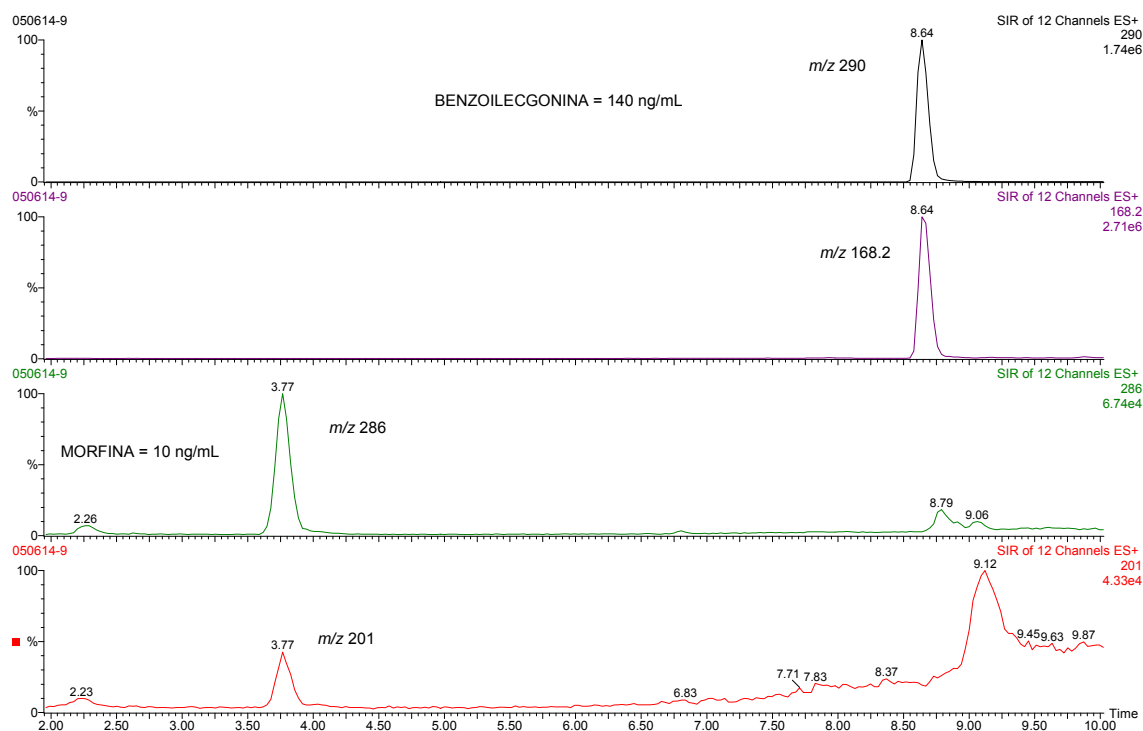


Figura 91. Cromatogramas de los iones de cuantificación y de confirmación de la morfina (m/z 286 y 201) y de la benzoilecgonina (m/z 290 y 168.2), del caso 980/05.

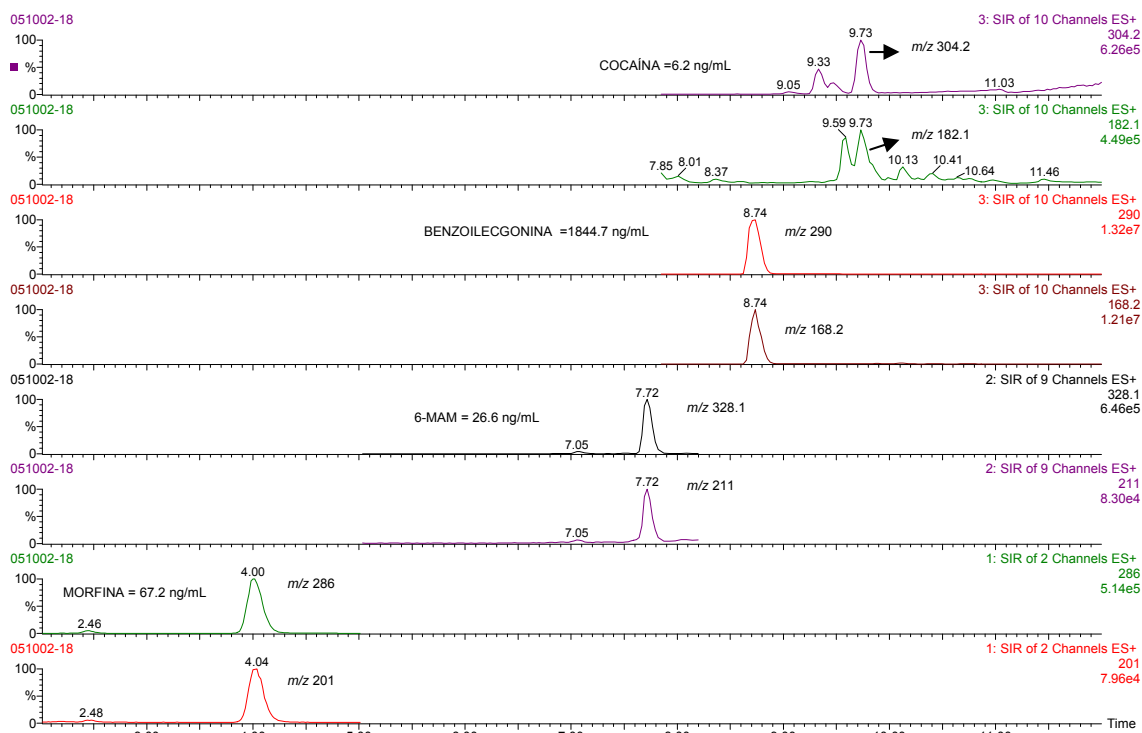


Figura 92. Cromatogramas de los iones de cuantificación y de confirmación de la morfina (m/z 286 y 201), la 6-monoacetilmorfina (m/z 328.1 y 211), la benzoilecgonina (m/z 290 y 168.2), y la cocaína (m/z 304.2 y 182.1), del caso 1655/05.

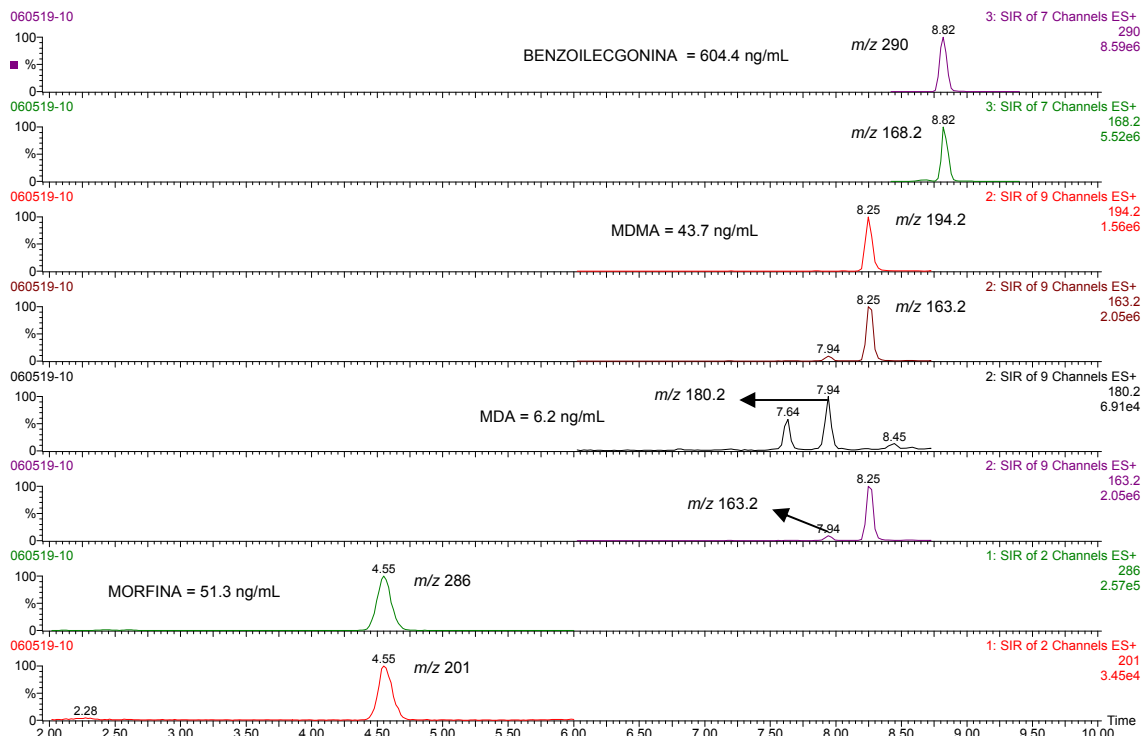


Figura 93. Cromatogramas de los iones de cuantificación y de confirmación de la morfina (m/z 286 y 201), la MDA (m/z 180.2 y 163.2), la MDMA (m/z 194.2 y 163.2), y la benzoilecgonina (m/z 290 y 168.2), del caso 935/06.

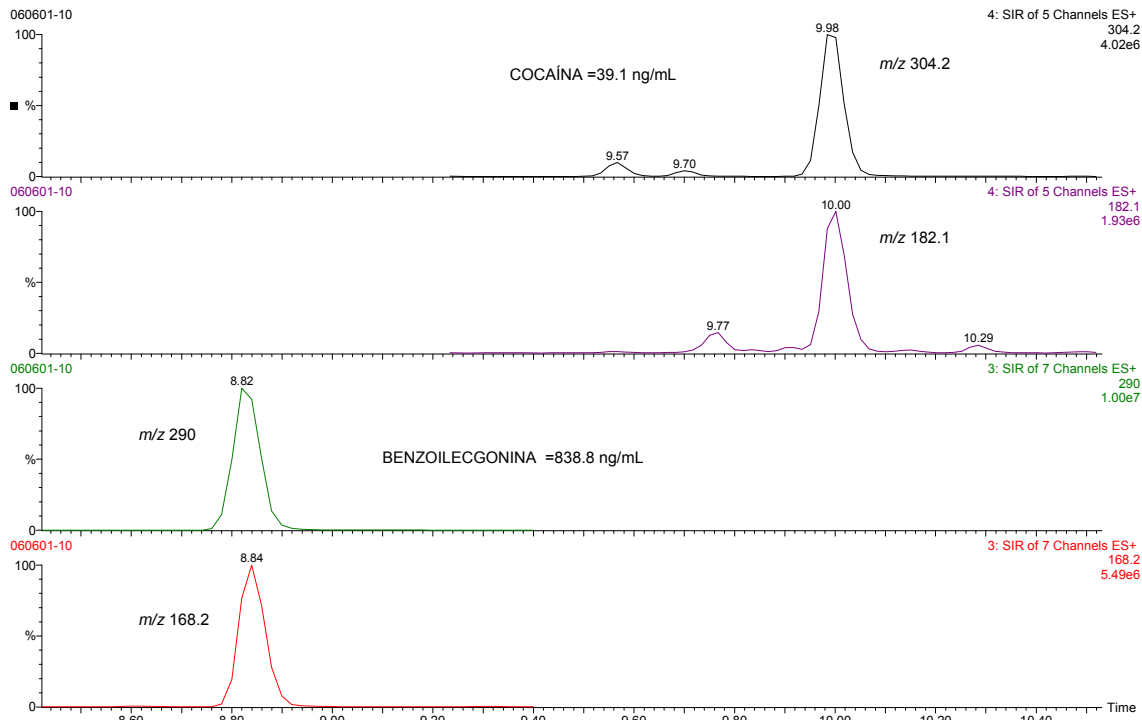


Figura 94. Cromatogramas de los iones de cuantificación y de confirmación de la benzoilecgonina (m/z 290 y 168.2), y la cocaína (m/z 304.2 y 182.1), del caso 1064/06.

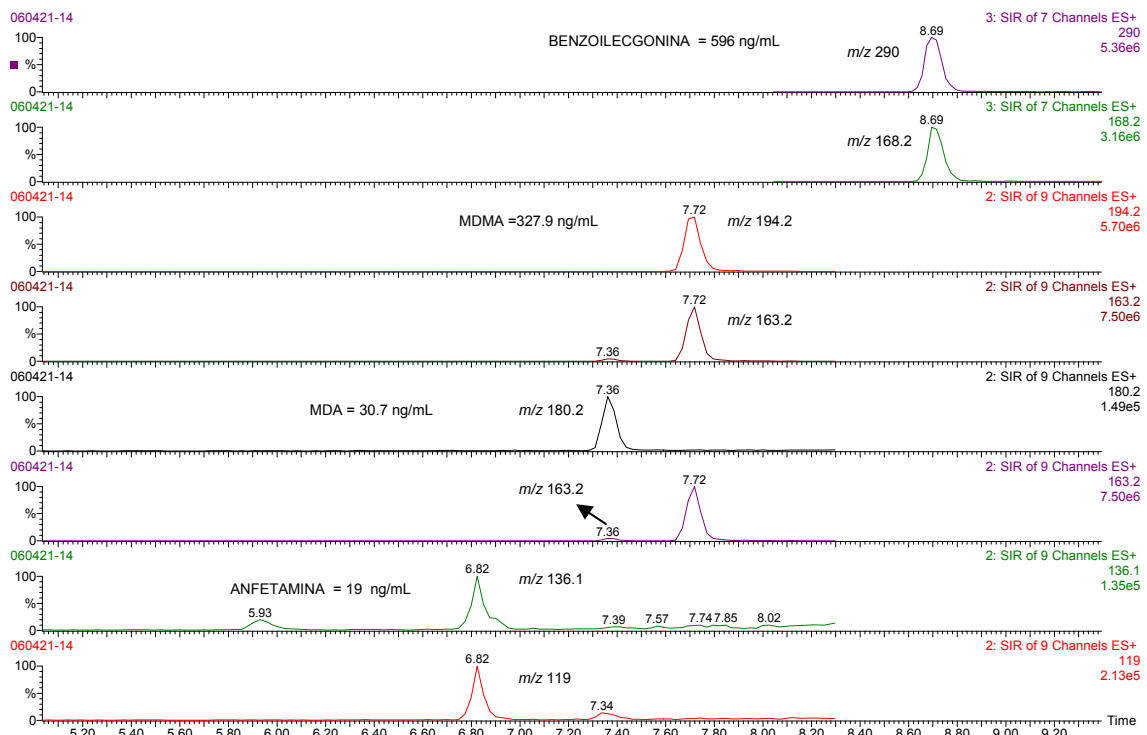


Figura 95. Cromatogramas de los iones de cuantificación y de confirmación de la anfetamina (m/z 136.1 y 119), la MDA (m/z 180.2 y 163.2), la MDMA (m/z 194.2 y 163.2), y la benzoilecgonina (m/z 290 y 168.2), del caso 750/06.

2.3.6.2. Aplicación a casos reales de la Delegación en Lisboa del Instituto Nacional de Medicina Legal

Los métodos de determinación de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, PMA, MDEA y MBDB en sangre, orina e hígado, fueron aplicados a todos los casos positivos a anfetaminas que fueron remitidos a la Delegación en Lisboa del Instituto Nacional de Medicina Legal entre los años 2003 y 2005. Un total de 16 casos fueron analizados, siendo 11 muestras de sujetos vivos y 5 muestras postmortem. Los resultados obtenidos aparecen recogidos en las tablas 32 y 33. Las figuras 96-99 muestran los cromatogramas obtenidos en algunos de los casos estudiados.

La media de edad $\pm$ la desviación estándar (SD) de los sujetos vivos fue de 28.9 ± 6 años, siendo 7 de ellos hombres y 4 mujeres. La gran mayoría de los casos fueron accidentes de tráfico (10 de los 11 casos), y uno de los casos fue una víctima de una agresión sexual. El derivado anfetamínico hallado en todas las muestras fue la MDMA. Otros derivados hallados pero en mucha menor concentración, fueron la MDA, la MDEA, la anfetamina y la metanfetamina. Los niveles hallados en sangre oscilaron entre 15 y 1084.1 ng/mL, con una media ($\pm$ SD) de 436.3 ± 362.2 ng/mL, y una mediana de 390ng/mL, y los niveles en orina estuvieron entre 455.9 y 60910ng/mL, con una media $\pm$ SD de 35214 ± 26799.7 ng/mL, y una mediana de 42720ng/mL.

La media de edad ($\pm$ SD) de los cadáveres fue de 26.8 ± 9.3 años, siendo todos ellos hombres. Dos de las muertes se consideraron debidas a una intoxicación por drogas, mientras que las otras tres fueron muertes relacionadas con su consumo (precipitación, homicidio y accidente de tráfico).

Tabla 32. Resultados cuantitativos de las anfetaminas presentes en las muestras procedentes de sujetos vivos de la Delegación en Lisboa del INML, indicando además para cada caso la edad, el sexo, información del caso, y otros hallazgos del laboratorio.

Nº de caso	Edad/Sexo	Información del caso	Anfetaminas			Otros hallazgos	
			Sangre (ng/mL)	Orina (ng/mL)	Sangre	Orina	
STF03-00014	25 años/H	Accidente de tráfico (Peatón)	MDA = 5.8 MDMA = 122.6 MDEA = 20.6	MDA = 3050 MDMA = 59990 MDEA = 10210	Alcohol = 0.69 g/L	-	
STF03-01466	29 años/M	Accidente de tráfico (Conductor)	MDA = 30.3 MDMA = 902.1	M.N.D.	Beg = 210 ng/mL	M.N.D.	
STF03-02346	38 años/H	Accidente de tráfico	MDA = 5.5 MDMA = 267.5	M.N.D.	Alcohol = 1.18 g/L Beg = 228 ng/mL	M.N.D.	
STF03-02794	29 años/H	Accidente de tráfico (Conductor)	M.N.D.	A = 258 MA = 7 MDA = 878 MDMA = 9223	M.N.D.	Beg = 99 ng/mL THC-COOH = 362 ng/mL	
STF03-02804	31 años/M	Accidente de tráfico (Conductor)	MDA = 1.6 MDMA = 390	M.N.D.	Beg = 2080 ng/mL Diacepam = 54 ng/mL	M.N.D.	
STF03-03326	27 años/H	Accidente de tráfico (Conductor)	MDA = 28.8 MDMA = 152.9	MDA = 417 MDMA = 4783	-	-	
STF03-03645	29 años/H	Accidente de tráfico (Conductor)	MDA = 52.7 MDMA = 1084.1 MDEA = 3.2	A = 2.1 MDA = 1490 MDMA = 33480 MDEA = 60.5	-	-	

(Continuación tabla 32)

N° de caso	Edad/Sexo	Información del caso	Anfetaminas			Otros hallazgos	
			Sangre (ng/mL)	Orina (ng/mL)	Sangre	Orina	
STF04-00166	26 años/H	Accidente de tráfico (Conductor)	MDA = 8.7 MDMA = 593.7	MDA = 3030 MDMA = 60910	Beg = 64 ng/mL	-	
STF04-01160	17 años/M	Víctima de agresión sexual	M.N.D.	MDA = 2330 MDMA = 60910	M.N.D.	THCCOOH = 334 ng/mL	
STF05-00537	39 años/M	Accidente de tráfico (Conductor)	MDA = 8.3 MDMA = 15	MA < LOQ MDA = 236.4 MDMA = 455.9	Alcohol = 1.69 g/L	-	
STF05-00660	28 años/H	Accidente de tráfico (Conductor)	MDA = 16.3 MDMA = 398.7 MDEA = 2.1	A = 31.9 MA = 40.5 MDA = 3680 MDMA = 51960 MDEA = 246.4	-	-	

M.N.D.: Muestra no disponible.

Tabla 33. Resultados cuantitativos de las anfetaminas presentes en las muestras postmortem de la Delegación en Lisboa del INML, indicando además para cada caso la edad, el sexo, información del caso, y otros hallazgos del laboratorio.

Nº de caso	Edad/Sexo	Información del caso	Anfetaminas					Otros hallazgos		
			Sangre cardiaca (ng/mL)	Sangre periférica (ng/mL)	Orina (ng/mL)	Hígado (ng/g)	Riñón (ng/g)	Estómago (ng/g)	Contenido Gástrico (ng/mL)	Sangre periférica Orina
STF03-00370	20 años/H	Precipitación	MDA =14 MDMA =147	MDMA=32	MA=19.6 MDA=255.3 MDMA=24860	M.N.D.	M.N.D.	M.N.D.	M.N.D.	Beg=100ng/mL 1880ng/mL THCCOOH = 90 ng/mL
STF03-02919	25 años/H	Homicidio. Lesiones traumáticas	A =178 MDA=13 MDMA =3581	A=5.5	M.N.D.	M.N.D.	M.N.D.	M.N.D.	M.N.D.	-
STF 04-01825	43 años/H	Intoxicación por drogas	MDA=116 MDMA=9352	MDA=132.5 MDMA=8229	M.N.D.	MDA=88.8 MDMA=5343	MDA=238.7 MDMA=6099	MDMA = 25250*	M.N.D.	-
STF04-02378	24 años/H	Intoxicación por drogas	MDA=90.5 MDMA=917.8	MDA=45.7 MDMA=764.6	M.N.D.	MA < LOQ MDA=549.2 MDMA=5962	MA < LOQ MDA=1196.8 MDMA=5871	M.N.D.	MDA=885.4* MDMA=11948*	Morfina=136ng/mL Beg=498ng/mL Alcohol=0.49g/L
STF05-00977	22 años/H	Accidente de tráfico (Conductor)	MDA=2.3 MDMA=42.9	MDA=1.5 MDMA=30	M.N.D.	M.N.D.	M.N.D.	M.N.D.	M.N.D.	-

* Resultado semicuantitativo
M.N.D.: Muestra no disponible.

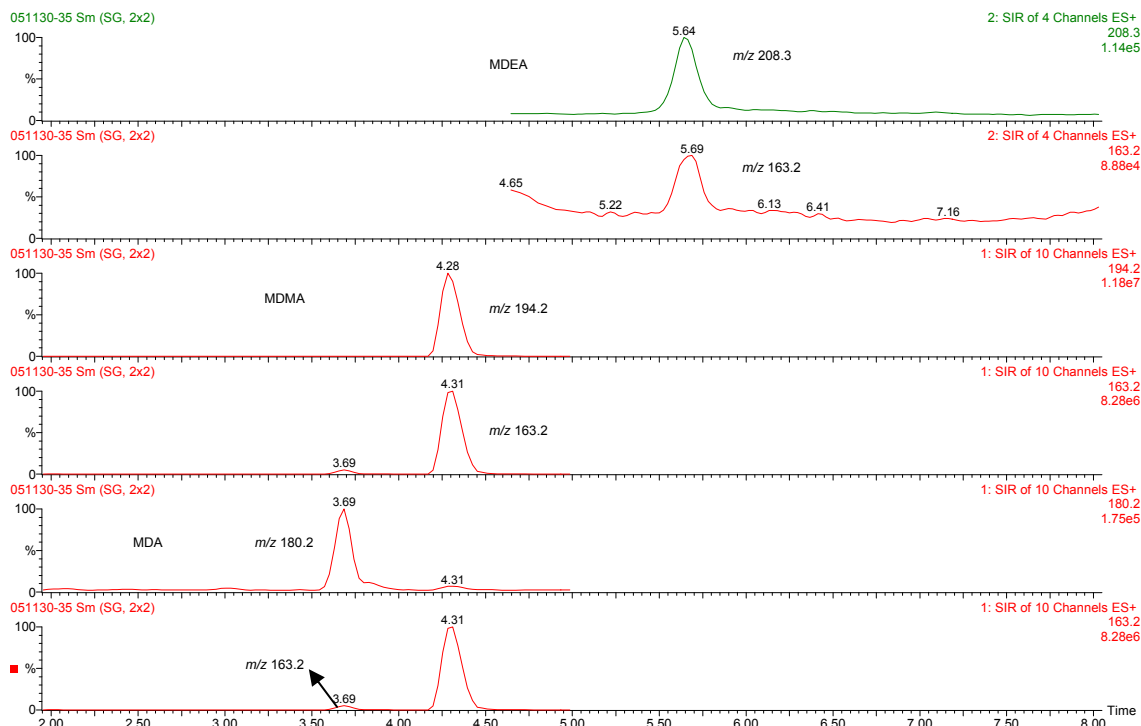


Figura 96. Cromatogramas en modo SIM de los iones de cuantificación y de confirmación de la MDA, la MDMA y la MBDB correspondientes a la muestra de sangre del caso STF05-00660. Las concentraciones halladas fueron MDA = 16.3 ng/mL, MDMA = 398.7 ng/mL y MDEA = 2.1 ng/mL.

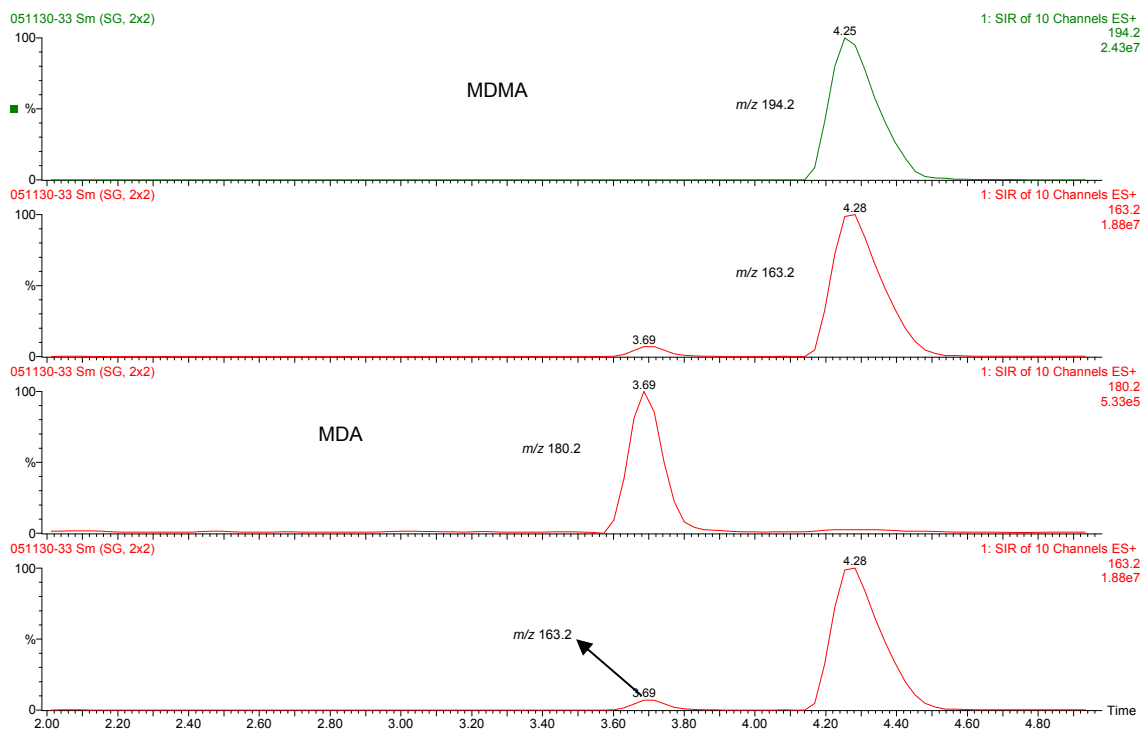


Figura 97. Cromatogramas en modo SIM de los iones de cuantificación y de confirmación de la MDA y la MDMA, correspondientes a la muestra de sangre periférica del caso STF04-02378. Las concentraciones halladas fueron MDA = 45.7 ng/mL y MDMA = 764.6 ng/mL.

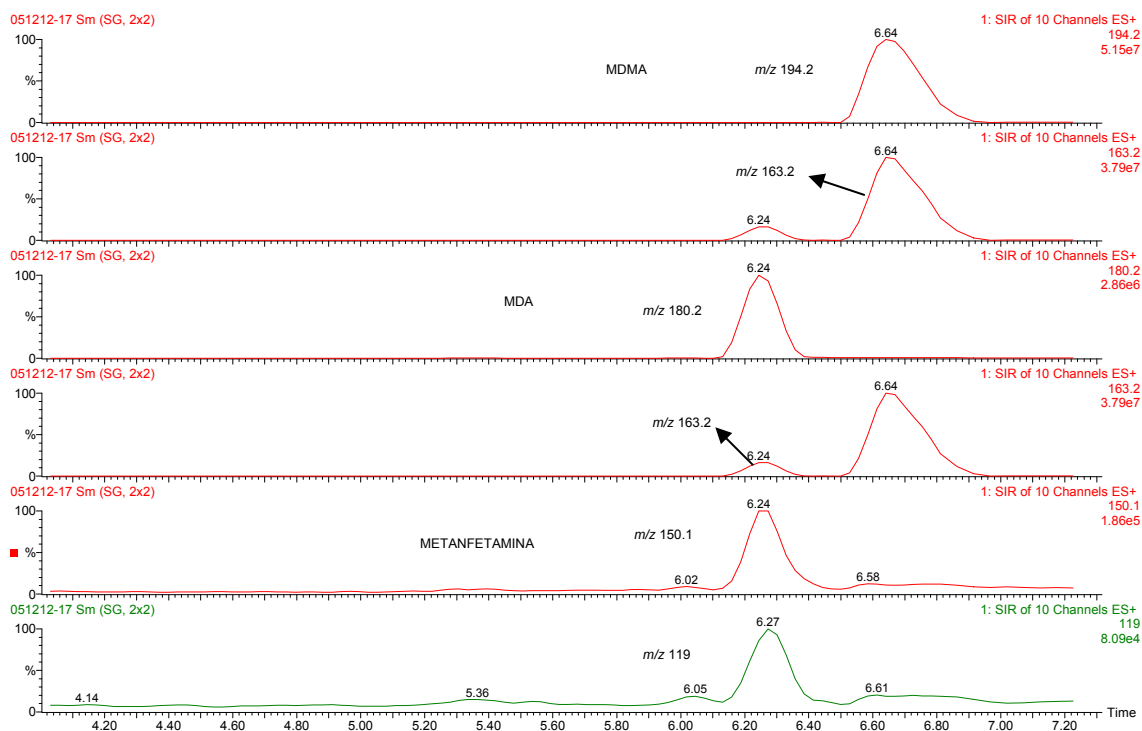


Figura 98. Cromatogramas en modo SIM de los iones de cuantificación y de confirmación de la metanfetamina, la MDA y la MDMA, correspondientes a la muestra de hígado del caso STF04-02378. Las concentraciones halladas fueron metanfetamina < 8 ng/g (LOQ), MDA = 549.2 ng/g y MDMA = 5962 ng/g.

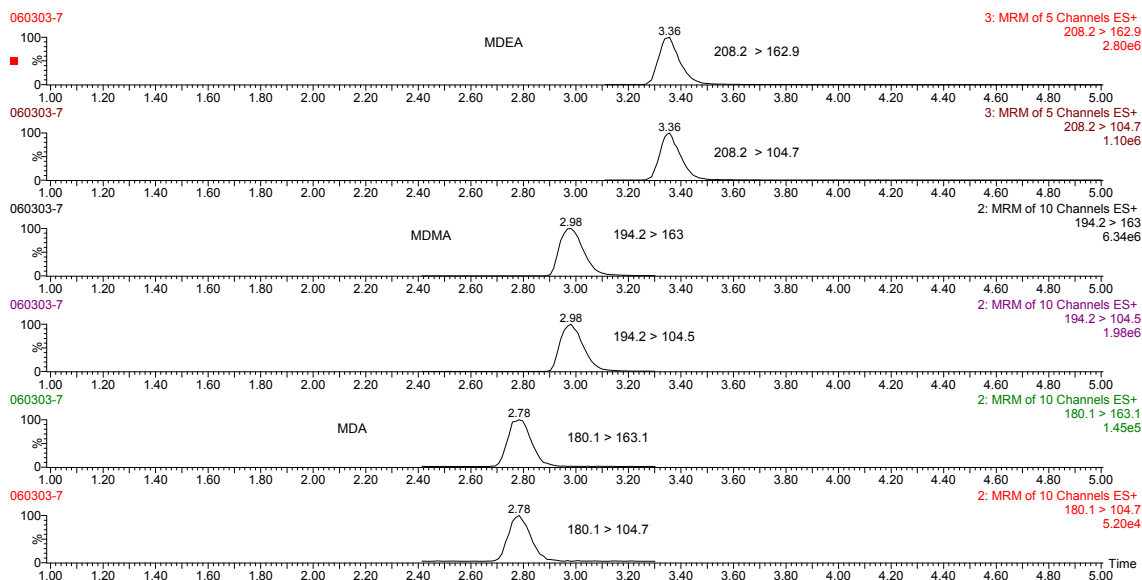


Figura 99. Cromatogramas en modo MRM de las transiciones de cuantificación y de confirmación de la MDA, la MDMA y la MDEA, correspondientes a la dilución 1:100 de la muestra de orina del caso STF03-00014. Las concentraciones halladas fueron MDA = 3050 ng/mL, MDMA = 59990 ng/mL y MDEA = 10210 ng/mL.

VII. DISCUSIÓN

1. MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE ANFETAMINAS, OPIÁCEOS Y COCAÍNA EN PLASMA MEDIANTE LC-MS

Como hemos señalado en el apartado de Justificación y Objetivos, si bien la principal finalidad de esta Tesis Doctoral es la identificación de las anfetaminas y derivados, hemos juzgado de interés incluir en el método desarrollado en plasma a los opiáceos y a la cocaína, dado que en la práctica, como puede verse en la aplicación del método propuesto a casos reales, la asociación de estas drogas con los derivados anfetamínicos es muy frecuente, y los casos de intoxicación pura por anfetaminas, al menos en nuestro medio, son poco habituales. Por este motivo hemos desarrollado un método que permite la determinación simultánea de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, morfina, 6-monoacetilmorfina, cocaína y benzoilecgonina, en plasma mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas simple (LC-MS) o en tandem (LC-MS/MS) es una eficaz técnica analítica, cada vez de mayor uso para la identificación y cuantificación de analitos de interés en Toxicología forense [386, 395, 433, 434]. De hecho, a pesar de que la técnica de referencia más utilizada sigue siendo la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS), la LC-MS presenta numerosas ventajas, como un campo de aplicación más amplio, especialmente importante para los compuestos polares y los termolábiles, o para los compuestos presentes en muy bajas concentraciones [396].

Las matrices biológicas más utilizadas en un laboratorio de Toxicología Forense son la sangre, el plasma y la orina. En relación con la sangre y el plasma, éstas son matrices relativamente homogéneas, con unos parámetros físico-químicos más o menos constantes, lo que permite su uso como indicador de exposición a una determinada sustancia, y además correlacionar los niveles con los efectos farmacológicos y tóxicos [87, 435].

En la bibliografía hemos encontrado numerosos trabajos que determinan los niveles en plasma de distintas drogas de abuso mediante LC-MS. Así, aparecen descritos métodos para la determinación de compuestos como los opiáceos [436-443], como la cocaína y sus metabolitos [444-447], o como las anfetaminas y las drogas de diseño [232, 265, 269, 272, 276], o para la

determinación simultánea de distintas drogas como los opiáceos y la cocaína [448-450], y como los opiáceos, la cocaína y el LSD [451]. Sin embargo, tan sólo hemos hallado tres métodos que permiten la determinación simultánea de las anfetaminas, los opiáceos y la cocaína mediante LC-MS. Por otra parte, dos de ellos han sido desarrollados para fluido oral [280, 282], y el tercero para orina [281]. El método desarrollado en esta Tesis [278], ha sido el primero completamente validado que permite la determinación simultánea de seis anfetaminas, morfina, 6-monoacetilmorfina, cocaína y benzoilecgonina en muestras de plasma mediante LC-MS.

La cantidad de plasma necesario para hacer el análisis fue de tan solo 200 µL de plasma, consiguiendo un límite de detección de 0.5 ng/mL para la metanfetamina, la MDMA, la benzoilecgonina y la cocaína, y de 1 ng/mL para la morfina, la 6-monoacetilmorfina, la anfetamina, la MDA, la MDEA y la MBDB. El límite de cuantificación fue de 2 ng/mL para todos los compuestos investigados. Como puede observarse, se trata de un método muy sensible y que requiere una pequeña cantidad de muestra.

En el desarrollo de este método se ensayaron distintos cartuchos de extracción en fase sólida. Los cartuchos ensayados tenían rellenos basados en sílica C₁₈ (Bond Elut Certify), rellenos de copolímero hidrofílico-lipofílico (Oasis HLB) y rellenos de intercambio catiónico (Oasis MCX). Los que dieron mejores resultados de rendimiento, de obtención de extractos más “limpios” y de ausencia de efecto matriz para todos los compuestos investigados, fueron los cartuchos Oasis HLB, como hemos dicho, rellenos por un copolímero hidrofílico-lipofílico. El monómero hidrofílico proporciona propiedades humectantes, lo que permite trabajar con el relleno seco sin pérdida de recuperación y de reproducibilidad. Por otro lado, el monómero lipofílico, proporciona propiedades de fase reversa para la retención de los analitos, los cuales son retenidos en su forma no ionizada en este tipo de rellenos apolares.

A partir del protocolo genérico de extracción utilizando estos cartuchos, se optimizaron las distintas etapas de lavado y de elución, teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas de los compuestos estudiados. Así, la carga de la muestra y el segundo lavado con un porcentaje de metanol del 20%, fueron realizados a pH básico, el cual favorecía la retención de los analitos en los cartuchos. La elución fue realizada con metanol a pH ácido (metanol + 2% de

ácido acético), favoreciendo de esta manera el paso de los analitos a su forma ionizada, la cual presentaba más afinidad por el solvente de elución que por el relleno del cartucho.

Dentro de los tamaños disponibles de cartucho, se eligieron los de mayor tamaño (3cc frente a 1cc) para evitar que se atascaran durante el proceso de extracción, debido a la viscosidad de las muestras tratadas. Con esta finalidad, también se procedió al centrifugado de las muestras previo a la extracción.

Para la separación cromatográfica se ensayaron distintas columnas en fase reversa (XTerra RP₁₈, X Terra MS C₁₈, Symmetry Shield RP₁₈ y Atlantis dC18 de Waters) y en fase normal acuosa (HILIC de Waters). La mejor separación y simetría de picos fue obtenida con la columna Atlantis dC18. En el caso de las otras columnas en fase reversa la simetría de los picos no era la adecuada (colas), y con la columna en fase normal acuosa no conseguimos una aceptable separación de los compuestos.

El modo de ionización elegido fue el electrospray positivo (ESI+). El modo positivo es el que aparece recogido en la bibliografía para este tipo de compuestos [280-282], debido a que son compuestos básicos que en la fase móvil ácida se protonan, por lo que detectaremos iones positivos. En el equipo utilizado se observó una mayor sensibilidad (más de 10 veces) utilizando ESI en vez de APCI para todos los compuestos estudiados.

En relación a los patrones internos utilizados, debemos comentar el problema detectado al usar los derivados deuterados d₃ y d₆ de los opiáceos (morfina y 6-monoacetilmorfina). Estos derivados deuterados, al aplicar el voltaje de cono correspondiente, rompían en los mismos fragmentos que los correspondientes compuestos sin deutar. Esto provocaba que ante un caso presuntamente positivo a morfina o 6-monoacetilmorfina, no se podía afirmar si el fragmento observado que servía como ión cualificador, provenía del compuesto o del patrón interno deuterado. Debido a esta situación, fue desechada su utilización como patrones internos.

La validación del método analítico cumplió todos los criterios en relación con la selectividad, linealidad, precisión, exactitud, rendimiento, efecto matriz y estabilidad.

En relación a los criterios de la intensidad relativa de iones no se cumplieron en todo el rango de concentraciones de la morfina, la MDMA y la MBDB. Estos criterios [432] han sido tomados originariamente de la cromatografía de gases-espectrometría de masas, en la que la fragmentación es reproducible y homogénea; sin embargo, su aplicación en la validación debe de hacerse con cautela en la cromatografía de líquidos-espectrometría de masas, ya que en estos equipos la débil fragmentación realizada no es siempre totalmente reproducible. Esta limitación hay que entenderla como un desafío a encarar, y deberán realizarse más estudios para que sea incluido como criterio de identificación.

2. MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE SIETE DERIVADOS ANFETAMÍNICOS EN SANGRE E HÍGADO MEDIANTE LC-MS Y EN ORINA MEDIANTE LC-MS/MS

En la bibliografía aparecen recogidos numerosos métodos que permiten la determinación de anfetaminas y derivados en muestras de sangre, hígado y orina. Los que hemos desarrollado en la elaboración de esta Tesis Doctoral son los únicos que permiten la detección simultánea de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB y PMA en sangre, hígado y orina.

En una discusión más pormenorizada de los métodos propuestos, hemos de señalar en primer término que como método de extracción de las drogas, se eligió una extracción líquido-líquido sencilla, con dietiléter a pH básico (pH=14), ya que resultó ser el proceso de extracción que aportaba los mayores rendimientos, los extractos más “limpios” y ausencia de efecto matriz para los derivados anfetamínicos investigados. La extracción líquido-líquido fue ensayada empleando otros disolventes orgánicos, o mezclas de estos (hexano, diclorometano, etilacetato), y distintos pHs básicos (pH 9, 11 y 14), así como extracciones en fase sólida en fase reversa (Oasis HLB) y de intercambio catiónico (Oasis MCX). La extracción en fase sólida con los cartuchos OASIS HLB desarrollada para la determinación de anfetaminas, opiáceos y cocaína en muestras de plasma, daba buenos resultados al ser aplicada para la determinación de los siete derivados anfetamínicos en muestras de sangre postmortem y de hígado, pero no fue utilizada debido a los numerosos problemas de obturación de los cartuchos como consecuencia de las características de este tipo de muestras. En el caso de las muestras de orina, las extracciones en fase sólida ensayadas tanto con Oasis HLB como con Oasis MCX presentaban problemas de efecto matriz, no detectados con la extracción líquido-líquido seleccionada.

La extracción líquido-líquido ha sido utilizada en la extracción de anfetaminas por otros autores [232, 268, 272], pero en estos métodos se empleó un solvente de extracción distinto [272], o cantidades superiores de dietiléter y de muestra biológica (10 mL de dietiléter y 1 mL de orina [232], 5 mL de dietiléter y 2 mL de orina [268]). En nuestro caso se utilizaron 3 mL de dietiléter y 0.5 mL de orina o de sangre. En el caso de la extracción de las muestras de hígado, 0.25 g de tejido fueron extraídos con 5 mL de éter.

En el caso de las muestras de hígado y de riñón fue necesaria una preparación previa de la misma, antes de aplicar el proceso de extracción líquido-líquido. El homogeneizado del tejido se consiguió utilizando la trituradora UltraTurrax, tal y como aparece descrito en la bibliografía [102]. En nuestro caso se procedió pesando 1 g de tejido previamente cortado en pequeños trozos, a los que se añadieron 3 mL de agua. La velocidad de la UltraTurrax T8, así como el tiempo de trituración a cada velocidad, fue optimizada con la finalidad de obtener un homogeneizado líquido que nos permitiese continuar el proceso de extracción. Las condiciones elegidas fueron, como se indicó en la parte experimental, 1 minuto a distintas velocidades (5000, 15000 y 25000 L/min). De la bibliografía consultada tan sólo Mortier et al. [272] desarrollaron y validaron un método para la determinación de PMA, anfetamina, MDMA y MDA en muestras de hígado. Nuestro método permite la determinación de esos compuestos, y además de la metanfetamina, MDEA y MBDB.

La elevada volatilidad de las anfetaminas en estado base, hizo necesario que antes de la evaporación de las muestras bajo una fina corriente de nitrógeno, se añadiesen 100 μ L de una solución metanólica de HCl (metanol:HCl, 99/1), con la finalidad de acidificar el medio y reducir así la volatilidad de estos compuestos. La solución fue preparada en metanol y no en agua, para evitar la prolongación del tiempo de evaporación de las muestras.

La separación cromatográfica realizada fue distinta según la matriz biológica de la que se tratase. En el método de determinación de los derivados anfetamínicos en muestras de sangre, la separación cromatográfica fue realizada utilizando una columna de fase reversa en modo isocrático en 8 minutos, con un tiempo de análisis inferior al de otros métodos publicados previamente [232, 272]. Recientemente, Wood et al. [276] desarrollaron un método en modo isocrático para la separación de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA y efedrina en 4 minutos en muestras de plasma.

En el caso del método para la determinación de los siete derivados anfetamínicos en muestras de hígado, fue necesario el desarrollo de una separación cromatográfica en modo gradiente. Esto fue debido, tal y como se explicó en la parte experimental, a la complejidad biológica de los extractos de las muestras de hígado, que hacía necesario llegar a elevados porcentajes de

acetonitrilo para “lavar” la columna entre inyecciones. El método desarrollado permitió la separación de los 7 compuestos en 10 minutos, siendo el tiempo total de análisis de 18 minutos. Este tiempo es menor que el descrito por Mortier et al. para muestras de hígado [272].

En el método de determinación de los derivados anfetamínicos en muestras de orina, la separación de los compuestos estudiados se consiguió en menos de 4 minutos, con un tiempo total de análisis de 8 minutos. Hasta la fecha, los métodos desarrollados duraban más de 10 minutos [212, 232, 267, 268, 272], y los que presentaban menores tiempos de análisis sólo detectaban MDMA y MDA [273], o anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA y MDEA [270]. En el método descrito la separación fue realizada en modo gradiente utilizando la columna de reciente aparición ISTM (*Intelligent Speed*), la cual se caracteriza por presentar una longitud de tan sólo 20 mm (las columnas utilizadas en el resto de los métodos desarrollados son de 100 mm de longitud o mayor). La reducción de la longitud de la columna permite desarrollar métodos más rápidos (menor recorrido cromatográfico, y posibilidad de utilizar flujos más altos), sin sacrificar la resolución cromatográfica.

También en este caso, el modo de ionización utilizada ha sido el electrospray en modo positivo (ESI+). Los ensayos realizados con la sonda APCI, mostraron una sensibilidad mucho menor, obteniendo una señal media del orden de 10 veces inferior a la que se obtiene utilizando ESI. En la bibliografía, la sonda APCI ha sido empleada, sin embargo, con éxito [232, 265, 268, 273], si bien fue necesario en algún caso un paso previo de derivatización [232]. Otras técnicas de ionización que también han sido empleadas fueron la *Sonic Spray Ionization* (SSI) [272] y la *Surface-Activated Chemical Ionization* (SACI) [267].

La trampa de iones [267, 268, 272, 277], el cuadrupolo simple [212, 232, 265, 270] y el triple cuadrupolo [269, 273, 276] han sido los detectores de masas empleados en la detección de los derivados anfetamínicos. En la elaboración de este trabajo se utilizó un cuadrupolo sencillo en los métodos de determinación de los compuestos investigados en sangre y en hígado, y un triple cuadrupolo en el caso del método desarrollado en orina, el cual fue realizado durante mi estancia en el Servicio de Toxicología forense de la Delegación en Lisboa del Instituto Nacional de Medicina Legal. La

cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem es una técnica más específica y sensible que LC-MS. En LC-MS/MS el ruido de fondo es mucho menor que en LC-MS (se monitorizan transiciones, no iones), lo que mejora la relación señal/ruido, y consecuentemente la sensibilidad de la técnica. Por otro lado, estos equipos suelen ser más rápidos lo que permite aumentar el número de transiciones monitorizadas, y detectar así un mayor número de compuestos.

Con respecto a los parámetros utilizados en el espectrómetro de masas debemos comentar los valores flujo elegidos para el gas de cono. Este parámetro proporciona una corriente auxiliar de nitrógeno, que aplicada a la entrada del cono, contribuye a evitar la formación de aductos (complejo formado por la molécula de interés asociada a otros iones) o de *clusters* (complejo formado por la molécula de interés solvatada). Las mejores intensidades para todos los compuestos empleando el espectrómetro de masas ZMD, se consiguieron utilizando un gas de cono de 50 L/h. Sin embargo, en el caso del espectrómetro de masas Quattro MicroTM, no se utilizó el gas de cono porque disminuía la señal de los compuestos. Esta aparente contradicción es una clara advertencia sobre la necesidad de controlar y valorar todos los parámetros posibles que puedan afectar a la señal de los compuestos.

Al igual que en el método de determinación de anfetaminas, opiáceos y cocaína en plasma, se cumplieron todos los criterios de validación, excepto las variaciones permitidas de la intensidad relativa de los iones para la anfetamina en las muestras de sangre, para la MBDB y PMA en las muestras de hígado, y para la metanfetamina y la PMA en las muestras de orina.

3. APLICACIÓN A CASOS REALES DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE MEDICINA LEGAL DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El método de determinación de anfetaminas, opiáceos y cocaína en plasma fue aplicado a casos reales que fueron remitidos al Servicio de Toxicología del Instituto Universitario de Medicina Legal de Santiago de Compostela. Los casos analizados se clasificaron, como hemos indicado anteriormente, en dos grupos: los casos clínicos/judiciales y los casos de muertes en accidentes de tráfico.

Dentro de los casos clínicos/judiciales, la gran mayoría (>90%) fueron muestras clínicas procedentes del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) y del Hospital Comarcal del Barbanza. Un total de 208 muestras fueron analizadas entre enero de 2005 y junio de 2006, siendo 65 de ellas positivas a alguna de las sustancias investigadas. La edad media ($\pm$ SD) de los intoxicados ha sido 30.4 ± 8.1 años, siendo un 81.5% hombres y un 18.5% mujeres. De los 208 casos, un 26% han sido positivos a cocaína, un 9% a opiáceos y un 2.9% a anfetaminas. Las anfetaminas encontradas han sido la anfetamina, la metanfetamina, la MDA, la MDMA y la MDEA, mientras que ningún caso resultó positivo a la MBDB, ni a la PMA. El consumo de anfetaminas aparece asociado normalmente al consumo de cocaína, ya que de los seis casos positivos a anfetaminas, tan sólo un caso presentaba exclusivamente este tipo de sustancias, mientras que los otros cinco presentaron anfetaminas, cocaína, y en alguna ocasión, opiáceos. Estos datos concuerdan con los indicados por el OED [75] de las urgencias hospitalarias del año 2002 asociadas al consumo de drogas. Según el OED [75], la sustancia más frecuentemente relacionada con las urgencias hospitalarias fue la cocaína, seguida del alcohol, los hipnosedantes y la heroína. En un menor porcentaje aparecen el cánnabis y el éxtasis.

El otro grupo de casos estudiado han sido los casos de muertes por accidentes de tráfico. El riesgo de conducir bajo la influencia de las drogas es un tema de gran interés en la actualidad. Una medida de este riesgo puede hacerse mediante estudios epidemiológicos, analizando los hallazgos encontrados en las muestras de sangre de conductores muertos en accidentes de tráfico. Con esta finalidad fueron analizadas las muertes ocurridas entre enero de 2004 y junio de 2006, es decir, un total de 237 casos. Como ya se

indicó en la parte de resultados, el 44.7% de los casos presentaba alguna sustancia psicoactiva. De los casos positivos a alguna sustancia psicoactiva la mayor parte presentaron sólo alcohol (80.2%), un 13.2% alcohol y drogas, y un 6.6% sólo drogas. La droga detectada con más frecuencia fue la cocaína (95.2%), seguida de las anfetaminas (14.3%) y de los opiáceos (4.8%). La edad media ($\pm$ SD) de los fallecidos fue de 26.4 años ($\pm$ 6.7), siendo la mayor parte hombres (90.5%).

En un estudio realizado por Álvarez et al. [452] para investigar la participación de las drogas en los accidentes de tráfico, se estudiaron 979 casos entre 1992-1995. En este estudio, el 44.3% de los casos sólo presentaba alcohol, un 3.9% medicamentos, un 2% drogas ilegales y un 6.9% drogas ilegales y alcohol. En cuanto a las drogas ilegales, el 5% de los casos presentaba cocaína, el 3.1% opiáceos, el 1.5% cánnabis y el 0.9% anfetaminas. Estos datos son semejantes a los obtenidos en nuestro estudio, si bien en nuestro caso la droga ilegal detectada con más frecuencia ha sido la cocaína, seguida de las anfetaminas, y en último lugar los opiáceos.

En aproximadamente un 9% de las muertes en carretera se identificó alguna de las drogas ilegales estudiadas, por lo que el consumo de las drogas constituye un serio problema para la seguridad del tráfico.

En relación a los niveles hallados en los casos del IUML para las sustancias investigadas, se debe señalar lo siguiente: las concentraciones de los casos positivos a cocaína oscilaron entre 8 y 10424 ng/mL, situándose la mayoría de ellos dentro del rango de las concentraciones tóxicas (250-1000 ng/mL), e incluso, dentro del rango de las concentraciones supuestamente letales (>1000 ng/mL), descritos para esta sustancia [6, 9, 453]. Esto pone de manifiesto la enorme variabilidad existente entre los individuos, lo cual puede deberse a que se trate de consumidores esporádicos o crónicos (desarrollo de tolerancia), o a factores genéticos (toxicogenética). En el caso de los opiáceos y de los derivados anfetamínicos, las concentraciones halladas se situaron dentro del rango “no tóxico” (10-120 ng/mL para morfina, y 100-350 ng/mL para MDMA) [6, 453]. Los casos de policonsumo presentaron una droga principal, generalmente la cocaína o los derivados anfetamínicos, y otra secundaria (en algunos casos el alcohol). Las principales combinaciones observadas fueron la cocaína y los opiáceos, y la cocaína y los derivados anfetamínicos.

4. APLICACIÓN A CASOS REALES DE LA DELEGACIÓN DE LISBOA DEL INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL

Los métodos de determinación de los siete derivados anfetamínicos (anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB y PMA) en sangre, hígado y orina, fueron aplicados, como hemos descrito con anterioridad, a los casos positivos a anfetaminas que fueron remitidos a la Delegación en Lisboa del Instituto Nacional de Medicina Legal desde el año 2003 al año 2005.

En el Servicio de Toxicología forense de dicha Delegación, tras un cribado por inmunoensayo de las muestras de orina, los casos positivos eran confirmados en las muestras de sangre mediante GC-MS. Comparando los resultados obtenidos en este laboratorio mediante GC-MS, con los obtenidos en la elaboración de este trabajo mediante LC-MS, comprobamos que la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas es una técnica más sensible que GC-MS, ya que pudimos detectar en varios casos otros derivados anfetamínicos a bajas concentraciones que no habían sido hallados utilizando GC-MS.

El principal derivado anfetamínico presente en estos dieciséis casos remitidos fue la MDMA. En la mayor parte de ellos también estaba presente la MDA, pero más como metabolito de la MDMA que como sustancia de abuso *per se*, ya que la concentración hallada en la mayor parte de los casos era un 10-15% de la concentración de MDMA [54]. Otros derivados detectados pero en bajas concentraciones respecto a la MDMA, fueron la anfetamina, la metanfetamina y la MDEA. No se encontró ningún caso positivo a MBDB ni a PMA.

La media de edad de los sujetos vivos intoxicados fue de 28.9 ± 6 años, siendo el 63.6% hombres y el 36.4% mujeres. La gran mayoría de los casos fueron accidentes de tráfico (10 de los 11 casos), y uno de ellos una joven víctima de una agresión sexual, que se puede considerar como un caso de sumisión química. En efecto, los derivados anfetamínicos han sido utilizados en los denominados casos de sumisión química (administración de sustancias psicoactivas a una persona con fines delictivos o criminales), debido a la desinhibición que producen, si bien otras sustancias como el alcohol y los hipnóticos-sedantes son más frecuentemente utilizados por los agresores con esta finalidad [454].

Los niveles de MDMA hallados en las muestras de sangre tuvieron valores muy variables, entre 15 y 1084.1 ng/mL, con una media $\pm$ SD de 436.3 $\pm$ 362.2 ng/mL, y una mediana de 390 ng/mL. Las concentraciones plasmáticas “terapéuticas” de la MDMA están comprendidas, según los datos de la TIAFT [453], entre 100 y 350 ng/mL, y las concentraciones “tóxicas” entre 350 y 500 ng/mL. Las concentraciones halladas en los casos analizados se encuentran dentro de estos rangos, excepto un caso que presenta una concentración de MDMA anormalmente alta (1084.1 ng/mL), y otro con una concentración baja (15 ng/mL). Los niveles hallados en orina concuerdan con los indicados en la bibliografía tras el uso recreativo de estas sustancias [54, 274].

Los fallecidos por causas relacionadas con la MDMA tenían una media de edad de 26.8 $\pm$ 9.3 años, siendo todos ellos hombres. Estas características concuerdan con las halladas en la bibliografía (edad media = 26.7 $\pm$ 7.8 años y principalmente hombres). Los niveles hallados en la sangre periférica han sido superiores, como es lógico, en los casos de muertes debidas a una intoxicación por estas sustancias (764.6 y 8229 ng/mL), que en los casos de muertes relacionadas con el consumo de las mismas (30, 32 y 278.8 ng/mL). En la bibliografía consultada la media de los niveles hallados en los casos de muertes debidas a una intoxicación por MDMA fue de 1700 $\pm$ 2100 ng/mL, y en los casos de muertes relacionadas fue de 650 $\pm$ 400 ng/mL. Nuestros hallazgos han sido superiores en un caso, e inferiores en el otro, pero de todos modos debemos tener en cuenta la enorme variación en los niveles dados en los distintos casos consultados, y que en la mayor parte de las ocasiones no se indica el lugar de procedencia de la muestra de sangre. Una recomendación sería que el patólogo que recoja las muestras indicase claramente el lugar de toma de las mismas, ya que es de gran importancia para realizar una correcta interpretación de los hallazgos. Este punto es especialmente crítico para sustancias, como los derivados anfetamínicos, susceptibles de fenómenos de redistribución postmortem [325-327]. Otro factor a tener en cuenta en el fenómeno de redistribución, es el tiempo transcurrido entre la muerte del sujeto y la toma de muestras, ya que cuanto más largo sea éste, mayor redistribución desde tejidos con altos niveles a tejidos con bajos niveles se producirá.

Estudios postmortem realizados para la MDMA [325-327] demostraron que se puede acumular en varios tejidos tales como el hígado y el pulmón,

pudiendo existir una redistribución postmortem desde éstos a sangre cardíaca, de modo que los niveles en sangre cardíaca eran muy superiores a los niveles hallados en sangre periférica. En nuestro estudio, en relación a la diferencia entre los niveles hallados en las muestras de sangre cardíaca y en las muestras de sangre periférica, debemos indicar que en 2 casos la variación fue muy importante (147 ng/mL en sangre cardíaca y 32 ng/mL en sangre periférica, y 3581 ng/mL en sangre cardíaca y 278.8 ng/mL en sangre periférica), mientras que en los otros tres casos los niveles de ambos tipos de muestras fueron semejantes. Desafortunadamente, en todos ellos desconocemos el tiempo que transcurrió entre la muerte y la toma de muestras, y además de los dos casos mencionados no se disponía de muestras de vísceras, que nos permitiesen determinar si el hígado actuaba como órgano reservorio.

En sólo dos de los casos postmortem se disponía además de las muestras de sangre cardíaca y periférica, de muestras de hígado, riñón y contenido gástrico. Ambos casos presentaron niveles semejantes en los dos tipos de muestras de sangre, y altas concentraciones en el contenido gástrico, lo que puede sugerir un consumo por vía oral. Sin embargo, el comportamiento en las vísceras fue diferente. En uno de los casos los niveles hallados en las vísceras fueron algo inferiores a los hallados en sangre, mientras que en el otro caso fueron muy superiores. Como consecuencia de todo esto, comprobamos que la interpretación de las concentraciones en el momento de la muerte debe ser realizada con cautela y teniendo en cuenta distintos tipos de muestras, además de conocer los hallazgos anatomopatológicos. La cuestión de la interpretación de los datos toxicológicos postmortem ha de ser una tarea compartida entre el toxicólogo y el patólogo forense en la línea ya preconizada hace muchos años por el gran patólogo americano Lester Adelson [455].

VIII. CONCLUSIONES

1. Se ha profundizado en el conocimiento de la técnica de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, LC-MS y LC-MS/MS, aplicando dicha técnica en distintas facetas de la Toxicología Forense.
2. Se ha desarrollado y validado un método que permite la determinación de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, morfina, 6-monoacetilmorfina, cocaína y benzoilecgonina en muestras de plasma mediante LC-MS, partiendo de 0.2 mL de plasma y consiguiendo un límite de cuantificación de 2 ng/mL.
3. Se han desarrollado y validado tres métodos analíticos que permiten la determinación de anfetamina, metanfetamina, PMA, MDA, MDMA, MDEA y MBDB en muestras de sangre e hígado mediante LC-MS, y en muestras de orina mediante LC-MS/MS. En estos métodos se utilizaron 0.5 mL de sangre y de orina, y 1 g de hígado, consiguiendo límites de cuantificación comprendidos entre 1 y 2 ng/mL y de 8 ng/g, respectivamente.
4. El método de determinación de anfetaminas, opiáceos y cocaína fue aplicado con éxito a las muestras remitidas al Servicio de Toxicología del Instituto Universitario de Medicina Legal de Santiago de Compostela.
5. De los 208 casos clínicos/judiciales analizados entre enero de 2005 y junio de 2006, un 26% fueron positivos a cocaína, un 9% a opiáceos y un 2.9% a anfetaminas. Las anfetaminas encontradas han sido anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA y MDEA, y en la mayor parte de los casos asociadas a la cocaína.
6. De los 237 casos de muertes ocurridas en accidentes de tráfico entre enero de 2004 y junio de 2006. En aproximadamente un 9% de las muertes se identificó alguna de las drogas ilegales estudiadas. La droga más veces presente fue la cocaína (95.2%), seguida de las anfetaminas (14.3%) y de los opiáceos (4.6%).

7. Los métodos de determinación de los siete derivados anfetamínicos en muestras de sangre, hígado y orina fueron aplicados con éxito a todos los casos positivos a anfetaminas remitidas a la Delegación de Lisboa del Instituto Nacional de Medicina Legal, desde el año 2003 al año 2005, siendo la MDMA el principal derivado hallado.

8. Los niveles encontrados en los sujetos vivos estuvieron, en general, dentro de los rangos establecidos en los casos de intoxicación. En las muestras postmortem los niveles deben de interpretarse con cautela. Factores genéticos, fenómenos de redistribución y presencia de otras drogas y alcohol, hacen difícil adscribir los resultados analíticos a una muerte debida exclusivamente a los derivados anfetamínicos. En este sentido, señalar que una profundización en aspectos anatomopatológicos y estudios de biología molecular, contribuirán conjuntamente con el dato analítico en una interpretación correcta de la causa de muerte.

IX. PERSPECTIVAS

Los métodos propuestos permiten la determinación de las anfetaminas y derivados en muestras de sangre, orina e hígado, y de las anfetaminas, opiáceos y cocaína en muestras de plasma. Otras muestras de gran importancia en toxicología forense son el pelo, el humor vítreo y el líquido pericárdico. Nuestro objetivo en próximos estudios será el desarrollo de métodos de determinación de estos compuestos en las matrices indicadas.

Teniendo desarrollados y completamente validados métodos de determinación de las anfetaminas y derivados en sangre, orina, tejidos, humor vítreo, líquido pericárdico y pelo, podremos realizar un completo estudio de redistribución postmortem. Con la finalidad de recoger casos para la realización de estos estudios de redistribución postmortem de las anfetaminas y derivados, fueron contactados el Instituto de Medicina Legal de Málaga y la Delegación de Lisboa del Instituto Nacional de Medicina Legal. Los criterios de inclusión en el estudio y el protocolo de recogida de muestras, han sido elaborados y enviados a los mencionados institutos.

Los **criterios de inclusión** en el estudio toxicológico postmortem de anfetaminas y derivados, en el supuesto de que no se realice un cribado previo de las muestras, son los siguientes:

- No se establece límite de edad y sexo, aunque probablemente los casos corresponden con individuos del sexo masculino, entre 20-30 años.
- Paciente fallecido en centro hospitalario con cuadro de confusión, hipertermia, hipertensión y arritmias. Sería deseable que el hospital facilitase una parte de la muestra de sangre tomada para el análisis *in vivo*.
- Cadáveres de individuos con antecedentes de haber tomado drogas estimulantes. Se excluyen los adictos crónicos a la heroína.
- Cadáveres de víctimas de accidentes de tráfico que se hallan producido poco después de la asistencia a una discoteca u otro centro de “movida”.

El **protocolo de recogida de muestras** propuesto es el siguiente:

- **Información del cadáver:** datos personales (sexo, edad, raza, peso y talla), tiempo transcurrido entre la muerte y la recogida de muestras, diagnóstico anatomopatológico, pesos del hígado, riñones y cerebro, y posible causa de la muerte.

- **Identificación de las muestras:** Cad_Número del caso (1, 2, ...)_Inicial muestra. Las iniciales de las muestras serían: SGC (sangre cardíaca), SGF (sangre de la vena femoral derecha), HV-d/iz (humor vítreo derecho e izquierdo), OR (orina), BI (bilis), LP (líquido pericárdico), PELO, UÑA, CG (contenido gástrico), HIG (hígado), RI-d/iz (riñón derecho/izquierdo), CER (cerebro), ME (músculo esquelético).
- **Recogida de las muestras:**
 - Sangre cardíaca del ventrículo derecho: 5 mL.
 - Sangre vena femoral derecha: 5 mL.
 - Humor vítreo de los dos ojos independientemente: todo el posible.
 - Orina: 10 mL.
 - Bilis: 5 mL.
 - Líquido pericárdico: todo el posible.
 - Pelo del vértex posterior, arrancados con la raíz, identificando la misma con un cordel: se recogen dos mechass de 100 cabellos aproximadamente cada una.
 - Uña completa del segundo dedo del pie derecho.
 - Contenido gástrico: 50 mL.
 - Vísceras: hígado (lóbulo derecho, zona central, 150 g), riñón (medio riñón de cada lado), cerebro (córtex parietal, 100 g) y músculo esquelético (músculo vasto externo del cuádriceps derecho, 200 g).

X. BIBLIOGRAFÍA

-
- [1] Capdevila M. MDMA o el éxtasis químico. Barcelona, Los libros de la Liebre de Marzo, S.L., 1995.
- [2] Christophersen AS. Amphetamine designer drugs – an overview and epidemiology. *Toxicol Lett* 112-113 (2000) 127-131.
- [3] Bobes J, Lorenzo P, Sáiz PA. Éxtasis (MDMA): Un abordaje comprehensivo. Tomo I. Barcelona, Masson, 1998.
- [4] Bobes J. Éxtasis: Aspectos farmacológicos, psiquiátricos y médico-legales. Barcelona, Ediciones en Neurociencias, 1995.
- [5] Shulgin AT, Shulgin A. Phikal: A chemical love store. Berkely, Transform Press, 2003.
- [6] Drummer OH, Odell M. The forensic pharmacology of drugs of abuse. Londres, Arnold, 2001.
- [7] Lora-Tamayo C, Tena T, Rodríguez A. Informe anual de Instituto Nacional de Toxicología, 2000.
- [8] Escotado A. Historia general de las drogas. Madrid, Espasa Calpe, 1998.
- [9] Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. (Editores). Clarke's Analysis of Drugs and Posions, Volume 2. 3rd Edition. Londres, Pharmaceutical Press, 2001.
- [10] Eisnerb. Éxtasis. Historia del MDMA. Barcelona, Obelisco, 1995.
- [11] Roig Traver A. Sobre el uso recreativo de la metoximetanfetamina: aspectos históricos y efectos adversos. *Adicciones* 6 (1994) 437-452.
- [12] Roig Traver A. El éxtasis. Una revisión del MDMA, MDA y demás feniletilaminas psicoactivas. *Actas de las XVII Jornadas Nacionales de Socidrogalcohol*. Valencia, Diciembre 1989.
- [13] Kirsch MM. Designer drugs. Minneapolis, Compare Publications, 1986.
- [14] Bagozzi F. Generazione in ecstasy. Torino, Edizioni Grupo Abele, 1996.
- [15] Escohotado A. Aprendiendo de las drogas. Usos y abusos, prejuicios y desafíos. 3^a Edición. Barcelona, Anagrama, 1996.
- [16] Saunders N. 'E' for ecstasy. Londres, Edición del autor, 1993. Descargado de www.punkunidos.com.ar.
- [17] de la Torre R, Farré M, Navarro M, Pacifici R, Zuccaro P, Pichini S. Clinical pharmacokinetics of amphetamine and related substances. Monitoring in conventional and non-conventional matrices. *Clin Pharmacokinet* 43(3) (2004) 157-185.

- [18] Nichols DE. Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB, and the classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogens. *J Psychoactive Drugs* 18 (1986) 305-313.
- [19] Shin H, Donike M. Stereospecific derivatization of amphetamines, phenolalkylamines, and hydroxyamines and quantification of the enantiomers by capillary GC/MS. *Anal Chem* 68 (1996) 3015-3020.
- [20] Beckett AH, Shenoy EVB, Salmon JA. The influence of replacement of the N-ethyl group on the absorption, distribution and metabolism of (±)-ethylamphetamine in man. *J Pharm Pharmacol* 24 (1972) 194-202.
- [21] Baselt RC, Cravey RH. (Editores). Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 4ª edición. Foster City (CA), Chemical Toxicology Institute, 1995.
- [22] Swiss Pharmaceutical Society (Editor). Index nomium: international drug directory 1992/1993. Frankfurt, Med Pharm Scientific Publishers, 1992.
- [23] Änggård E. General pharmacology of amphetamine-like drugs. A: pharmacokinetics and metabolism. En: Martin WR (Editor). *Drug addiction II*. Nueva York, Springer Verlag, 1997.
- [24] Dollery C. (Editor). Therapeutic drugs. Vols. 1, 2, 3. Londres, Churchill Livingstone, 1991.
- [25] O'Neil MJ, Smith A, Heckelman DE, Budavari S. (Editores). The Merck index. 13ª edición. Whitehouse Station (NJ), Merck Research Laboratories, 2001.
- [26] Beckett AH. Kinetics of the absorption and elimination of "amphetamines" in normal humans. En: Sjosqvist F., Tottie M. (Editores). *Abuse of central stimulants*. Estocolmo, Almqvist and Weksell, 1969.
- [27] Ghysel MH. Amphetamines et derives. En : Kintz P (Editor). *Toxicologie et pharmacologie médico-légales*. Paris, Éditions scientifiques et médicales Elsevier, 1998.
- [28] Pichini S, Altieri I, Zuccaro P, Pacifici R. Drug monitoring in non-conventional biologic fluids and matrices. *Clin Pharmacokinet* 30 (1996) 211-228.
- [29] Tagliaro F, De Battisti Z, Groppi A, Nakahara Y, Scarcella D, Valentín R, Marigo M. High sensitivity simultaneous determination in hair of the major constituents of ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine) by high-performance liquid chromatography with direct fluorescence detection. *J Chromatogr B* 723(1+2) (1999) 195-2002.

- [30] Moore K. Amphetamines/Psimpathomimetic amines. En: Levine B. (Editor). Principles of Forensic Toxicology. American Association for Clinical Chemistry, Inc., 1999.
- [31] Pizarro N, Ortuño J, Segura J, Farré M, Mas M, Camí J, de la Torre R, Quantification of amphetamine in plasma concentrations by gas chromatography coupled to mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal 21(4) (1999) 739-747.
- [32] Harris DS, Boxenbaum H, Everhart ET, Sequeira G, Mendelson JE, Jones RT. The bioavailability of intranasal and smoked methamphetamine. Clin Pharmacol Ther 74(5) (2003) 475-486.
- [33] Schepers RJ, Oyler JM, Joseph Jr RE, Cone EJ, Moolchan ET, Huestis MA. Methamphetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid and plasma after controlled oral methamphetamine administration to human volunteers. Clin Chem 49(1) (2003) 121-132.
- [34] de la Torre R, Farré M, Ortuño J, Mas M, Brenneisen R, Roset PN, Segura J, Camí .. Non-linear pharmacokinetics of MDMA ('ecstasy') in humans. Br J Clin Pharmacol 49(2) (2000) 104-109.
- [35] Brunnenberg M, Lindenblatt H, Gouzoulis-Mayfrank E, Kovar KA. Quantitation of N-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine and its major metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. J Chromatogr B Biomed Sci and Appl 719 (1-2) (1998) 79-85.
- [36] Felgate HE, Felgate PD, James RA, Sims DN, Vozzo DC. Recent paramethoxyamphetamine deaths. J Anal Toxicol 22(2) (1998) 169-172.
- [37] Wan SH, Martin SB, Azarnoff DL. Kinetics, salivary excretion of amphetamine isomers, and effect of urinary pH. Clin Pharmacol Ther 23(5) (1978) 585-590.
- [38] Angrist B, Corwin J, Bartlik B, Cooper T. Early pharmacokinetics and clinicla effects of oral D-amphetamine in normal subjects. Biol Psychiatry 22(11) (1987) 1357-1368.
- [39] Shappell SA, Kearns GL, Valentine JL, Neri DF, DeJohn CA. Chronopharmacokinetics and chronopharmacodynamics of dextromethamphetamine in man. J Clin Pharmacol 36(11) (1996) 1051-1063.
- [40] Mendelson J, Jones RT, Upton R, Jacob P 3 rd. Methamphetamine and ethanol interactions in humans. Clin Pharmacol Ther 57(5) (1995) 559-568.
- [41] Fallon JK, Kicman AT, Henry JA, Milligan PJ, Cowan DA, Hutt AJ. Stereospecific analysis and enantiomeric disposition of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in humans. Clin Chem 45(7) (1999) 1058-1069.

- [42] Hilberg T, Ripel A, Slordal L, Bjornebore A, Morland J. The extent of postmortem redistribution in a rat model. *J Forensic Sci* 44(5) (1999) 956-962.
- [43] Kidwell D, Holland J, Athaneselis S. Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 713 (1998) 111-135.
- [44] Kupiec TC, Vishnu R, Vu N. Pharmacogenomics for the forensic toxicologist. *J Anal Toxicol* 30 (2006) 65-72.
- [45] Kreth KP, Kovar KA, Schwab M, Zanger UM. Identification of the Human Cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism of "ecstasy" related drugs. *Biochem Pharmacol* 59 (2000) 1563-1571.
- [46] Maurer HH. On the metabolism and the toxicological analysis of methylenedioxymethylamphetamine designer drugs by gas chromatography-mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 18 (1996) 465-470.
- [47] Maurer HH, Bickeboeller-Friedrich J, Kraemer T, Peters FT. Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs ('Ecstasy'). *Toxicol Lett* 112-113 (2000) 133-142.
- [48] Segura M, Farré M, Pichini S, Peiro AM, Roset PN, Ramirez A, Ortuño J, Pacifici R, Zuccaro P, Segura J, de la Torre R. Contribution of Cytochrome P450 2D6 to 3,4-methylenedioxymethamphetamine disposition in humans. Use of paroxetine as a metabolic inhibitor probe. *Clin Pharmacokinet* 44(6) (2005) 649-660.
- [49] Änggård E, Jonsson LE, Hogmark AL. Amphetamine metabolism in amphetamine psychosis. *Clin Pharmacol Ther* 14 (1973) 870-880.
- [50] Quinn DI, Wodak A, Day RO. Pharmacokinetic and pharmacodynamic principles of illicit drug use and treatment of illicit drug users. *Clin Pharmacokinet* 33 (1997) 344-400.
- [51] Cook CE, Jeffcoat R, Hill JM, Pugh DE, Patetta PK, Sadler BM, White WR, Pérez-Reyes M. Pharmacokinetics of methamphetamine self-administered to human subjects by smoking S-(+)-methamphetamine hydrochloride. *Drug Metab Dispos* 21(4) (1993) 717-723.
- [52] Helmlin HJ, Bracher K, Brouquin D, Volanthen D, Brenneisen R. Analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its metabolites in plasma and urine by HPLC-DAD and GC-MS. *J Anal Toxicol* 20(6) (1996) 432-440.
- [53] Segura M, Ortuño J, Farré M, Mc Lure JA, Pujadas M, Pizarro N, Llebaría A, Joglar J, Roset PN, Segura J, de la Torre R. 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA): a major in vivo 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) metabolite in humans. *Chem Res Toxicol* 14(9) (2001) 1203-1208.

- [54] Kunsman GW, Levine B, Kuhlman JJ, Jones RL, Hughes RO, Fujiyama CI, Smith ML. MDA-MDMA concentrations in urine. *J Anal Toxicol* 20(7) (1996) 517-521.
- [55] Ensslin HK, Kovar KA, Maurer HH. Toxicological detection of the designer drug 3,4-methylenedioxymethylamphetamine (MDA, "Eve") and its metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay. *J Chromatogr B* 683 (1996) 189-197.
- [56] Kintz P. Excretion of MBDB and BDB in urine, saliva, and sweat following single and oral administration. *J Anal Toxicol* 21 (1997) 570-574.
- [57] Kitchen I, Trembly J, Andre J, Dring LG, Idle JR, Smith RL, Williams RT. Interindividual and interspecies variation in the metabolism of the hallucinogen 4-methoxy-amphetamine. *Xenobiotica* 9(7) (1979) 397-404.
- [58] Ullán Serrano J. Neuroanatomía I. Salamanca, Universidad de Navarra, 1992.
- [59] Laso FJ. Patología General. Barcelona, Masson, 2004.
- [60] Salin Pascual RJ. Bases Bioquímicas y Farmacológicas de la Neuropsiquiatría. Mexico, McGraw-Hill Interamericana, 1997.
- [61] Kankaanpää A, Meririnne E, Lillsunde P, Seppälä T. The acute effects of amphetamine derivatives on extracellular serotonin and dopamine levels in rat nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 59(4) (1998) 1003-1009.
- [62] Seiden SL, Sabol KE. Methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity: possible mechanism of cell destruction. En: Majews Ka MD (Editor). NIDA Research Monograph 163. Rockville (Maryland), NIDA, 1996.
- [63] Ricaurte GA, Yvan J, Hatzidimitriou G, Cord BJ, McCann UD. Severe Dopaminergic Neurotoxicity in Primates After a Common Recreational Dose Regimen of MDMA ("Ecstasy"). *Science* 297(5590) (2002) 2260-3.
- [64] Bobes J, Lorenzo P, Sáiz PA. Éxtasis (MDMA): Un abordaje comprehensivo. Tomo II. Barcelona, Masson, 1998.
- [65] Yui K, Ishiguro T, Goto K, Ikemoto S. Precipitating factors in spontaneous recurrence of methamphetamine psychosis. *Psychopharmacology (Berl)* 134(3) (1997) 303-8.
- [66] Yui K, Goto K, Ikemoto S, Ishiguro T. Methamphetamine psychosis: spontaneous recurrence of paranoid-hallucinatory states and monoamine neurotransmitter function. *J Clin Psychopharmacol* 17(1) (1997) 34-43.
- [67] Parr MJA, Low HM, Botterill P. Hyponatraemia and death after 'ecstasy' ingestion. *Med J Australia* 166 (1997) 136-7.

- [68] Henry JA, Jeffreys KJ, Dawling S. Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Lancet* 340 (1992) 384-7.
- [69] Chadwick IS, Curry PD, Linsley A, Freemont AJ, Doran B. Ecstasy, 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), a fatality with coagulopathy and hyperthermia. *J Royal Soc Med* 84(6) (1991) 371.
- [70] Campkin NTA, Davies UM. Another death from ecstasy. *J Royal Soc Med* 85 (1992) 61.
- [71] Screatton GR, Cairns HS, Sarner M, Singer M, Thrasher A, Cohen SL. Hyperpyrexia and rhabdomyolysis after MDMA ("ecstasy") abuse. *Lancet* 339 (1992) 677-678.
- [72] Hughes JC, McCabe M, Evans RJ. Intracranial haemorrhage associated with ingestion of 'ecstasy'. *Arch Emerg Med* 10 (1993) 372-374.
- [73] The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. Florida State University College of Medicine. <http://library.med.utah.edu/WebPath/webpath.html>.
- [74] Ellenhorn MJ. Ellenhorn's Medical Toxicology. 2nd Edition. Baltimore, Williams and Wilkins, 1997.
- [75] Observatorio Español sobre Drogas (OED). Informe 2004. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. <http://www.msc.es/pnd/>.
- [76] Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías. Informe anual 2005. <http://www.emcdda.europa.eu>.
- [77] Cabrera Bonet R, Cabrera Forreiro J. Principales drogas de abuso en nuestro medio. En: Las drogas de abuso: un reto sanitario. Madrid, Universidad Pontificia de Comillas, 1994.
- [78] Oficina de la Naciones Unidas contra la droga y el delito (ONUDD). Tendencias mundiales de las drogas ilícitas 2003, ONUDD, Viena.
- [79] Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito (ONUDD). Ecstasy and amphetamines: global survey 2003, ONUDD, Viena.
- [80] Comisión de estupefacientes del Consejo Económico y Social de las Naciones Unidas (CND). Situación mundial del tráfico de drogas. Informe de la Secretaría, Comisión de Estupefacientes del Consejo Económico y Social de las Naciones Unidas, Viena, 2004.
- [81] Comisión de estupefacientes del Consejo Económico y Social de las Naciones Unidas (CND). Situación mundial del tráfico de drogas. Informe de la Secretaría, Comisión de Estupefacientes del Consejo Económico y Social de las Naciones Unidas, Viena, 2005.

- [82] Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes (JIFE). Report of the Internacional Narcotics Control Borrada 2004, JIFE, Nueva York.
- [83] Informes nacionales de la red Reitox (2004). <http://www.emcdda.eu.int/>
- [84] Di Maio VJM, Dana SE. Manual de Patología Forense. Traducción coordinada por Prof. L Concheiro. Madrid, Diaz de Santos, 2003.
- [85] Jones G. Postmortem Toxicology. En: Moffat AC, Osselton MD, Widdop B (Editores). Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Volume 1. 3ª Edición. Londres, Pharmaceutical Press, 2001.
- [86] Hearn WL, Walls HC. Introduction to postmortem toxicology. En: Karch SB (Editor). Drug Abuse Handbook. Boca Raton, CRC Press, 1998.
- [87] Moeller MR, Steinmeyer S, Kraemer T. Determination of drugs of abuse in blood. J Chromatogr B 713 (1998) 91-109.
- [88] Jenkins AJ. Forensic Drug Testing. En: Levine B (Editor). Principles of Forensic Toxicology. American Association for Clinical Chemistry, Inc., 1999.
- [89] Cone EJ, Yousefnejad D, Darwin WD, Maguire T. Testing human hair for drugs of abuse II. Identification of unique cocaine metabolites in hair of drug abusers and evaluation of decontamination procedures. J Anal Toxicol 15 (1991) 250-55.
- [90] Kintz P, Samyn N. Determination of "Ecstasy" components in alternative biological specimens. J Chromatogr B 733 (1999) 137-143.
- [91] Kintz P, Samyn N. Use of alternative specimens: Drugs of abuse in saliva and doping agents in hair. Ther Drug Monit 24(2) (2002) 239-47.
- [92] Caplan YH, Goldberger BA. Alternative specimens for workplace drug testing. J Anal Toxicol 25(5) (2001) 396-99.
- [93] Samyn N, De Boeck G, Verstraete A. The use of oral fluid and sweat wipes for the detection of drugs of abuse in drivers. J Forensic Sci 47(6) (2002) 1-8.
- [94] Skopp G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. Forensic Sci Int 142 (2004) 75-100.
- [95] Hepler RR, Isenschmid DS. Specimen selection, collection, preservation, and security. En: Karch SB (Editor). Drug Abuse Handbook. Boca Raton, CRC Press, 1998.
- [96] Forrest ARW. Obtaining samples at postmortem examination for toxicological and biochemical analyses. J Clin Pathol 46 (1993) 292-96.

- [97] Dalpe-Scott M, Degouffe M, Garbutt D, Drost M. A comparison of drug concentrations in postmortem cardiac and peripheral blood in 320 cases. *Can Soc Forensic Sci J* 28 (1995) 113-121.
- [98] Levine B. Postmortem Forensic Toxicology. En: Levine B (Editor). *Principles of Forensic Toxicology*. American Association for Clinical Chemistry, Inc., 1999.
- [99] De Letter EA, De Paepe P, Clauwaert KM, Belpaire FM, Lambert WE, Van Bocxlaer JF, Piette MHA. Is vitreous humor useful for the interpretation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) blood levels? Experimental approach with rabbits. *Int J Legal Med* 114 (2000) 29-35.
- [100] Drummer OH. Postmortem toxicology of drugs of abuse. *Forensic Sci Int* 142 (2004) 101-113.
- [101] Contreras Montero MT. Aplicación del líquido pericárdico al análisis de drogas de abuso en toxicología forense. Tesis doctoral, Universidad de Granada, 2001.
- [102] Pounder DJ, Adams E, Fuke C, Langford AM. Site to site variability of postmortem drug concentrations in liver and lung. *J Forensic Sci* 41(6) (1996) 927-32.
- [103] Langford AM, Taylor KK, Pounder DJ. Drug concentration in selected skeletal muscles. *J Forensic Sci* 43(1) (1998) 22-27.
- [104] Kintz P. Value of hair analysis in postmortem toxicology. *Forensic Sci Int* 142 (2004) 127-134.
- [105] Lemos LP, Anderson RA, Robertson JR. Nail analysis for drugs of abuse: extraction and determination of cannabis in fingernails by RIA and GC-MS. *J Anal Toxicol* 26 (2002) 489-92.
- [106] Engelhart DA, Jenkins AJ. Detection of cocaine analytes and opiates in nails from postmortem cases. *J Anal Toxicol* 26 (2002) 489-492.
- [107] Hand C, Baldwin D. Immunoassays. En: Moffat AC, Osselton MD, Widdop B (Editores). *Clarke's Analysis of Drugs and Posions*, Volume 1. 3ª Edición. Londres, Pharmaceutical Press, 2001.
- [108] Miñones Trillo J. Técnicas Instrumentales para Farmacia. Dpto. de Físico-Química de la Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Sin fecha.
- [109] Dawling S. Gas Chromatography. En: Moffat AC, Osselton MD, Widdop B (Editores). *Clarke's Analysis of Drugs and Posions*, Volume 1. 3ª Edición. Londres, Pharmaceutical Press, 2001.

- [110] Kupiec T, Slawson M, Pragst F, Herzler M. High performance liquid chromatography. En: Moffat AC, Osselton MD, Widdop B (Editores). Clarke's Analysis of Drugs and Posions, Volume 1. 3ª Edición. Londres, Pharmaceutical Press, 2001.
- [111] Arthur CL, Pawliszyn J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal Chem* 62 (1990) 2145-8.
- [112] Zhang Z, Yang MJ, Pawliszyn J. Solid Phase Microextraction. A solvent-Free Alternative for Sample Preparation. *Anal Chem* 66 (1994) 844A-854A.
- [113] Armbruster DA, Hubster EC, Kaufman MS, Ramon MK. Cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA) for drugs-of.abuse screening. *Clin Chem* 41 (1995) 92-98.
- [114] Caplan YH, Levine B, Goldberger B. Fluorescence polarization immunoassay evaluated for screening for amphetamine and methamphetamine in urine. *Clin Chem* 33 (1987) 1200-1202.
- [115] Dasgupta A, Saldana S, Kinnaman G, Smith M, Johansen K. Analytical performance evaluation of Emit®-II monoclonal amphetamine methamphetamine assay-more specificity than Emit ® Dau™ monoclonal amphetamine methamphetamine assay. *Clin Chem* 39 (1993) 104-108.
- [116] Lekskulchai V, Mokkhavesa C. Evaluation of Roche Abuscreen ONLINE amphetamine immunoassay for screening of new amphetamine analogues. *J Anal Toxicol* 25 (2001) 471-475.
- [117] Poklis A, Hall KV, Eddleton RA, Fitzgerald RL, Saady JJ, Bogema SC. Emit-Dau monoclonal amphetamine methamphetamine assay. 1. Stereoselectivity and clinical evaluation. *Forensic Sci Int* 59 (1993) 49-62.
- [118] Poklis A, Fitzgerald RL, Hall KV, Saady JJ. Emit-Dau monoclonal amphetamine methamphetamine assay. 2. Methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Forensic Sci Int* 59 (1993) 63-70.
- [119] Loor R, Lingenfelter C, Wason PP, Tang K, Davoudzadeh D. Multiplex assay of amphetamine, methamphetamine, and ecstasy drug using CEDIA® technology. *J Anal Toxicol* 26 (2002) 267-273.
- [120] Laloup M, Tilman G, Maes V, De Boeck G, Wallemacq P, Ramaekers J, Samyn N. Validation of an ELISA-based screening assay for the detection of amphetamine, MDMA and MDA in blood and oral fluid. *Forensic Sci Int* 153 (2005) 29-37.
- [121] Ruangyuttikarn W, Moody DE. Comparision of three commercial amphetamine immunoassays for the detection of methamphetamine, methylenedioxyamphetamine, methylenedioxymethamphetamine, and methylenedixyethylamphetamine. *J Anal Toxicol* 12 (1998) 229-233.

- [122] D'Nicuola J, Jones R, Levine B, Smith ML. Evaluation of six commercial amphetamine and methamphetamine immunoassays for cross-reactivity to phenylpropanolamine and ephedrine in urine. *J Anal Toxicol* 16 (1992) 211-213.
- [123] Cody JT, Schwarzhoff R. Fluorescence polarization immunoassay detection of amphetamine, methamphetamine, and illicit amphetamine analogs. *J Anal Toxicol* 17 (1993) 26-30.
- [124] de la Torre R, Badia R, González G, García M, Pretel MJ, Farré M, Segura J. Cross-reactivity of stimulants found in sports drug testing by two fluorescent polarization immunoassays. *J Anal Toxicol* 20 (1996) 165-170.
- [125] Baker DP, Murphy MS, Shepp PF, Royo VR, Cladarone ME, Escoto B, Salamone SJ. Evaluation of Abuscreen Online assay for amphetamines on the Hitachi 737-comparison with Emit and GC-MS methods. *J Forensic Sci* 40 (1995) 108-112.
- [126] Hsu J, Liu C, Hsu CP, Tsay WI, Li JH, Lin DL, Liu RH. Performance characteristics of selected immunoassays for preliminary test of 3,4-methylenedioxymethamphetamine, methamphetamine, and related drugs in urine specimens. *J Anal Toxicol* 27 (2003) 471-478.
- [127] Lua AC, Hu AR, Lin BF, Yeh PC, Lin HR, Tseng YT. Evaluation of immunoassays for the determination of MDMA and cannabinoids in urine samples. *J Food Drug Anal* 11 (2003) 108-113.
- [128] Przekop MA, Manno JE, Kunsman GW, Cockerham KR, Manno BR. Evaluation of the Abbott Adx Amphetamine Methamphetamine II abused drug assay-comparison to TDx, Emit, and GC-MS methods. *J Anal Toxicol* 15 (1991) 323-326.
- [129] Stout PR, Klette KL, Horn CK. Evaluation of ephedrine, pseudoephedrine and phenylpropanolamine concentrations in human urine samples and a comparison of the specificity of DRI® amphetamines and Abuscreen® online (KIMS) amphetamines screening immunoassays. *J Forensic Sci* 49 (2004) 160-164.
- [130] Stout PR, Klette KL, Wiegand R. Comparison and evaluation of DRI® methamphetamine, DRI Ecstasy; Abuscreen® ONLINE amphetamine, and a modified Abuscreen ONLINE amphetamine screening immunoassays for the detection of amphetamine (AMP), methamphetamine (MTH), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in human urine. *J Anal Toxicol* 27 (2003) 265-269.
- [131] Zhao HR, Brenneisen R, Scholer A, McNally AJ, ElSohly MA, Murphy TP, Salamone SJ. Profiles of urine samples taken from ecstasy users at rave parties: analysis by immunoassays, HPLC, and GC-MS. *J Anal Toxicol* 25 (2001) 258-269.

- [132] Verstraete A, Heyden FV. Comparison of the Sensitivity and Specificity of Six Immunoassays for the Detection of Amphetamines in Urine. *J Anal Toxicol* 29 (2005) 359-364.
- [133] Pizarro N, Ortuño J, Farré M, Hernández-López C, Pujadas M, Llebaría A, Joglar J, Roset PN, Mas M, Segura J, Camí J, de la Torre R. Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis. *J Anal Toxicol* 26(3) (2002) 157-165.
- [134] Frison G, Tedeschi L, Favretto D, Reheman A, Ferrara SD. Gas chromatography/mass spectrometry determination of amphetamine-related drugs and ephedrine in plasma, urine and hair samples after derivatization with 2,2,2-trichloroethylchloroformate. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19(7) (2005) 919-927.
- [135] Kankaanpää A, Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P, Mykkanen S, Seppala T. Single-step procedure for gas chromatography-mass spectrometry screening and quantitative determination of amphetamine-type stimulants and related drugs in blood, serum, oral fluid and urine samples. *J Chromatogr B* 810(1) (2004) 57-68.
- [136] Peters FT, Schaefer S, Staack RF, Kraemer T, Maurer HH. Screening for and validated quantification of amphetamines and of amphetamine- and piperazine-derived designer drugs in human blood plasma by gas chromatography/mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 38(6) (2003) 659-676.
- [137] Nishida M, Namera A, Yashiki M, Kojima T. Routine analysis of amphetamine and methamphetamine in biological materials by gas chromatography-mass spectrometry and on-column derivatization. *J Chromatogr B* 789(1) (2003) 65-71.
- [138] Schutz H, Gotta JC, Erdmann F, Risse M, Weiler G. Simultaneous screening and detection of drugs in small blood samples and bloodstains. *Forensic Sci Int* 126(3) (2002) 191-196.
- [139] Nishida M, Namera A, Yashiki M, Kojima T. On-column derivatization for determination of amphetamine and methamphetamine in human blood by gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 125(2-3) (2002) 156-162.
- [140] Soriano T, Jurado C, Menéndez M, Repetto M. Improved solid-phase extraction method for systematic toxicological analysis in biological fluids. *J Anal Toxicol* 25(2) (2001) 137-143.
- [141] Okajima K, Namera A, Yashiki M, Tsukue I, Kojima T. Highly sensitive analysis of methamphetamine and amphetamine in human whole blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 116(1) (2001) 15-22.

- [142] Lee MR, Song YS, Hwang BH, Chou CC. Determination of amphetamine and methamphetamine in serum via headspace derivatization solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 896(1-2) (2000) 265-273.
- [143] Staerk U, Kulpmann WR. High-temperature solid-phase microextraction procedure for the detection of drugs by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 745(2) (2000) 399-411.
- [144] Namera A, Yashiki M, Liu J, Okajima K, Hara K, Imamura T, Kojima T. Simple and simultaneous analysis of fenfluramine, amphetamine and methamphetamine in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry after headspace –solid phase microextraction and derivatization. *Forensic Sci Int* 109(3) (2000) 215-223.
- [145] Sato M, Mitsui T. Rapid and simple determination of methamphetamine and amphetamine in blood by simultaneous extraction-derivatization. *J Pharm Biomed Anal* 16(1) (1997) 139-145.
- [146] Hara K, Kashimura S, Hieda Y, Kageura M. Simple extractive derivatization of methamphetamine and its metabolites in biological materials with Extrelut columns for their GC-MS determination. *J Anal Toxicol* 21(1) (1997) 54-58.
- [147] Nagasawa N, Yashiki M, Iwasaki Y, Hara K, Kojima T. Rapid analysis of amphetamines in blood using head space-solid phase microextraction and selected ion monitoring. *Forensic Sci Int* 78(2) (1996) 95-102.
- [148] Reimer ML, Mamer OA, Zavitsanos AP, Siddiqui AW, Dadgar D. Determination of amphetamine, methamphetamine and desmethyldiprenyl in human plasma by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom* 22(4) (1993) 235-242.
- [149] Gjerde H, Hasvold I, Pettersen G, Christophersen AS. Determination of amphetamine and methamphetamine in blood by derivatization with perfluorooctanoyl chloride and gas chromatography/mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 17(2) (1993) 65-68.
- [150] Narasimhachari N, Friedel RO, Schlemmer F, Davis JM. Quantitation of amphetamine in plasma and cerebrospinal fluid by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring, using beta-methylphenethylamine as in internal standard. *J Chromatogr* 164(3) (1979) 386-393.
- [151] Lin HR, Lua AC. Simultaneous determination of amphetamines and ketamines in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20(11) (2006) 1724-1730.
- [152] Klette KL, Jamerson MH, Morris-Kukoski CL, Kettle AR, Snyder JJ. Apid simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxymamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, and

3,4-methylenedioxyethylamphetamine in urine by fast gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 29(7) (2005) 669-674.

[153] Nishida M, Namera A, Yashiki M, Kimura K. Miniaturized sample preparation method for determination of amphetamines in urine. *Forensic Sci Int* 143(2-3) (2004) 163-167.

[154] Furesz J, Kocsis G, Gachalyi A, Karvaly G, Boldis O. Mass selective detection of amphetamine, methamphetamine, and related compounds in urine. *J Chromatogr Sci* 42(5) (2004) 259-262.

[155] El-Haj BM, Al-Amri AM, Hassan MH, Ali HS, Bin Khadem RK. The use of cyclohexanone as "derivatizing" reagent for GC-MS detection of amphetamines and ephedrine in seizures and the urine. *Forensic Sci Int* 135(1) (2003) 16-26.

[156] Huang Z, Zhang S. Confirmation of amphetamine, methamphetamine, MDA and MDMA in urine samples using disk solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry after immunoassay screening. *J Chromatogr B* 792(2) (2003) 241-247.

[157] Raikos N, Christopoulou K, Theodoridis G, Tsoukali H, Psaroulis D. Determination of amphetamines in human urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *J Chromatogr B* 789(1) (2003) 59-63.

[158] Huang MK, Liu C, Huang SD. One step and highly sensitive headspace solid-phase microextraction sample preparation approach for the analysis of methamphetamine and amphetamine in human urine. *Analyst* 127(9) (2002) 1203-1206.

[159] Koster EH, Bruins CH, de Jong GJ. On-fiber derivatization for direct immersion solid-phase microextraction. Part II. Acylation of amphetamine with pentafluorobenzoyl chloride for urine analysis. *Analyst* 127(5) (2002) 598-602.

[160] Pellegrini M, Rosati F, Pacifici R, Zuccaro R, Romolo FS, López A. Rapid screening method for determination of Ecstasy and amphetamines in urine samples using gas chromatography-chemical ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr B* 769(2) (2002) 243-251.

[161] Yamada H, Yamahara A, Yasuda S, Abe M, Oguri K, Fukushima S, Ikeda-Wada S. Dansyl chloride derivatization of methamphetamine: a method with advantages for screening and analysis of methamphetamine in urine. *J Anal Toxicol* 26(1) (2002) 17-22.

[162] Namera A, Yashiki M, Kojima T, Ueki M. Automated headspace solid-phase microextraction and in-matrix derivatization for the determination of amphetamine-related drugs in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr Sci* 40(1) (2002) 19-25.

[163] Wang SM, Giang YS, Ling YC. Simultaneous supercritical fluid extraction and chemical derivatization for the gas chromatographic-isotope dilution mass

spectrometric determination of amphetamine and methamphetamine in urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 759(1) (2001) 17-26.

[164] Karacic V, Skender L. Analysis of drugs of abuse in urine by gas chromatography/mass spectrometry: experience and application. *Arh Hig Rada Toksikol* 51(4) (2000) 389-400.

[165] Ugland HG, Krogh M, Rasmussen KE. Automated determination of 'Ecstasy' and amphetamines in urine by SPME and capillary gas chromatography after propylchloroformate derivatisation. *J Pharm Biomed Anal* 19(3-4) (1999) 463-475.

[166] Jurado C, Giménez MP, Soriano T, Menéndez M, Repetto M. Rapid analysis of amphetamine, methamphetamine, MDA, and MDMA in urine using solid-phase microextraction, direct on-fiber derivatization, and analysis by GC-MS. *J Anal Toxicol* 24(1) (2000) 11-16.

[167] Myung SW, Min HK, Kim S, Kim M, Cho JB, Kim TJ. Determination of amphetamine, methamphetamine and dimethamphetamine in human urine by solid-phase microextraction (SPME)-gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 716(1-2) (1998) 359-365.

[168] Dasgupta A, Spies J. A rapid novel derivatization of amphetamine and methamphetamine using 2,2,2-trichloroethyl chloroformate for gas chromatography electron ionization and chemical ionization mass spectrometric analysis. *Am J Clin Pathol* 109(5) (1998) 527-532.

[169] Marquet P, Lacassie E, Battu C, Faubert H, Lachatre G. Simultaneous determination of amphetamine and its analogs in human whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 700(1-2) (1997) 77-82.

[170] Ugland HG, Krogh M, Rasmussen KE. Aqueous alkylchloroformate derivatisation and solid-phase microextraction: determination of amphetamines in urine by capillary gas chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 701(1) (1997) 29-38.

[171] McCambly K, Kelly RC, Johnson T, Johnson JE, Brown WC. Robotic solid-phase extraction of amphetamines from urine for analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 21(6) (1997) 438-444.

[172] Centini F, Masti A, Barni Comparini I. Quantitative and qualitative analysis of MDMA, MDEA, MA and amphetamine in urine by headspace/solid phase micro-extraction (SPME) and GC/MS. *Forensic Sci Int* 83(3) (1996) 161-166.

[173] Kronstrand R. Identification of N-methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamine (MBDB) in urine from drug users. *J Anal Toxicol* 20(6) (1996) 512-516.

- [174] Dallakian P, Budzikiewicz H, Brzezinka H. Detection and quantitation of amphetamine and methamphetamine: electron impact and chemical ionization with ammonia-comparative investigation on Shimadzu QP 5000 GC-MS system. *J Anal Toxicol* 20(4) (1996) 255-261.
- [175] Yashiki M, Kojima T, Miyazaki T, Nagasawa N, Iwasaki Y, Hara K. Detection of amphetamine in urine using head space-solid phase microextraction and chemical ionization selected ion monitoring. *Forensic Sci Int* 76(3) (1995) 169-177.
- [176] Meatherall R. Rapid GC-MS confirmation of urinary amphetamine and methamphetamine as their propylchloroformate derivatives. *J Anal Toxicol* 19(5) (1995) 316-322.
- [177] Leis HJ, Windischhofer W, Wintersteiger R. Quantitative measurement of amphetamine in human plasma by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry using (2H₅)amphetamine as internal standard. *Biol Mass Spectrom* 23(10) (1994) 637-641.
- [178] Blandford DE, Desjardins PR. Detection and identification of amphetamine and methamphetamine in urine by GC-MS. *Clin Chem* 40(1) (1994) 145-147.
- [179] Ellerbe P, Long T, Welch MJ. The determination of amphetamine and methamphetamine in a lyophilized human urine reference material. *J Anal Toxicol* 17(3) (1993) 165-170.
- [180] Platoff GE Jr, Hill DW, Koch TR, Caplan YH. Serial capillary gas chromatography/Fourier transform infrared spectrometry/mass spectrometry (GC/IR/MS): qualitative and quantitative analysis of amphetamine, methamphetamine, and related analogues in human urine. *J Anal Toxicol* 16(6) (1992) 389-397.
- [181] Thurman EM, Pedersen MJ, Stout RL, Martin T. Distinguishing sympathomimetic amines from amphetamine and methamphetamine in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 16(1) (1992) 19-27.
- [182] Hughes RO, Bronner WE, Smith ML. Detection of amphetamine and methamphetamine in urine by gas chromatography/mass spectrometry following derivatization with (-)-methylchloroformate. *J Anal Toxicol* 15(5) (1991) 256-259.
- [183] Gan BK, Baugh D, Liu RH, Walia AS. Simultaneous analysis of amphetamine, methamphetamine, and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in urine samples by solid-phase extraction, derivatization, and gas chromatography/mass spectrometry. *J Forensic Sci* 36(5) (1991) 1331-1341.
- [184] Taylor RW, Le SD, Philip S, Jain NC. Simultaneous identification of amphetamine and methamphetamine using solid-phase extraction and gas chromatography/nitrogen phosphorous detection or gas chromatography/mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 13(5) (1989) 293-295.

- [185] Czarny RJ, Hornbeck CL. Quantitation of methamphetamine and amphetamine in urine by capillary GC/MS Part II. Derivatization with 4-carbethoxyhexafluorobutyl chloride. *J Anal Toxicol* 13(5) (1989) 257-262.
- [186] Hornbeck CL, Czarny RJ. Quantitation of methamphetamine and amphetamine in urine by capillary GC/MS. Part I. Advantages of trichloroacetyl derivatization. *J Anal Toxicol* 13(3) (1989) 144-149.
- [187] Mule SJ, Casella GA. Confirmation of marijuana, cocaine, morphine, codeine, amphetamine, methamphetamine, phencyclidine by GC-MS in urine following immunoassay screening. *J Anal Toxicol* 12(2) (1988) 102-107.
- [188] Kamei K, Murata M, Ishii K, Namekata M, Momose A. Detection of amphetamine and related amines in urine by gas chromatography and combined gas chromatography-mass spectrometry. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 21(9) (1973) 1996-2003.
- [189] Villamor JL, Bermejo AM, Fernández P, Tabernero MJ. A new GC-MS method for the determination of five amphetamines in human hair. *J Anal Toxicol* 29(2) (2005) 135-139.
- [190] Gentili S, Cornetta M, Macchia T. Rapid screening procedure based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the detection of many recreational drugs in hair. *J Chromatogr B* 801(2) (2004) 289-296.
- [191] Pujadas M, Pichini S, Poudevida S, Menoyo E, Zuccaro P, Farré M, de la Torre R. Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry assay for hair analysis of amphetamine, methamphetamine and methylenedioxy derivatives. *J Chromatogr B* 798(2) (2003) 249-255.
- [192] Lachenmeier DW, Kroener L, Musshoff F, Madea B. Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography and headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of drugs of abuse in hair samples. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17(5) (2003) 472-478.
- [193] Gentili S, Torresi A, Marsili R, Chiariotti M, Macchia T. Simultaneous detection of amphetamine-like drugs with headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 780(1) (2002) 183-192.
- [194] Musshoff F, Junker HP; Lachenmeier DW, Kroener L, Madrea B. Fully automated determination of amphetamines and synthetic designer drugs in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr Sci* 40(6) (2002) 359-364.
- [195] Musshoff F, Lachenmeier DW, Kroener L, Madea B. Automated headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of

amphetamines and synthetic designer drugs in hair samples. *J Chromatogr A* 958(1-2) (2002) 231-238.

[196] Skender L, Karacie V, Brcic I, Bagaric A. Quantitative determination of amphetamines, cocaine, and opiates in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 125(2-3) (2002) 120-126.

[197] Liu J, Hara K, Kashimura S, Kashiwagi M, Kageura M. New method of derivatization and headspace solid-phase microextraction for gas chromatographic-mass spectrometric analysis of amphetamines in hair. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 758(1) (2001) 95-101.

[198] Quintela O, Bermejo AM, Tabernero MJ, Strano-Rossi S, Chiarotti M, Lucas AC. Evaluation of cocaine, amphetamines and cannabis use in university students through hair analysis: preliminary results. *Forensic Sci Int* 107(1-3) (2000) 273-279.

[199] Allen DL, Oliver JS. The use of supercritical fluid extraction for the determination of amphetamines in hair. *Forensic Sci Int* 107(1-3) (2000) 191-199.

[200] Rohrich J, Kauert G. Determination of amphetamine and methylenedioxy-amphetamine-derivatives in hair. *Forensic Sci Int* 84(1-3) (1997) 179-188.

[201] Kintz P, Cirimele V, Tracqui A, Mangin P. Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 670(1) (1995) 162-166.

[202] Moeller MR, Fev P, Wennig R. Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine and amphetamine) in human hair by GC/MS and its application to a methadone treatment program. *Forensic Sci Int* 63(1-3) (1993) 185-206.

[203] Nakahara Y, Takahashi K, Shimamine M, Takeda Y. Hair analysis for drug abuse: I. Determination of methamphetamine and amphetamine in hair by stable isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry method. *J Forensic Sci* 36(1) (1991) 70-78.

[204] Nakahara Y, Takahashi K, Takeda Y, Konuma K, Fukui S, Tokui T. Hair analysis for drug abuse. Part II. Hair analysis for monitoring of methamphetamine abuse by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 46(3) (1990) 243-254.

[205] Suzuki O, Hattori H, Asano M. Detection of methamphetamine and amphetamine in a single human hair by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry. *J Forensic Sci* 29(2) (1984) 611-617.

[206] Scheidweiler KB, Huestis MA. A validated gas chromatographic-electron impact ionization mass spectrometric method for

methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methamphetamine and metabolites in oral fluid. *J Chromatogr B* 835(1-2) (2006) 90-99.

[207] Yonamine M, Tawil N, Moreau RL, Silva OA. Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry and headspace-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples. *J Chromatogr B* 789(1) (2003) 73-78.

[208] Cone EJ, Presley L, Lehrer M, Seiter W, Smith M, Kardos KW, Fritch D, Salamone S, Niedbala RS. Oral fluid testing for drugs of abuse: positive prevalence rates by Intercept immunoassay screening and GC-MS-MS confirmation and suggested cutoff concentrations. *J Anal Toxicol* 26(8) (2002) 541-546.

[209] Cirimele V, Kintz P, Mangin P. Detection of amphetamines in fingernails: an alternative to hair analysis. *Arch Toxicol* 70(1) (1995) 68-69.

[210] Suzuki O, Hattori H, Asano M. Nails as useful materials for detection of methamphetamine or amphetamine abuse. *Forensic Sci Int* 24(1) (1984) 9-16.

[211] ElSohly MA, Stanford DE, Murphy TP, Lester BM, Wright LL, Smeriglio VL, Verter J, Bauer CR, Shankaran S, Bada HS, Walls HC. Immunoassay and GC-MS procedures for the analysis of drugs of abuse in meconium. *J Anal Toxicol* 23(6) (1999) 436-445.

[212] Jenkins KM, Young MS, Mallet CR, Elian AA. Mixed mode solid-phase extraction procedures for the determination of MDMA and metabolites in urine using LC-MS, LC-UV, or GC-NPD. *J Anal Toxicol* 28(1) (2004) 50-58.

[213] Ortuño J, Pizarro N, Farré M, Mas M, Segura J, Camí J, Brenneisen R, de la Torre R. Quantification of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites in plasma and in urine by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 723(1-2) (1999) 221-232.

[214] Koide I, Noguchi O, Okada K, Yokoyama A, Oda H, Yamamoto S, Kataoka H. Determination of amphetamine and methamphetamine in human hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 707(1-2) (1998) 99-104.

[215] Cheung S, Nolte H, Otton SV, Tyndale RF, Wu PH, Sellers EM. Simultaneous gas chromatographic determination of methamphetamine, amphetamine and their p-hydroxylated metabolites in plasma and urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 690(1-2) (1997) 77-87.

[216] Jonsson J, Kronstrand R, Hatanpaa M. A convenient derivatization method for the determination of amphetamine and related drugs in urine. *J Forensic Sci* 41(1) (1996) 148-151.

- [217] Koves EM, Wells J. An evaluation of fused silica capillary columns for the screening of basic drugs in postmortem blood: qualitative and quantitative analysis. *J Forensic Sci* 30(3) (1985) 692-707.
- [218] Terada M. Determination of methamphetamine and its metabolites in rat tissues by gas chromatography with a nitrogen-phosphorus detector. *J Chromatogr* 318(2) (1985) 307-318.
- [219] Kumazawa T, Sato K, Seno H, Suzuki O. Rapid extraction of methamphetamine and amphetamine in body fluids with Bond Elut SCX cartridges before capillary gas chromatography. *Nippon Hoigaku Zasshi* 47(2) (1993) 129-133.
- [220] Tsuchihashi H, Nakajima K, Nishikawa M, Shiomi K, Takahashi S. Headspace gas chromatography of stimulants in urine by in-column trifluoroacetyl derivatization method. *J Chromatogr* 467(1) 1989 227-235.
- [221] Kintz P, Tracqui A, Mangin P, Lugnier AA, Chaumont AJ. A simple gas chromatographic identification and determination of 11 CNS stimulants in biological samples. Application on a fatality involving phendimetrazine. *Forensic Sci Int* 40(2) (1989) 153-159.
- [222] Jain NC. Rapid mass screening and confirmation of urinary amphetamine and methamphetamine by gas chromatography. *Clin Toxicol* 8(2) (1975) 211-224.
- [223] Lebish P, Finkle BS, Brackett JW Jr. Determination of amphetamine, methamphetamine, and related amines in blood and urine by gas chromatography with hydrogen-flame ionization detector. *Clin Chem* 16(3) (1970) 195-200.
- [224] Asghar SJ, Baker GB, Rauw GA, Silverstone PH. A rapid method of determining amphetamine in plasma samples using pentafluorobenzenesulfonyl chloride and electron-capture gas chromatography. *J Pharmacol Toxicol Methods* 46(2) (2001) 111-115.
- [225] Paetsch PR, Baker GB, Caffaro LE, Greenshaw AJ, Rauw GA, Coutts RT. Electron-capture gas chromatographic procedure for simultaneous determination of amphetamine and N-methylamphetamine. *J Chromatogr* 573(2) (1992) 313-317.
- [226] Terada M, Yamamoto T, Yoshida T, Kuroiwa Y, Yoshimura S. Rapid and highly sensitive method for determination of methamphetamine and amphetamine in urine by electron-capture gas chromatography. *J Chromatogr* 237(2) (1982) 285-292.
- [227] Fan Y, Feng YQ, Zhang JT, Da SL, Zhang M. Polymethacrylic(acid-ethylene glycol dimethacrylate)monolith in-tube solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography and analysis of amphetamines in urine samples. *J Chromatogr A* 1074(1-2) (2005) 9-16.

- [228] Soares ME, Carvalho M, Carmo H, Remiao F, Carvalho F, Bastos ML. Simultaneous determination of amphetamine derivatives in human urine after SPE extraction and HPLC-UV analysis. *Biomed Chromatogr* 18(2) (2004) 125-131.
- [229] Talwar D, Watson ID, Stewart MJ. Routine analysis of amphetamine class drugs as their naphtaquinone derivatives in human urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 735(2) (1999) 229-241.
- [230] Li NY, Li Y, Sellers EM. An improved HPLC method for analysis of methamphetamine and its metabolites in plasma. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 22(4) (1997) 427-432.
- [231] Herráez-Hernández R, Campíns-Falcó P, Sevillano-Cabez A. Liquid chromatographic analysis of amphetamine and related compounds in urine using soild-phase extraction and 3,5-dinitrobenzoyl chloride for derivatization. *J Chromatogr Sci* 35(4) (1997) 169-175.
- [232] Bogusz MJ, Kala M, Maier RD. Determination of phenylisothiocyanate derivatives of amphetamine and its analogues in biological fluids by HPLC-APCI-MS or DAD. *J Anal Toxicol* 21(1) (1997) 59-69.
- [233] Herráez-Hernández R, Campíns-Falcó P, Sevillano-Cabeza A. On-line derivatization into precolumns for the determinationof drugs by liquid chromatography and column switching: determination of amphetamines in urine. *Anal Chem* 68(5) (1996) 734-739.
- [234] Molíns Legau C, Campíns-Falcó P, Sevillano-Cabeza A. Amphetamine and methamphetamine determination in urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography with sodium 1,2-naphthoquinone 4-sulfonate as derivatizing agent and solid-phase extraction for simple clean-up. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 672(1) (1995) 81-88.
- [235] Franssen RM, Stolk LM, Van den Brand W, Smith BJ. Analysis of morphine and amphetamine in meconium with immunoassay and HPLC-diodo-array detection. *J Anal Toxicol* 18(5) (1994) 294-295.
- [236] Fisher DH, Bourque AJ. Quantification of amphetamine in urine: solid-phase extraction, polymeric-reagent derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 614(1) (1993) 142-147.
- [237] Tedeschi L, Frison G, Castagna F, Giorgetti R, Ferrara SD. Simultaneous identification of amphetamine and its derivatives in urine using HPLC-UV. *Int J Legal Med* 105(5) (1993) 265-269.
- [238] Ferrara SD, Tedeschi L, Frison G, Castagna F. Solid-phase extraction and HPLC-UV confirmation of drugs of abuse in urine. *J Anal Toxicol* 16(4) (1992) 217-222.

- [239] Helmlin HJ, Brenneisen R. Determination of psychotropic phenylalkylamine derivatives in biological matrices by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Chromatogr* 593(1-2) (1992) 87-94.
- [240] Garrett ER, Seyda K, Marroum P. High performance liquid chromatographic assay of the illicit designer drug "Ecstasy", a modified amphetamine, with applications to stability, partitioning and plasma protein binding. *Acta Pharma Nord* 3(1) (1991) 9-14.
- [241] Gao CX, Chou TY, Krull IS. Polymeric activated ester reagents for off-line and on-line derivatizations of amine nucleophiles in high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *Anal Chem* 61(14) (1989) 1538-1548.
- [242] Sadeghipour F, Veuthey JL. Sensitive and selective determination of methylenedioxylated amphetamines by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatogr A* 787 (1997) 137-143.
- [243] Herráez-Hernández R, Campíns-Falcó P, Verdú Andrés J. Sensitive determination of methylenedioxylated amphetamines by liquid chromatography. *Analyst* 126 (2001) 581-586.
- [244] Clauwaert K, Van Bocxlaer J, De Letter E, Van Calenbergh S, Lambert W, De Leenheer A. Determination of the designer drugs 3,4-methylenedioxymethamphetamine, and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, and 3,4-methylenedioxyamphetamine with HPLC and fluorescence detection in whole blood, serum, vitreous humor, and urine. *Clin Chem* 46 (2000) 1968-1977.
- [245] da Costa J, da Matta Chasin A. Determination of MDMA, MDEA and MDA in urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B* 811 (2004) 41-45.
- [246] Kaddoumi A, Kikura-Hanajiri R, Nakashima K. High-performance liquid chromatography determination of 3,4-methylenedioxymethamphetamine, methamphetamine and their metabolites in human hair using DIR-Cl as a label. *Biomed Chromatogr* 18 (2004) 202-204.
- [247] Mancinelli R, Gentili S, Guiducci M, Macchia T. Simple and reliable high-performance liquid chromatography fluorometric procedure for the determination of amphetamine-derived designer drugs. *J Chromatogr B* 735 (1999) 243-253.
- [248] Concheiro M, de Castro A, Quintela O, López-Rivadulla M, Cruz A. Determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in oral fluid using high performance liquid chromatography with native fluorescence detection. *Forensic Sci Int* 150 (2-3) (2005) 221-226.

- [249] Chafer-Pericas C, Campíns-Falcó P, Herráez-Hernández R. Application of solid-phase microextraction combined with derivatization to the determination of amphetamines by liquid chromatography. *Anal Biochem* 333(2) (2004) 328-335.
- [250] Nakashima K, Kaddoumi A, Ishida Y, Itoh T, Taki K. Determination of methamphetamine and amphetamine in abusers' plasma and hair samples with HPLC-FL. *Biomed Chromatogr* 17(7) (2003) 471-476.
- [251] Al-Dirbashi OY, Kuroda N, Wada M, Takahashi M, Nakashima K. Quantification of methamphetamine, amphetamine and enantiomers by semi-micro column HPLC with fluorescence detection; applications on abusers' single hair analysis. *Biomed Chromatogr* 14(5) (2000) 293-300.
- [252] Al-Dirbashi OY, Wada M, Kuroda N, Takahashi M, Nakashima K. Achiral and chiral quantification of methamphetamine and amphetamine in human urine by semi-micro column high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J Forensic Sci* 45(3) (2000) 708-714.
- [253] Al-Dirbashi OY, Kuroda N, Inuduka S, Menichini F, Nakashima K. HPLC with fluorescence detection of methamphetamine and amphetamine in segmentally analyzed human hair. *Analyst* 124(4) (1999) 493-497.
- [254] Al-Dirbashi OY, Ouamstom J, Irgum K, Nakashima K. Simple and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of methamphetamines in urine as derivatives of 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoylchloride, a new fluorescence derivatization reagent. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 712(1-2) (1998) 105-112.
- [255] Sadeghipour F, Veuthey JL. Automated on-line dialysis and liquid chromatography of methylenedioxyated amphetamines in plasma and serum samples. *J Pharm Biomed Anal* 17(4-5) (1998) 801-810.
- [256] Al-Dirbashi OY, Kuroda N, Akiyama S, Nakashima K. High-performance liquid chromatography of methamphetamine and its related compounds in human urine following derivatization with fluorescein isothiocyanate. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 695(2) (1997) 251-8.
- [257] Wang TK, Fuh MS. Determination of amphetamine in human urine by dansyl derivatization and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 686(2) (1996) 285-290.
- [258] Herráez-Hernández R, Campíns-Flacó P, Sevillano-Cabeza A. Determination of amphetamine and related compounds in urine using on-line derivatization in octadecyl silica columns with 9-fluorenylmethylchloroformate and liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 679(1-2) (1996) 69-78.
- [259] Bowyer JF, Clausing P, Newport GD. Determination of d-amphetamine in biological samples using high-performance liquid chromatography after

precolumn derivatization with o-phthaldialdehyde and 3-mercaptopropionic acid. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 666(2) (1995) 241-250.

[260] Bourque A, Krull IS, Feibush B. Automated HPLC analyses of drugs of abuse via direct injection of biological fluids followed by simultaneous solid-phase extraction and derivatization with fluorescence detection. *Biomed Chromatogr* 8(2) (1994) 53-62.

[261] Zhou FX, Krull IS, Feibush B. 9-Fluoreneacetyltagged, solid-phase reagent for derivatization in direct plasma injection. *J Chromatogr* 609(1-2) (1992) 103-112.

[262] Hayakawa K, Hasegawa K, Imaizumi N, Wong OS, Miyazaki M. Determination of amphetamine-related compounds by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence and fluorescence detections. *J Chromatogr* 464(2) (1989) 343-352.

[263] Santagati NA, Ferrara G, Marrazzo A, Ronsisvalle G. Simultaneous determination of amphetamine and one of its metabolites by HPLC with electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal* 30(2) (2002) 247-255.

[264] Michel RE, Rege AB, George WJ. High-pressure liquid chromatography/electrochemical detection method for monitoring MDA and MDMA in whole blood and other biological tissues. *J Neurosci Methods* 50(1) (1993) 61-66.

[265] Bogusz MJ, Kruger KD, Maier RD. Analysis of underivatized amphetamines and related phenethylamines with high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 24(2) (2000) 77-84.

[266] Cairns T, Hill V, Scheffer M, Thistle W. Amphetamines in washed hair of demonstrated users and workplace subjects. *Forensic Sci Int* 145(2-3) (2004) 137-142.

[267] Cristoni S, Bernardi LR, Gerthoux P, Gonelle E, Mocarelli P. Surface-activated chemical ionization ion trap mass spectrometry in the analysis of amphetamines in diluted urine samples. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18 (2004) 1847-1855.

[268] Deventer K, Van Eenoo P, Delbeke FT. Screening for amphetamine and amphetamine-type drugs in doping analysis by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20 (2006) 877-882.

[269] Hendrickson HP, Milesi-Halle A, Laurenzana EM, Owens SM. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of methamphetamine and amphetamine using small volumes of rat serum. *J Chromatogr B* 806(2) (2004) 81-87.

- [270] Kataoka H, Lord HL, Pawliszyn. Simple and rapid determination of amphetamine, methamphetamine, and their methylenedioxy derivatives in urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 24(4) (2000) 257-265.
- [271] Miki A, Katagi M, Tsuchihashi H. Determination of methamphetamine and its metabolites incorporated in hair by column-switching liquid chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 27(2) (2003) 95-102.
- [272] Mortier KA, Dams R, Lambert WE, De Letter EA, Van Calenbergh, De Leenheer AP. Determination of paramethoxyamphetamine and other amphetamine-related designer drugs by liquid chromatography/sonic spray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 16 (2002) 865-870.
- [273] Nordgren HK, Beck O. Direct screening of urine for MDMA and MDA by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 27(1) (2003) 43-46.
- [274] Samyn N, De Boeck G, Wood M, Lamers CT, De Waard D, Brookhuis KA, Verstraete AG, Riedel WJ. Plasma, oral fluid and sweat wipe ecstasy concentrations in controlled and real life conditions. *Forensic Sci Int* 128(1-2) (2002) 90-97.
- [275] Stanaszek R, Piekoszewski W. Simultaneous determination of eight underivatized amphetamines in hair by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (HPLC-APCI-MS). *J Anal Toxicol* 28(2) (2004) 77-85.
- [276] Wood M, De Boeck G, Samyn N, Morris M, Cooper DP, Maes RA, De Bruijn EA. Development of a rapid and sensitive method for the quantitation of amphetamines in human plasma and oral fluid by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 27(2) (2003) 78-87.
- [277] Wu TY, Fuh MR. Determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedixyamphetamine and 3,4-methylenedixymethamphetamine in urine by online solid-phase extraction and ion-pairing liquid chromatography with detection by electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19(6) (2005) 775-780.
- [278] Concheiro M, de Castro A, Quintela O, López-Rivadulla M, Crz 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* 832 (2006) 81-89.
- [279] Kronstrand R, Nystrom I, Strandberg J, Druid H. Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC-MS-MS. *Forensic Sci Int* 145(2-3) 183-190.

- [280] Mortier KA, Maudens KE, Lambert WE, Clauwaert KM, Van Bocxlaer JF, Deforce DL, Van Peteghem CH, De Leenheer AP. Simultaneous, quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B* 779 (2002) 321-330.
- [281] Tatsuno M, Nishikawa M, Katagi M, Tsuchihashi H. Simultaneous determination of illicit drugs in Human Urine by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol* 20 (1996) 281-286.
- [282] Wood M, Laloup M, Ramírez-Fernández MdelM, Jenkins KM, Young MS, Ramaekers JG, De Boeck G, Samyn N. Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 150 (2-3) (2005) 227-238.
- [283] Martins LF, Yegles M, Chung H, Wennig R. Sensitive, rapid and validated gas chromatography/negative ion chemical ionization-mass spectrometry assay including derivatization with a novel chiral agent for the enantioselective quantification of amphetamine- type stimulants in hair. *J Chromatogr B* (2006) [Epub ahead of print]
- [284] Nystrom I, Trygg T, Woxler P, Ahlner J, Kronstrand R. Quantitation of R-(-)-and S-(+)-amphetamine in hair and blood by gas chromatography-mass spectrometry: an application to compliance monitoring in adult-attention deficit hyperactivity disorder treatment. *J Anal Toxicol* 29(7) (2005) 682-688.
- [285] Holler JM, Vorce SP, Bosy TZ, Jacobs A. Quantitative and isomeric determination of amphetamine and methamphetamine from urine using a non protic elution solvent and R-(-)-alpha-methoxy-alpha-trifluoromethylphenylacetic acid chloride derivatization. *J Anal Toxicol* 29(7) (2005) 652-657.
- [286] Martins LF, Yegles M, Chung H, Wenning R. Simultaneous enantioselective determination of amphetamine and congeners in hair specimens by negative chemical ionization gas chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr B* 825(1) (2005) 57-62.
- [287] Peters FT, Samyn N, Lamers CT, Riedel WJ, Kraemer T, de Boeck G, Maurer HH. Drug testing in blood: validated negative ion chemical ionization gas chromatographic-mass spectrometric assay for enantioselective measurement of the designer drugs MDEA, MDMA, and MDA and its applications to samples from a controlled study with MDMA. *Clin Chem* 51(10) (2005) 1811-1822.
- [288] Wang SM, Wang TC, Giang YS. Simultaneous determination of amphetamine and methamphetamine enantiomers in urine by simultaneous liquid-liquid extraction and diastereomeric derivatization followed by gas chromatographic-isotope dilution mass spectrometry. *J Chromatogr B* 816(1-2) (2005) 131-143.

- [289] Paul BD, Jemione KJ, Lesser D, Jacobs A, Searles DA. Enantiomeric separation and quantitation of (±)-amphetamine, (±)-methamphetamine, (±)-MDA, (±)-MDMA, and (±)-MDEA in urine specimens by GC-EI-MS after derivatization with (R)-(-)- or (S)-(+)-alpha-methoxy-alpha-(Trifluoromethyl)phenylacetyl chloride (MTPA). *J Anal Toxicol* 28(6) (2004) 449-455.
- [290] Leis HJ, Rechberger GN; Fauler G, Windischhofer W. Enantioselective trace analysis of amphetamine in human plasma by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17(6) (2003) 569-575.
- [291] Pizarro N, Llebaría A, Cano S, Joglar J, Farré M, Segura J, de la Torre R. Stereochemical analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its main metabolites by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17(4) (2003) 330-336.
- [292] Tetlow VA, Merrill J. Rapid determination of amphetamine stereoisomer ratios in urine by gas chromatography-mass spectroscopy. *Ann Clin Biochem* 33(pt1) (1996) 50-54.
- [293] Cooke BJ. Chirality of methamphetamine and amphetamine from workplace urine samples. *J Anal Toxicol* 18(1) (1994) 49-51.
- [294] Lim HK, Su Z, Foltz RL. Stereoselective disposition: enantioselective quantitation of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine and three of its metabolites by gas chromatography/electron capture negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom* 22(7) (1993) 403-411.
- [295] Fitzgerald RL, Blanke RV, Glennon RA, Yousif MY, Rosecrans JA, Poklis A. Determination of 3,4-methylenedioxymphetamines and 3,4-methylenedioxymethamphetamine enantiomers in whole blood. *J Chromatogr* 490(1) (1989) 59-69.
- [296] Fitzgerald RL, Ramos JM Jr, Bogema SC, Poklis A. Resolution of methamphetamine stereoisomers in urine drug testing: urinary excretion of R(-)-methamphetamine following use of nasal inhalers. *J Anal Toxicol* 12(5) (1988) 255-259.
- [297] Phinney KW, Sander LC. Liquid chromatographic method for the determination of enantiomeric composition of amphetamine and methamphetamine in hair sample. *Anal Bioanal Chem* 378(1) (2004) 144-149.
- [298] Buechler J, Schwab M, Mikus G, Fischer B, Hermle L, Marx C, Gron G, Spitzer M, Kovar KA. Enantioselective quantitation of the ecstasy compound (R)- and (S)-N-ethyl-3,4-methylenedioxymphetamine and its major metabolites in human plasma and urine. *J Chromatogr B* 793(2) (2003) 207-222.
- [299] Lekskulchai V. Isomeric separation of methamphetamine by HPLC chiral column. *J Med Assoc Thai* 84(11) (2001) 1604-1613.

- [300] Brunnenberg M, Kovar KA. Stereospecific analysis of ecstasy-like N-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine and its metabolites in humans. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 751(1) (2001) 9-18.
- [301] Nagai T, Matsushima K, Nagai T, Yanagisawa Y, Fujita A, Kurosu A, Tokudome S. Interpretation and enantiomers analysis of methamphetamine abusers' urine and brewed methamphetamine crystals. *J Anal Toxicol* 24(2) (2000) 140-145.
- [302] Al-Dirbashi O, Wada M, Kuroda N, Inuduka S, Nakashima K. Enantiomer-specific high-performance liquid chromatography with fluorescent detection of methamphetamines in abusers' hair and urine. *Biomed Chromatogr* 13(8) (1999) 543-547.
- [303] Makino Y, Suzuki A, Ogawa T, Shiota O. Direct determination of methamphetamine enantiomers in urine by liquid chromatography with a strong cation-exchange precolumn and phenyl-beta-cyclodextrin-bonded semi-microcolumn. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 729(1-2) (1999) 97-101.
- [304] Al-Dirbashi O, Kuroda N, Menichini F, Noda S, Minemoto M, Nakashima K. Enantioselective high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of methamphetamine and its metabolites in human urine. *Analyst* 123(11) (1998) 2333-2337.
- [305] Herráez-Hernández R, Campíns-Flacó P, Tortajada-Genaro LA. Charal determination of amphetamine and related compounds using chloroformates for derivatization and high-performance liquid chromatography. *Analyst* 123(10) (1998) 2131-2137.
- [306] Foster BS, Gilbert DD, Hutchaleeha A, Mayersohn M. Enantiomeric determination of amphetamine and methamphetamine in urine by precolumn derivatization with Marfey's reagent and HPLC. *J Anal Toxicol* 22(4) (1998) 265-269.
- [307] Palfrey S, Labib M. A simple HPLC method for the separation of amphetamine isomers in urine and its application in differentiating between 'street' amphetamine and prescribed D-amphetamine. *Ann Clin Biochem* 33(pt4) (1996) 344-346.
- [308] Sukbuntherng J, Hutchaleelaha A, Chow HH, Mayersohn M. Separation and quantitation of the enantiomers of methamphetamine and its metabolites in urine by HPLC: precolumn derivatization and fluorescence detection. *J Anal Toxicol* 19(3) (1995) 139-147.
- [309] Hutchaleelaha A, Walters A, Chow HH, Mayersohn M. Sensitive enantiomer-specific high-performance liquid chromatographic analysis of methamphetamine and amphetamine from serum using precolumn fluorescent derivatization. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 658(1) (1994) 103-112.

- [310] Nagai T, Sato M, Nagai T, Kamiyama S, Miura Y. A new analytical method for stereoisomers of methamphetamine and amphetamine and its application to forensic toxicology. *Clin Biochem* 22(6) (1989) 439-442.
- [311] Gao CX, Krull IS. Determination of enantiomeric drugs in physiological fluids using on-line solid phase derivatization and reversed-phase liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 7(10) (1989) 1183-1198.
- [312] Nagai T, Kamiyama S, Nagai T. Forensic toxicologic analysis of methamphetamine and amphetamine optical isomers by high performance liquid chromatography. *Z. Rechtsmed* 101(3) (1988) 151-159.
- [313] Katagi M, Nishioka H, Nakajima K, Tsuchihashi H, Fujima H, Wada H, Nakamura K, Makino K. Direct high-performance liquid chromatographic and high-performance liquid chromatography-thermospray-mass spectrometric determination of enantiomers of methamphetamine and its main metabolites amphetamine and p-hydroxymethamphetamine in human urine. *J Chromatogr B* 676 (1996) 35-43.
- [314] Pounder DJ, Jones GR. Postmortem drug redistribution. A toxicological nightmare. *Forensic Sci Int* 45 (1990) 253-263.
- [315] Du Moulin GC, Paterson DG. Clinical relevance of postmortem microbiologic examination: a review. *Human Pathol* 16 (1985) 539-548.
- [316] Stevens HM. The stability of some drugs and poisons in putrefying human liver tissues. *J Forensic Sci Soc* 24 (1984) 577-589.
- [317] Péliissier-Alicot AL, Gaulier JM, Champsaur P, Marquet P. Mechanisms underlying postmortem redistribution of drugs : A review. *J Anal Toxicol* 27 (2003) 533-544.
- [318] Moriya F, Hashimoto Y. Postmortem diffusion of drugs from the bladder into the femoral venous blood. *Forensic Sci Int* 123 (2001) 248-253.
- [319] Meyer E, Van Bocxlaer JF, Dirinck IM, Lambert WE, Thienpont L, De Leenheer AP. Tissue distribution of amphetamine isomers in a fatal overdose. *J Anal Toxicol* 21 (1997) 236-239.
- [320] Katsumata S, Sato K, Kashiwade H, Yamanami S, Xhou H, Yonemura I, Nakajima H, Hasekura H. Sudden death due presumably to internal use of methamphetamine. *Forensic Sci Int* 62 (1993) 209-215.
- [321] Logan BK, Weiss EL, Harruff RC. Case Report: Distribution of methamphetamine in a masive fatal ingestión. *J Forensic Sci* 41 (1996) 322-323.
- [322] Barnhart FE, Fogacci JR, Reed RW. Methamphetamine_A study of postmortem redistribution. *J Anal Toxicol* 23 (1999) 69-70.

- [323] Moriya F, Hashimoto Y. Redistribution of methamphetamine in the early postmortem period. *J Anal Toxicol* 24 (2000) 153-154.
- [324] Chaturvedi AK, Cardona PS, Soper JW, Canfield DV. Distribution and optical purity of methamphetamine found in toxic concentration in a civil aviation pilot fatality. *J Forensic Sci* 49(4) (2004) 1-5.
- [325] Rohrig TP, Prouty RW. Tissue distribution of methylenedioxymethamphetamine. *J Anal Toxicol* 16 (1992) 52-53.
- [326] De Letter EA, Clauwaert KM, Lambert WE, Van Bocxlaer JF, De Leenheer AP, Piette MHA. Distribution study of 3,4-methylenedixyamphetamine in a fatal overdose. *J Anal Toxicol* 26 (2002) 113-118.
- [327] De Letter EA, Bouche MPLA, Van Bocxlaer JF, Lambert WE, Piette MHA. Interpretation of a 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) blood level: discussion by means of a distribution study in two fatalities. *Forensic Sci Int* 141 (2004) 85-90.
- [328] Weinmann W, Bohnert M. Lethal monointoxication by overdosage of MDEA. *Forensic Sci Int* 91 (1998) 91-101.
- [329] Dams R, De Letter EA, Mortier KA, Cordonnier JA, Lambert WE, Piette MHA, Van Calenbergh S, De Leenheer AP. Fatality due to combined use of the designer drugs MDMA and PMA: A distribution study. *J Anal Toxicol* 27 (2003) 318-322.
- [330] Lora-Tamayo C, Tena T, Rodríguez A. Amphetamine derivative related deaths. *Forensic Sci Int* 85 (1997) 149-157.
- [331] Berankova K, Habrdova V, Balikova M, Strejc P. Methamphetamine in hair and interpretation of forensic findings in a fatal case. *Forensic Sci Int* 153(1) (2005) 93-97.
- [332] Kalasinsky KS, Bosy TZ, Schmunk GA, Reiber G, Anthony RM, Furukawa Y, Guttman M, Kish SJ. Regional distribution of methamphetamine in autopsied brain of chronic human methamphetamine users. *Forensic Sci Int* 116 (2001) 163-169.
- [333] Bernhard W. Ecstasy in Switzerland. Presented at the American Academy of Forensic Science Annual Meeting, Seattle, WA, 2001.
- [334] Cox DE, Williams KR. "ADAM or Eve"? – a toxicological conundrum. *Forensic Sci Int* 77 (1996) 101-108.
- [335] Crifasi JC, Long C. Traffic fatality related to the use of methylenedixymethamphetamine. *J Forensic Sci* 41 (1996) 1082-1084.
- [336] Dar KJ, Mc Brien ME. MDMA induced hyperthermia: report of a fatality and review of current therapy. *Intensive Care Med* 22(9) (1996) 995-996.

- [337] Dowling GP, Mc Donough ET, Bost RO. "Eve" and "Ecstasy". J Am Med Assoc 257(12) (1987) 1615-1617.
- [338] Duflou J, Mark A. Aortic dissection after ingestion of "Ecstasy" (MDMA). Am J Forensic Med Pathol 21(3) (2000) 261-263.
- [339] Fineschi V, Centini F, Mazzeo E, Turillazzi E. Adam (MDMA) and Eve (MDEA) misuse: an immunohistochemical study on three fatal cases. Forensic Sci Int 104(1) (1999) 65-74.
- [340] García-Repetto M, Moreno E, Soriano T, Jurado C, Giménez MP, Menéndez M. Tissue concentrations of MDMA and its metabolite MDA in three fatal cases of overdose. Forensic Sci Int 135(2) (2003) 110-114.
- [341] Ghysel MH, Dupont V, Kintz P, Tracqui A, Pépin G, Tourneau J. De la "rave"... au cauchemar. 2^e partie: Les décès après consommation d'amphétamines et dérivés. J Méd Lég Droit Méd 43 (2000) 103-106.
- [342] Gill JR, Hayes JA, de Souza IS, Marker E, Stajic M. Ecstasy (MDMA) Deaths in New York City: A Case Series and review of the Literature. J Forensic Sci 47(1) (2002) 121-126.
- [343] Henry JA, Hill IR. Fatal interaction between ritonavir and MDMA. Lancet 352 (1998) 1751-1752.
- [344] Libiseller K, Pavlic M, Grubwieser P, Rabl W. Ecstasy-deadly risk even outside rave parties. Forensic Sci Int 153(2-3) (2005) 227-230.
- [345] Lo DST, Goh EWS, Yao YJ, Wee KP. The first fatal overdose with MDMA in Singapore. TIAFT Bull 31(3) (2001) 13-14.
- [346] Moore KA, Mozayani A, Fierro MF, Poklis A. Distribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) stereoisomers in a fatal poisoning. Forensic Sci Int 83 (1996) 111-119.
- [347] Mueller PD, Korey WS. Death by "ecstasy": the serotonin syndrome? Ann Emerg Med 32(3Pt1) (1998) 377-380.
- [348] Omtzigt JGC, Vermaase CJ, Zweipfenning PGM, Van Ingen G. Deaths associated with amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDEA), or 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) abuse. TIAFT Proceedings 1994, 125-133.
- [349] Suárez RV, Riemersma R. "Ecstasy" and sudden cardiac death. Am J Forensic Med Path 9(4) (1988) 339-341.

- [350] Walubo A, Seger D. Fatal multi-organ failure after suicidal overdose with MDMA, "ecstasy": case report and review of the literature. *Human Exp Toxicol* 18(2) (1999) 119-125.
- [351] Cimbura G. 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA): Analytical and Forensic Aspects of fatal poisoning. *J Forensic Sci* 17(2) (1972) 329-333.
- [352] Balanzó X, Rafel J, de la Torre R, Camí J. Intoxicación aguda mortal por metilendioxiánfetamina. *Med Clin (Barc)* 106(18) (1996) 718.
- [353] Arimany J, Medalla J, Pujol A, Vingut A, Borondo JC, Valverde JL. Intencional overdose and death with 3,4-methylenedioxyethamphetamine (MDEA; "Eve"): case report. *Am J Forensic Med Pathol* 19(2) (1998) 148-151.
- [354] Carter N, Ruthy GN, Milroy CM, Forrest AR. Deaths associated with MBDB misuse. *Int J Legal Med* 113 (2000) 168-170.
- [355] Kraner JC, McCoy DJ, Evans MA, Evans LE, Sweeney BJ. Fatalities caused by the MDMA-related drug paramethoxyamphetamine (PMA). *J Anal Toxicol* 25 (2001) 645-648.
- [356] Martin TL. Three cases of fatal paramethoxyamphetamine overdose. *J Anal Toxicol* 25(7) (2001) 649-651(3).
- [357] Becker J, Neis P, Rohrich J, Zornlein S. A fatal paramethoxymethamphetamine intoxication. *Leg Med (Tokyo)* 5 (2003) S138-S141.
- [358] Byard RW, Gilbert J, James R, Lokan RJ. Amphetamine derivative fatalities in South Australia – is "ecstasy" the culprit? *Am J Forensic Med Pathol* 19 (1998) 261-265.
- [359] Forrest ARW, Galloway JH, Marsh ID, Strachan GA, Clark JC. A fatal overdose with 3,4-methylenedioxyamphetamine derivatives. *Forensic Sci Int* 64 (1994) 57-59.
- [360] Johansen SS, Hansen AC, Muller IB, Lundemose JB, Franzman MB. Three fatal cases of PMA and PMMA poisoning in Denmark. *J Anal Toxicol* 27 (2003) 253-256.
- [361] Milroy CM, Clark JC, Forrest AR. Pathology of deaths associated with "ecstasy" and "eve" misuse. *J Clin Pathol* 49 (1996) 149-153.
- [362] Hoja H, Marquet P, Verneuil B, Lotfi H, Penicaut B, Lachatre G. Applications of liquid chromatography-mass spectrometry in analytical toxicology: a review. *J Anal Toxicol* 21(2) (1997) 116-126.
- [363] Niessen WMA. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. *J Chromatogr A* 1000 (2003) 413-436.

- [364] Arpino P, Baldwin MA, McLafferty FW. Liquid chromatography-mass spectrometry II. Continuous monitoring. *Biomed Mass Spectrom* 1(1) (1974) 80-82.
- [365] Melera A. Design, operation and applications of a novel LC-MS interface. *Adv Mass Spectrom* 8B (1980) 1597-1615.
- [366] Appfel JA, Brinkman VAT, Frei RW. Micro post-column extraction system for interfacing reversed-phase micro liquid chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr* 312 (1984) 153-164.
- [367] Scott RPW, Scott GC, Munroe M, Hess J. Interface for on-line liquid chromatography-mass spectroscopy analysis. *J Chromatogr* 99 (1974) 395-405.
- [368] McFadden WH, Schwartz HL, Evans S. Direct analysis of liquid chromatographic effluents. *J Chromatogr* 122 (1976) 389-396.
- [369] Smith RD, Johnson AL. Deposition method for moving ribbon liquid chromatograph-mass spectrometer interfaces. *Anal Chem* 53 (1981) 739-740.
- [370] Hayes MJ, Lankmayer EP, Vouros P, Krager BL. Moving belt interface with spray deposition for liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 55 (1983) 1745-1752.
- [371] Games J, Hirter P, Kuhn W, Lewis E, Weerasinghe WCA, Westwood SA. Studies of combined liquid chromatography-mass spectrometry with a moving-belt interface. *J Chromatogr* 203 (1984) 131-138.
- [372] Ito Y, Takeuchi T, Ishii D. Direct coupling of micro high-performance liquid chromatography with fast atom bombardment mass spectrometry. *J Chromatogr B* 346 (1985) 161-166.
- [373] Caprioli A, Fan T, Cottrell JS. Continuous-flow sample probe for fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal Chem* 58 (1986) 2949-2954.
- [374] Willoughby RC, Browner RF. Monodisperse aerosol generation interface for combining liquid chromatography with mass spectrometry. *Anal Chem* 56 (1984) 2626-2631.
- [375] Browner RF, Winkler PC, Perkins DD, Abbey LE. Aerosols as Microsamples Introduction Media for Mass Spectrometry. *Microchem J* 34 (1986) 15-24.
- [376] Blakley CR, Carmody JJ, Vestal ML. A New Liquid Chromatograph/Mass Spectrometer Interface Using Crossed-Beam Techniques. *Adv Mass Spectrom* 8B (1980) 1616-1623.
- [377] Dole M, Mack LL, Hines RI, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB. Molecular Beams of Macroions. *J Chem Phys* 49 (1968) 2240-2249.

- [378] Yamashita M, Fenn JB. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J Phys Chem* 88 (1984) 4451-4459.
- [379] Horning EC, Carroll DI, Dzidic I, Haegele KD, Horning MG, Stillwell RN. Atmospheric Pressure Ionization (API) Mass Spectrometry. Solvent mediated ionization of Samples Introduced in solution and in a liquid chromatograph effluent system. *J Chromatogr Sci* 12 (1974) 725-729.
- [380] Hirabayashi A, Sakairi M, Koizumi H. Sonic spray ionization method for atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 66 (1994) 4557-4559.
- [381] Hirabayashi A, Sakairi M, Koizumi H. Sonic spray mass spectrometry. *Anal Chem* 67 (1995) 2878-2882.
- [382] Robb DB, Covey TR, Bruins AP. Atmospheric pressure photoionization: an ionization method for liquid chromatography mass spectrometry. *Anal Chem* 72 (2000) 3653-3659.
- [383] Constapel M, Schellentrager M, Schmitz OJ, et al. Atmospheric-pressure laser ionization: a novel ionization method for liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19 (2005) 326-336.
- [384] Quintela O, Cruz A, Concheiro M, de Castro A, López-Rivadulla M. Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. *Rev Toxicol* 22 (2005) 7-14.
- [385] Marquet P, Lachâtre G. Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B* 733 (1999) 93-118.
- [386] Van Bocxlaer JF, Clauwaert KM, Lambert DE, Deforce DL, Van den Eeckhout EG, De Leenheer AP. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic toxicology. *Mass Spectrom Rev* 19 (4) (2000) 165-214.
- [387] Politi L, Groppi A, Poletti A. Ionisation, ion separation and ion detection in LC-MS. En: Poletti A (Editor). *Applications of LC-MS in Toxicology*. Londres, Pharmaceutical Press, 2006.
- [388] Voyksner RD. Combining Liquid Chromatography with Electrospray Mass Spectrometry. En: Cole RB (Editor). *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications*. Nueva York, Wiley-Interscience, 1997.
- [389] Willoughby R, Sheehan E, Mitrovich S. A Global View of LC/MS, How to solve your most challenging analytical problems. 2nd Edition. Pittsburg, Global View Publishing, 2002.
- [390] Thomson BA, Iribarne JV. Field-induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *J Chem Phys* 71 (1979) 4451-4463.

- [391] Dawson, Peter H (Editors). Quadrupole Mass Spectrometry and its Applications. Woodbury, American Institute of Physics, 1995. (Su original apareció en 1976).
- [392] Sparkman OD. Mass Spec Desk Reference. 1st Edition. Pittsburgh, Global View Publishing, 2002.
- [393] Consensus SFTA. Novembre 2003. Soumission Chimique: Prise en charge toxicologique. <http://www.smlc.asso.fr/smlc/dmla/toxicologie/pdf/ConsensusSFTA.pdf>.
- [394] Maurer HH. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. J Chromatogr B 713 (1998) 3-25.
- [395] Marquet P. Progress of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical and Forensic Toxicology. Ther Drug Monit 24 (2002) 255-276.
- [396] Maurer HH. Advances in analytical toxicology: the current role of liquid chromatography-mass spectrometry in drug quantification in blood and oral fluid. Anal Bioanal Chem 381 (2005) 110-118.
- [397] Maurer HH. Multi-analyte procedures for screening and for quantification of drugs in blood, plasma or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. Clin Biochem 38 (2005) 310-318.
- [398] Wood M, Laloup M, Samyn N, Ramírez Fernández MM, de Bruijn EA, Maes RAA, De Boeck G. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry in forensic science. Journal of Chromatography A (2006) [Epub ahead of print].
- [399] Maurer HH, Peters FT. Analysis of therapeutic drugs with LC-MS. En: Poletti A (Editor). Applications of LC-MS in Toxicology. Londres, Pharmaceutical Press, 2006.
- [400] Kintz P, Villain M, Concheiro M, Cirimel V. Screening and confirmatory method for benzodiazepines and hypnotics in oral fluid by LC-MS/MS. Forensic Sci Int 150 (2005) 213-220.
- [401] Villain M, Concheiro M, Cirimel V, Kintz P. Screening method for benzodiazepines and hypnotics in hair at pg/mg level by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. J Chromatogr B 825 (2005) 72-78.
- [402] Quintela O, Cruz A, de Castro A, Concheiro M, López-Rivadulla M. Liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry for the determination of nine selected benzodiazepines in human plasma and oral fluid. J Chromatogr B 825 (2005) 63-71.

- [403] Weinmann W, Wiedeman A, Eppinger B, Renz M, Svoboda M. Screening for drugs in serum by electrspray ionization/collision-induced dissociation and library searching. *J Am Soc Mass Spectrom* 10(10) (1999) 1028-1037.
- [404] Weinmann W, Lehmann N, Muller C, Wiedemann A, Svoboda M. Identification of lorazepam and sildenafil as exapmles for the application of LC/ionspray-MS and MS-MS with mass spectra library searching in forensic toxicology. *Forensic Sci Int* 113(1-3) (2000) 339-344.
- [405] Weinmann W, Stoertzel M, Vogt S, Wendt J. Tune compounds for electrospray ionisation/in-source collision-induced dissociation with mass spectral library searching. *J Chromatogr A* 926(1) (2001) 199-209.
- [406] Saint-Marcoux F, Lachatre G, Marquet P. Evaluation of an improved general unknown screening procedure using liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry by comparision with gas chromatography and high-performance liquid-chromatography-diode array detection. *J Am Soc Mass Spectrom* 14(1) (2003) 14-22.
- [407] Venisse N, Marquet P, Duchoslav E, Dupuy JL, Lachatre G. A general unkown screening procedure for drugs and toxic compounds in serum using liquid chromatography-electrospray-single quadrupole mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 27(1) (2003) 7-14.
- [408] Concheiro M, de Castro A, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M. Development and validation of a method for the quantitation of Δ^9 tetrahydrocannabinl in oral fluid by liquid chromatography electrospray-mass-spectrometry. *J Chromatogr B* 810 (2004) 319-324.
- [409] Quintela O, Cruz A, Concheiro M, de Castro A, López-Rivadulla M. A sensitive, rapid and specific determination of midazolam in human plasma and saliva by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18 (2004) 2976-2982.
- [410] Concheiro M, Villain M, Bouchet S, Ludes B, López-Rivadulla M, Kintz P. Windows of Detection of Tetrazepam in Urine, Oral Fluid, Beard, and Hair, With a Special Focus On Drug-Facilitated Crimes. *Ther Drug Monit* 27 (2005) 565-570.
- [411] Concheiro M, de Castro A, Quintela O, López-Rivadulla M, Cruz A. Estudio comparativo de dos técnicas de cromatografía de líquidos para la determinación de anfetamina y derivados en sangre y orina: CLAR-fluorescencia vs. CL-EM. *Rev Toxicol* 22(Suplemento 1) (2005) ANA 02.
- [412] de Castro A, Concheiro M, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M. Detección de fluoxetina y su metabolito activo norfluoxetina mediante LC-MS en plasma y saliva. *Rev Toxicol* 22(Suplemento 1) (2005) ANA 03.
- [413] Shah VP, Midha KK, Findlay JWA, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Millar KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi

A. Bioanalytical method validation – A revisit with a decade of progress. *Pharm Res* 17(12) (2000) 1551-1557.

[414] Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – A review. *Accred Qual Assur* 7 (2002) 441-449.

[415] Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J Pharm Biomed Anal* 17 (1998) 193-218.

[416] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (2001) Guidance for industry, bioanalytical method validation. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>

[417] International Conference on Harmonization (ICH) (1994) Validation of analytical methods: Definitions and terminology ICH Q2A.

[418] International Conference on Harmonization (ICH) (1996) Validation of analytical methods: Definitions and terminology ICH Q2B.

[419] Taylor PJ. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 38 (2005) 328-334.

[420] Lagerwerf FM, Van Dongen WD, Steenvoorden RJJM, Honing M, Jonkman JHG. Exploring the boundaries of bioanalytical quantitative LC-MS-MS. *Trends Anal Chem* 19 (2000) 418-427.

[421] Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem* 49(2003) 1041-1044.

[422] Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 75 (2003) 3019-3030.

[423] Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at pictogram per milliliter concentrations. *Anal Chem* 70 (1998) 882-889.

[424] Buhrman D, Price P, Rudewicz P. Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a study of ion suppression. *J Am Soc Mass Spectrom* 7 (1996) 1099-1105.

[425] Fu I, Woolf EJ, Matuszewski BK. Effect of the sample matrix on the determination of indinavir in human urine by HPLC with turbo ion spray tandem mass spectrometric detection. *J Pharm Biomed Anal* 18 (1998) 347-357.

- [426] King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, Miller-Stein C, Olah T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom* 11 (2000) 942-950.
- [427] Bonfiglio R, King RC, Olah TV, Merkle K. The effects of sample preparation methods on variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13 (1999) 1175-1185.
- [428] Müller C, Schäfer P, Störtzel M, Vogt S, Weinmann W. Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectral libraries. *J Chromatogr A* 773 (2002) 47-52.
- [429] Mallet CR, Lu Z, Mazzeo JR. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18 (2004) 49-58.
- [430] Dams R, Huestis MA, Lambert WE, Murphy CM. Matrix effect in bioanalysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *J Am Soc Mass Spectrom* 14 (2003) 1290-1294.
- [431] Rivier L. Criteria for the identification of compounds by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-multiple mass spectrometry in forensic toxicology and doping analysis. *Anal Chim Acta* 492 (2003) 69-82.
- [432] International Standard for Laboratories, Version 2, World Anti-doping Agency, February 20, 2003.
- [433] Maurer HH. Screening procedures for simultaneous detection of several drug classes used for high throughput toxicological analyses and doping control. A review. *Comb Chem High Throughput Screen* 3(6) (2000) 467-480.
- [434] Maurer HH. Position of chromatographic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control. *Clin Chem Lab Med* 42(11) (2004) 1310-1324.
- [435] Moeller MR, Kraemer T. Drugs of abuse monitoring in blood for control of driving under the influence of drugs. *Ther Drug Monit* 24 (2002) 210-221.
- [436] Bogusz MJ, Maier RD, Erkens M, Driessen S. Determination of morphine and its 3- and 6-glucuronides, codeine, codeine-glucuronide and 6-monoacetylmorphine in body fluids by liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 703(1-2) (1997) 115-127.
- [437] Dienes-Nagy A, Rivier L, Giroud C, Augsburg M, Magin P. Method for quantification of morphine and its 3- and 6-glucuronides, codeine, codeine glucuronide and 6-monoacetylmorphine in human blood by liquid

chromatography-electrospray mass spectrometry for routine analysis in forensic toxicology. *J Chromatogr A* 854(1-2) (1999) 109-118.

[438] Slawson MH, Crouch DJ, Andrenyak DM, Rollins DE, Lu JK. Determination of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine-6-glucuronide in plasma after intravenous and intrathecal morphine administration using HPLC with electrospray ionization and tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 23(6) (1999) 468-473.

[439] Naidong W, Lee JW, Jiang X, Wehling M, Hulse JD, Lin PP. Simultaneous assay of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in human plasma using normal-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a silica column and an aqueous organic mobile phase. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 735(2) (1999) 255-269.

[440] Shou WZ, Pelzer M, Addison T, Jiang X, Naidong W. An automatic 96-well solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 27(1-2) (2002) 143-152.

[441] Projean D, Minh T, Ducharme J. Rapid and simple method to determine morphine and its metabolites in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 787(2) (2003) 243-253.

[442] Edwards SR, Smith MT. Simultaneous determination of morphine, oxycodone, morphine-3-glucuronide, and noroxycodone concentrations in rat serum by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 814(2) (2005) 241-249.

[443] Bengtsson J, Jansson B, Hammarlund-Udenaes M. On-line desalting and determination of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in microdialysis and plasma samples using column switching and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19(15) (2005) 2116-2122.

[444] Lin SN, Moody DE, Bigelow GE, Foltz RL. A validated liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry method for quantitation of cocaine and benzoilecgonine in human plasma. *J Anal Toxicol* 25(7) (2001) 497-503.

[445] Jeanville PM, Woods JH, Baird TJ, Estape ES. Direct determination of ecgonine methyl ester and cocaine in rat plasma, utilizing on-line sample extraction couples with rapid chromatography/quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight detection. *J Pharm Biomed Anal* 23(5) (2000) 897-907.

[446] Srinivasan K, Wang PP, Eley AT, White CA, Bartlett MG. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of cocaine and its metabolites from blood, amniotic fluid, placental and fetal tissues: study of the

metabolism and distribution of cocaine in pregnant rats. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 745(2) (2000) 287-303.

[447] Klingmann A, Skopp G, Aderjam R. Analysis of cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methyl ester, and ecgonine by high-pressure liquid chromatography-API mass spectrometry and application to a short-term degradation study of cocaine in plasma. *J Anal Toxicol* 25(6) (2001) 425-430.

[448] Maralikova B, Weinmann W. Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification. *J Chromatogr B* 811(1) (2004) 21-30.

[449] Rook EJ, Hillebrand MJ, Rosing H, Van Ree JM, Beijnen JH. The quantitative analysis of heroine, 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* 824(1-2) (2005) 213-221.

[450] Cailleux A, Le Bouil A, Auger B, Bonsergent G, Turcant A, Allain P. Determination of opiates and cocaine and its metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 23(7) (1999) 620-624.

[451] Bogusz MJ, Maier RD, Krüger KD, Kohls V. Determination of common drugs of abuse in body fluids using one isolation procedure and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical-ionization mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 22(7) (1998) 549-558.

[452] Álvarez FJ, Sancho M, Vega J, Del Rio MC, Rams MA, Queipo D. Drugs other alcohol (medicines and illicit drugs) in people involved in fatal road accidents in Spain. En: Mercier-Guyon C (Editor). *Alcohol, Drugs and Safety-T'97 Annecy*, CERMT Annecy, 1997.

[453] TIAFT data base. Therapeutic-toxic drug concentration list. <http://www.tiaft.org>

[454] Raymon L, Robertson M. Hallucinogens. En: Le Beau M, Mozayani A (Editors). *Drug-Facilitated Sexual Assault*. San Diego, Academic Press, 2001.

[455] Adelson L. Poison and Pathologist. *JAMA* 918 (1964) 128-130.

ANEXOS

Screening and confirmatory method for benzodiazepines and hypnotics in oral fluid by LC-MS/MS

Pascal Kintz^{a,*}, Marion Villain^a,
Marta Concheiro^b, Vincent Cirimele^a

^a *Laboratoire ChemTox, rue Grüniger, F-67400 Illkirch, France*

^b *Instituto de Medicina Legal, c/San Francisco s/n, Facultad de Medicina,
15782 Santiago de Compostela, Spain*

Received 24 November 2004; received in revised form 30 November 2004; accepted 1 December 2004
Available online 22 April 2005

Abstract

A procedure is presented for the screening of 17 benzodiazepines and hypnotics in oral fluid after collection with the Intercept® device by LC-MS/MS (alprazolam, 7-aminoclonazepam, 7-aminoflunitrazepam, bromazepam, clobazam, diazepam, lorazepam, lormetazepam, midazolam, nordiazepam, oxazepam, temazepam, tetrazepam, triazolam, zaleplon, zopiclone and zolpidem). The method involves extraction of 0.5 mL of oral fluid (previously stored in the Intercept blue buffer) treated with 0.5 mL of phosphate buffer (pH 8.4) in the presence of 5 ng diazepam-d₅ used as internal standard, with 3 mL of diethyl ether/methylene chloride (50/50) and separation using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. The limits of quantification for all benzodiazepines and hypnotics range from 0.1 to 0.2 ng/mL. Linearity is observed from the limit of quantification of each compound to 20 ng/mL ($r^2 > 0.99$). Coefficients of variation at 2 ng/mL, measured on 6 points range from 4 to 8% for all drugs, except zopiclone (34%). Extraction recovery, measured at the same concentration was higher than 90%. Ion suppression was evaluated for each compound and was lower than 10% for all drugs except zopiclone (93%). These results were found suitable to screen for 17 benzodiazepines in oral fluid and detect them at very low concentrations, making this method suitable for monitoring subjects under the influence.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Benzodiazepines; Hypnotics; Oral fluid; Intercept; LC-MS/MS

1. Introduction

The detection of recent drug use is an important component of assessing subjects presenting with CNS impairment. The analysis of body fluids is a source of objective information about which drug has been taken. In principle, a range of fluids, including blood, urine, oral fluid or sweat could be suitable for documenting the presence of drug(s),

but in practice, their suitability is limited by the ease in which samples can be obtained and by the availability of technology to analyze them.

Oral fluid that contains both saliva and other fluids, cellular debris and substances, which are present in the oral cavity, has been increasingly used as an analytical tool in pharmacokinetic studies, therapeutic drug monitoring and detection of illicit drugs. More recently, particular interest for oral fluid has been expressed by law enforcement agencies for roadside testing of intoxicated drivers or in occupational medicine. The presence of metabolites of drugs in

* Corresponding author. Fax: +33 3 90 400 541.

E-mail address: pascal.kintz@wanadoo.fr (P. Kintz).

Table 1

MRM transitions for the detection of 17 benzodiazepines and hypnotics and IS by LC-MS/MS

Compound	Retention time (min)	Parent ion (<i>m/z</i>)	Daughter ions (<i>m/z</i>)	Cone (Volts)	Collision energy (eV)
Alprazolam	10.9	309.1	205.2 <u>274.2</u>	45 45	40 26
7-Aminoclonazepam	7.5	286.1	222.2 <u>250.2</u>	40 40	25 20
7-Aminoflunitrazepam	8.4	284.2	<u>135.1</u> 227.2	40 40	28 25
Bromazepam	9.6	316.0	<u>182.3</u> 209.3	35 35	30 25
Clobazam	11.7	301.1	224.2 <u>259.1</u>	30 30	33 20
Diazepam	12.1	285.2	<u>154.2</u> 193.3	40 40	25 30
Lorazepam	11.0	321.1	229.1 <u>275.1</u>	30 30	27 22
Lormetazepam	11.7	335.1	177.1 <u>289.1</u>	28 28	40 20
Midazolam	9.3	326.1	244.1 <u>291.2</u>	44 44	25 28
Nordiazepam	11.1	271.2	<u>140.1</u> 165.1	40 40	25 28
Oxazepam	10.8	269.1	163.1 <u>241.2</u>	45 45	32 20
Temazepam	11.5	301.1	283.1 <u>255.2</u>	30 30	40 20
Tetrazepam	11.2	289.2	225.2 <u>253.2</u>	40 40	26 22
Triazolam	11.0	343.1	<u>308.1</u> 315.1	45 45	26 27
Zaleplon	10.4	306.2	<u>236.2</u> 264.2	40 40	28 20
Zopiclone	7.9	389.0	<u>245.1</u> 345.1	35 35	15 9
Zolpidem	8.4	308.2	<u>235.3</u> 263.2	40 40	35 26
Diazepam-d5	12.1	290.2	<u>154.1</u> 198.3	40 40	30 30

The transition for quantification is underlined.

Table 2

Validation parameters for the different compounds

Compound	Linearity	Within-batch precision (C.V., <i>n</i> = 6)	Within-batch accuracy (% bias, <i>n</i> = 6)	LOQ (ng/mL)
Alprazolam	0.1–20 ng/mL, $r^2 = 0.9987$	5.0	5.8	0.1
7-Aminoclonazepam	0.1–20 ng/mL, $r^2 = 0.9929$	5.7	6.6	0.1
7-Aminoflunitrazepam	0.1–20 ng/mL, $r^2 = 0.9969$	4.4	18.6	0.1
Bromazepam	0.1–20 ng/mL, $r^2 = 0.9935$	4.3	6.9	0.1
Clobazam	0.2–20 ng/mL, $r^2 = 0.9989$	5.2	19.7	0.2
Diazepam	0.1–20 ng/mL, $r^2 = 0.9991$	3.8	7.0	0.1
Lorazepam	0.1–20 ng/mL, $r^2 = 0.9960$	7.4	3.3	0.1
Lormetazepam	0.1–20 ng/mL, $r^2 = 0.9988$	6.7	1.5	0.1
Midazolam	0.1–20 ng/mL, $r^2 = 0.9994$	6.7	5.2	0.1
Nordiazepam	0.1–20 ng/mL, $r^2 = 0.9990$	6.0	2.9	0.1
Oxazepam	0.1–20 ng/mL, $r^2 = 0.9991$	4.4	2.8	0.1
Temazepam	0.1–20 ng/mL, $r^2 = 0.9985$	7.1	2.8	0.1
Tetrazepam	0.1–20 ng/mL, $r^2 = 0.9988$	3.9	0.6	0.1
Triazolam	0.1–20 ng/mL, $r^2 = 0.9998$	6.0	3.4	0.1
Zaleplon	0.1–20 ng/mL, $r^2 = 0.9943$	4.3	0.3	0.1
Zopiclone	0.1–20 ng/mL, $r^2 = 0.9925$	34.4	51.3	0.1
Zolpidem	0.1–20 ng/mL, $r^2 = 0.9976$	7.2	0.6	0.1

urine of potentially impaired subjects can be interpreted as evidence of relatively recent exposure. However, this does not necessarily mean that the subject was under influence at the time of sampling. It has been claimed that the concentrations of many drugs in oral fluid correlate well with blood concentrations, which suggests that qualitative measurements in this matrix may be a valuable technique to determine the current degree of exposure to a definite drug at the time of sampling [1].

The use of oral fluid as an alternative for urine testing would facilitate the procedure to screen for recent drug use on-site. The possibility of supervising the sampling without the intrusion of privacy is especially important for a police officer, a nurse or a medical doctor to avoid adulteration of the sample. The possibility of substitution or contamination appears as minimal.

A disadvantage of studying oral fluid is that people are sometimes unable to produce sufficient amounts of material

for analysis. Moreover, an important feature of urine testing is the accuracy of the on-site tests to detect drugs of abuse in fresh samples. Unfortunately, this is not the current situation for oral fluid testing. The application of the immunochemistry-based devices for screening of oral fluid did not produce satisfactory results until now [2].

This is the reason why almost all the papers dealing with the detection of benzodiazepines or hypnotics in oral fluid are based on chromatographic procedures. However, despite large abuse of these drugs, the literature appears to be sparse. Although methods have been described for one or two benzodiazepines (sometimes the major metabolite), it seems that no screening procedure has been reported for such pharmacologically-active drugs in oral fluid. Data are available for diazepam [3,4], clobazam [5], nitrazepam [6], flunitrazepam [7], zolpidem [8] and lorazepam [9]. Because of their extensive protein binding (95–99%), benzodiazepines are only present in oral fluid in very small concentra-

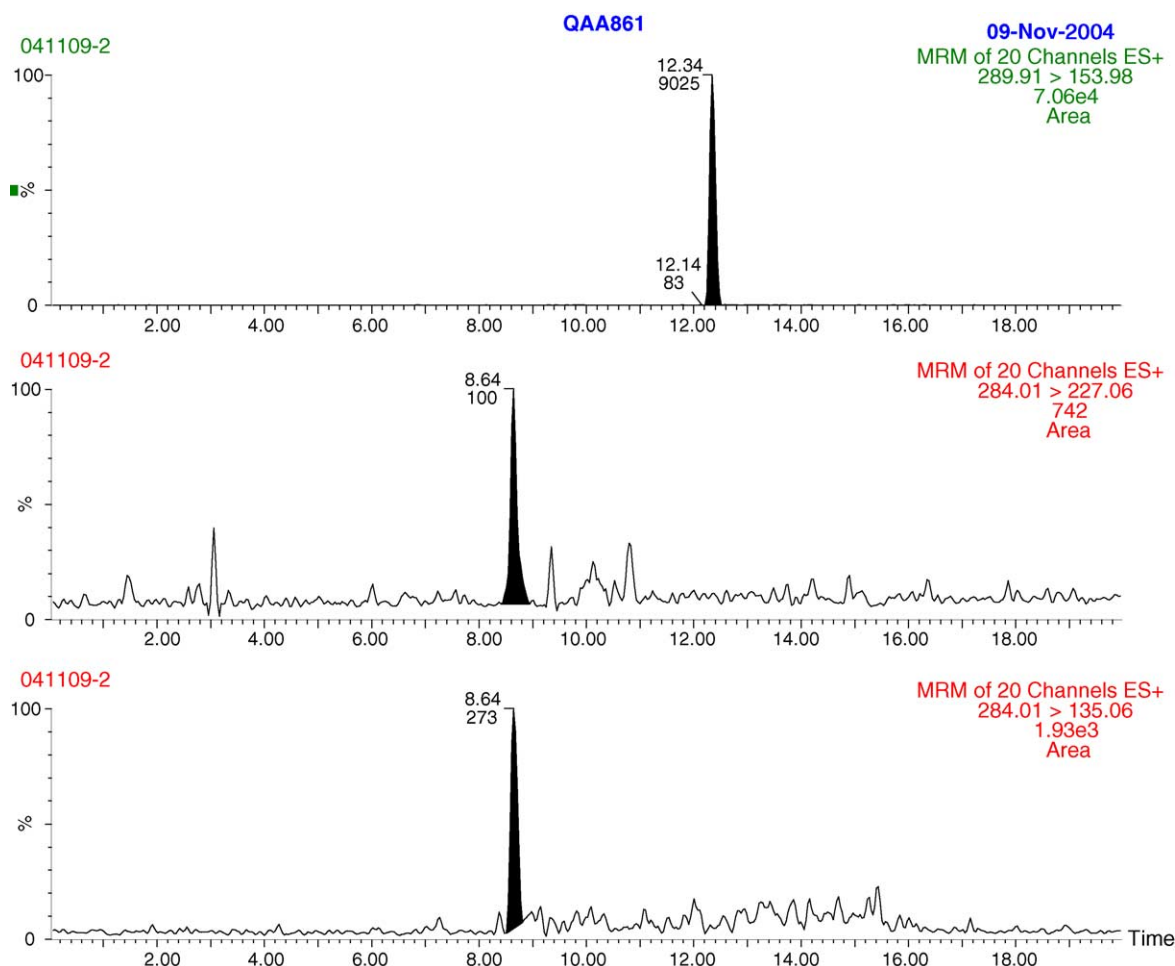


Fig. 1. Chromatogram obtained after analysis of an oral fluid specimen of a drug addict that was submitted to a screening for drugs of abuse. 7-aminoflunitrazepam was quantified at the concentration of 3 ng/mL. Top: quantification daughter ion of diazepam-d₅, mid: first daughter ion (qualifier) of 7-aminoflunitrazepam, and bottom: second daughter ion (quantification) of 7-aminoflunitrazepam.

tions, about some ng/mL. Saliva to plasma ratios are always lower than 1 in the range 0.01–0.08 [10]. Given these low concentrations, sensitive assays are needed.

The purpose of our work was to establish a screening method for the simultaneous detection of 17 benzodiazepines and hypnotics present in oral fluid after collection with the Intercept device using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The Intercept® device was used as it was considered as the reference collection in the European Commission project, the so-called ROSITA-II.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Alprazolam, 7-amino-clonazepam, 7-amino-flunitrazepam, bromazepam, clobazam, diazepam, lorazepam, lormetazepam, midazolam, nordiazepam, oxazepam, temazepam, triazolam, zolpidem and diazepam- d_5 were obtained from Promochem (Molsheim, France) and tetrazepam from Euro-

medex (Souffelweyersheim, France). Zaleplon was provided by Wyeth Laboratories (Paris, France). Zopiclone was obtained from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Formic acid (HPLC grade) was from Prolabo (Paris, France). Acetonitrile, methanol and methylene chloride (HPLC grade) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Diethyl ether was from SDS (Peypin, France). Chemicals for the saturated phosphate buffer, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ adjusted to pH 8.4 with 1N hydrochloric acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). PTFE filters (0.45 μm) were obtained from Millipore (Bedford, UK).

Drugs and diazepam, d_5 were prepared in methanol after appropriate dilutions and were stored at +4 °C.

Oral fluid was collected using the Intercept® devices (Orasure Technologies, Bethlehem, PA, USA), that were generously offered.

2.2. Specimens

Blank oral fluids were obtained from laboratory personnel through verbal consent.

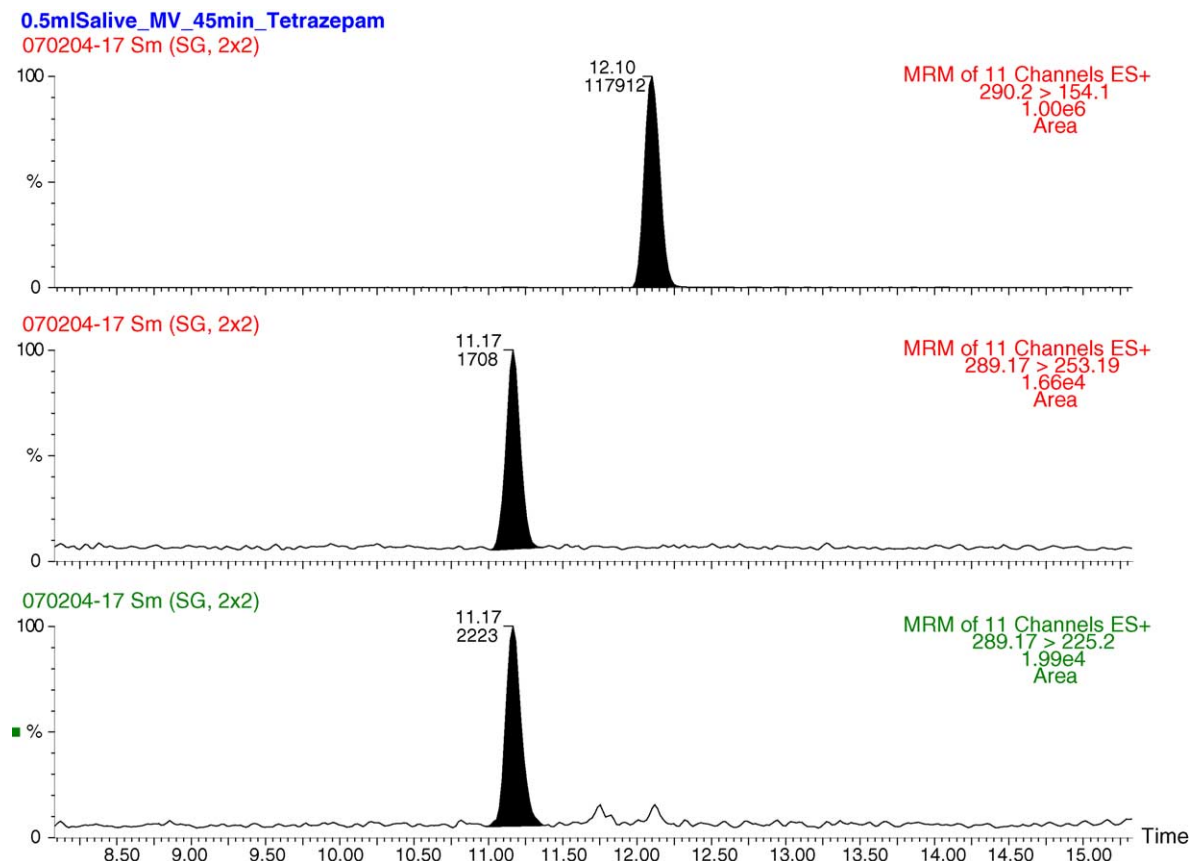


Fig. 2. Chromatogram obtained after analysis of an oral fluid specimen of a volunteer who was administered a single dose of 50 mg of tetrazepam. Tetrazepam was quantified at the concentration of 0.4 ng/mL. Top: quantification daughter ion of diazepam- d_5 , mid: first daughter ion (quantification) of tetrazepam, and bottom: second daughter ion (qualifier) of tetrazepam.

Positive specimens were obtained from impaired drivers stopped by the police during road-side controls. Subjects were asked to handle-in their mouth pad for 2 min. Immediately after, the pad was placed into the blue Orasure diluent present in a plastic tube. The device was centrifuged to obtain a clear blue liquid. It was stored at 4 °C until analysis that occurred within two weeks.

It was not possible to evaluate the amount of collected oral fluid, even by weighing the test tube before and after the centrifugation, as the volume of the blue buffer varies from device to device. According to the manufacturer, oral fluid can be collected in the range 100–900 µL, with a mean volume of 400 and 600 µL having the pad in mouth for 2 or 3 min, respectively. This amount of oral fluid is diluted in 800 µL of blue buffer for a final dilution of about 1–3.

2.3. Extraction

To 0.5 mL of the blue liquid containing oral fluid, 0.5 mL of phosphate buffer pH 8.4 was added in the presence of 5 ng of diazepam-d₅ used as internal standard (IS). The mixture was extracted by 3 mL of methylene chloride/diethylether

(50/50, v/v). After horizontal agitation (15 min) and centrifugation (10000 × *g* for 15 min), the organic phase was collected, filtered with PTFE filters (0.45 µm) and evaporated to dryness using a SpeedVac®. The residue was reconstituted by adding 50 µL of methanol.

2.4. LC-MS/MS procedure

A 10 µL aliquot of the extract was injected onto the column (XTerra MS C18 3.5 µm, 100 × 2.1 mm i.d.), protected by a 1 mm C18 frit. Each 20-min chromatographic run was carried out with a gradient (5% acetonitrile, 95% formic acid, 0.1% to a ratio 80–20% at 10 min), at a flow rate of 200 µL/min. The HPLC system was a Waters Alliance 2695.

Detection was carried out by a Micromass Quattro Micro tandem mass spectrometer equipped with an ion-spray atmospheric pressure interface. The instrument was operated in the positive ionization mode. Best results were obtained with a capillary voltage of 1 kV, source block temperature of 120 °C and desolvation gas (nitrogen) heated to 350 °C and delivered at 550 L/h. Collision cell pressure was 3 mbar of argon.

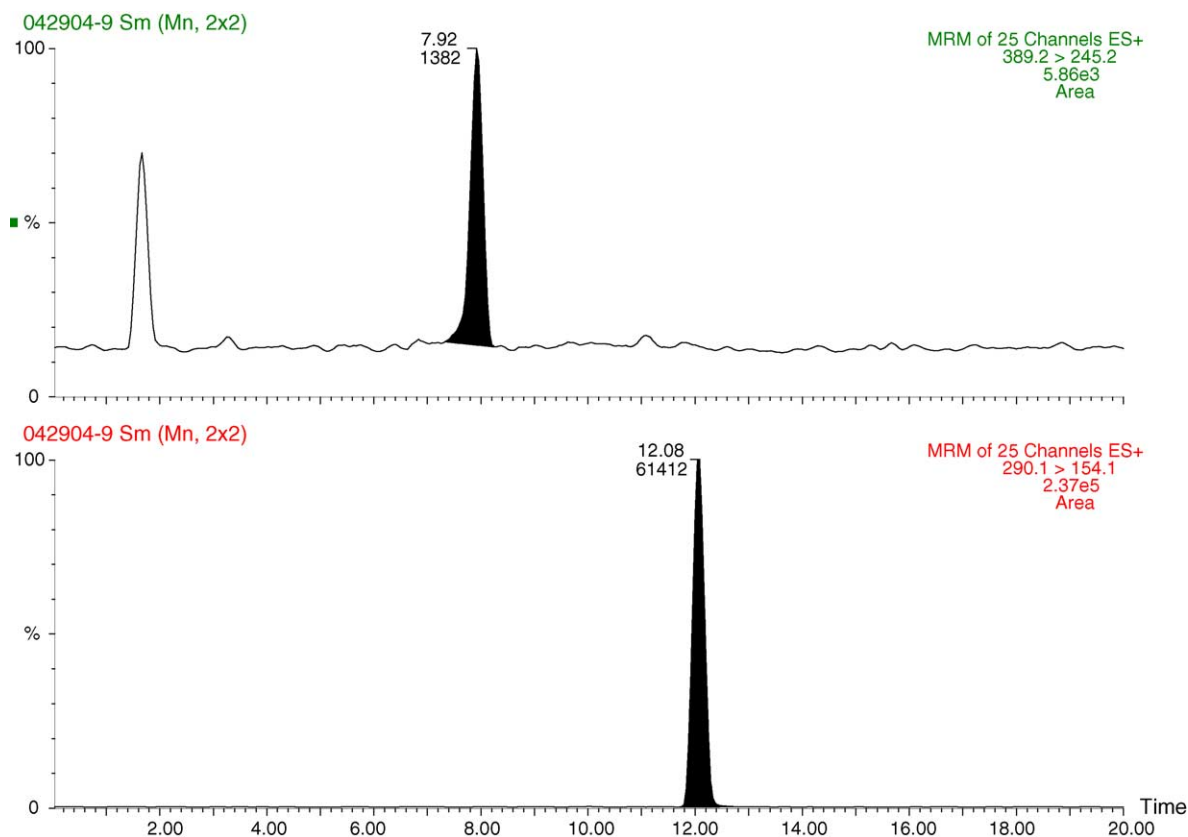


Fig. 3. Chromatogram obtained after analysis of an oral fluid specimen of a driver that was submitted to a screening for drugs of abuse. On the top, the quantification daughter ion of zopiclone, on the bottom, the quantification daughter ion of the IS. Concentration was 7.2 ng/mL.

Data were recorded in the multiple-reaction monitoring (MRM) mode. Parent ions, the corresponding daughter ions, retention time, cone voltage and collision energy optimized for the 17 benzodiazepines and IS are presented in Table 1.

2.5. Method validation

Standard calibration curves were obtained with blank oral fluid collected with the Intercept device. After centrifugation, the blue buffer was spiked with the 17 compounds to contain final concentrations of 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, and 20 ng/mL. Within batch precisions and accuracies ($n = 6$) were determined using blank oral fluid spiked with the 17 compounds at 2 ng/mL. Recovery was established at 2 ng/

mL, by comparing the analyte peak areas of three extracted samples with those of three extracted samples blanks spiked with the same amounts of the analyte after extraction.

The limit of quantification (LOQ) is the lowest concentration of analyte that could be measured specifically with the presence of the two transitions and corresponds to the lowest point of the linearity for each molecule.

The specificity of the method was evaluated by analyzing oral fluid from six non-drug consuming subjects. The matrix effect ($n = 3$) on the ESI response was evaluated by comparing the instrumental response for a calibrator at 2 ng/mL directly injected in methanol (*a*) and the same amount of compound added to pre-extracted samples (*b*). The data for the calibrator in methanol provide a relative 100% value and the matrix effect was defined as $100 \times (a-b)/a$.

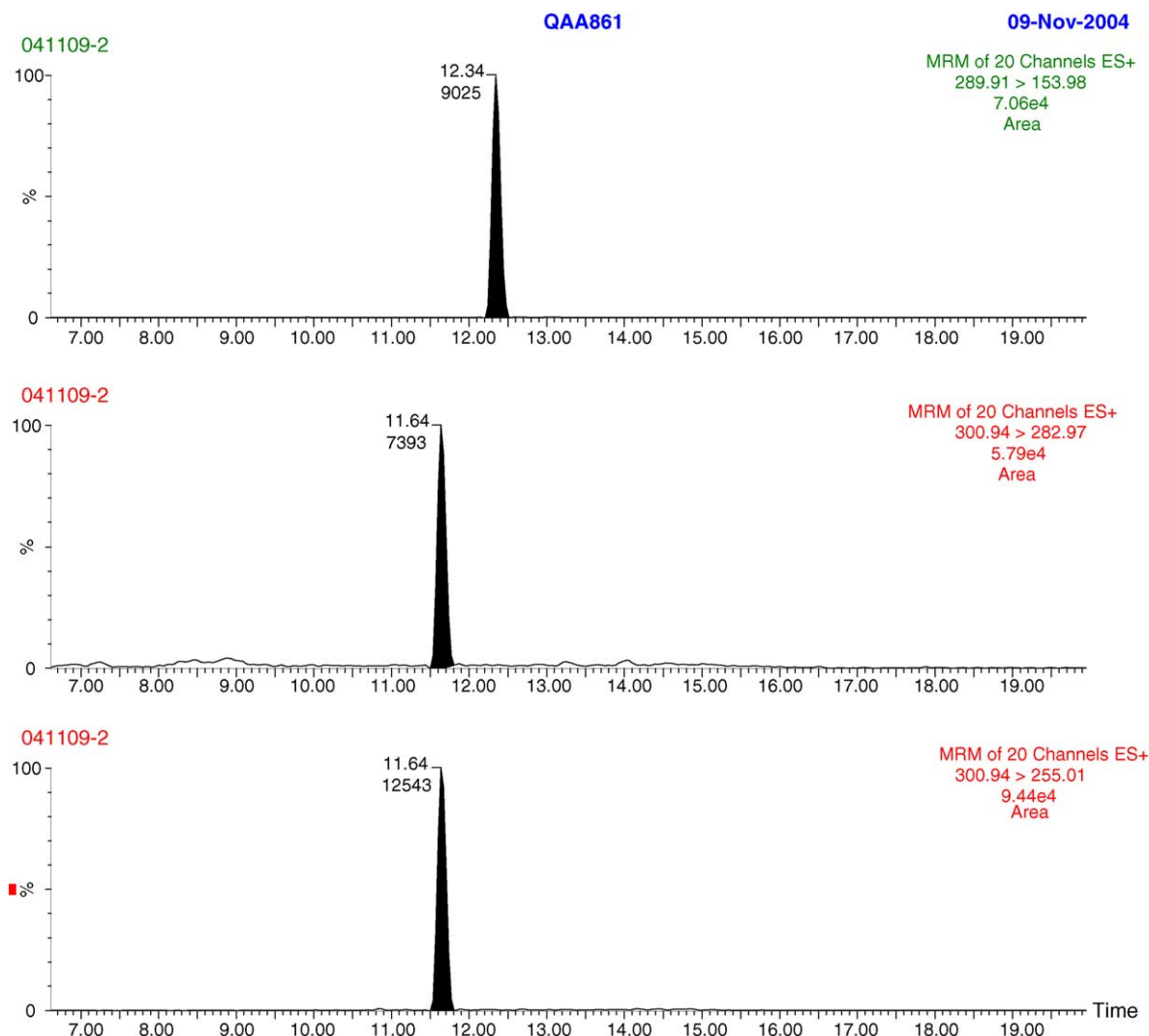


Fig. 4. Chromatogram obtained after analysis of an oral fluid specimen of the same drug addict as in Fig. 1 that was submitted to a screening for drugs of abuse. Temazepam was quantified at the concentration of 8 ng/mL. Top: quantification daughter ion of diazepam-d₅, mid: first daughter ion (qualifier) of temazepam, and bottom: second daughter ion (quantification) of temazepam.

3. Results and discussion

Until now, there has been no study comparing the effect of various collection procedures on benzodiazepines concentrations in oral fluid. This is the reason why we have chosen a standard recommended procedure, involving the Intercept device. The so-called blue liquid from the device contains stabilizing salts, non-ionic surfactants (0.5% Tween 20) and antibacterial agents that guarantee good stability for most drugs and/or metabolites when stored at +4 °C but can introduce ion suppression in LC/MS analyses. Therefore, it is mandatory to have reference standards for validation similar to real samples.

Under the chromatographic conditions used, there was no interference with the analytes by any extractable endogenous materials present in oral fluid or the blue liquid. There were no blank effects from the blue liquid. Matrix effect (oral fluid + blue liquid) was lower than 10% for all drugs except zopiclone (93%) making it an acceptable screening procedure.

Blank Intercept oral fluid was used as a matrix for standards preparation. Validation data are presented in Table 2.

The limit of quantification for all benzodiazepines and hypnotics ranged from 0.1 to 0.2 ng/mL using a 0.5 mL oral fluid sample. The method was linear in oral fluid for each compound, from the limit of quantification to 20 ng/mL ($r^2 > 0.99$). Precision at 2 ng/mL were lower than 8% in all cases except zopiclone (34%). The higher CV for zopiclone is probably due to the instability of the drug in solutions, as mentioned previously [11]. Extraction recovery, measured at the same concentrations was >80%, making it suitable for a screening procedure.

As proposed by Samyn et al. [7], in case of nitrobenzodiazepines, the target compound is the 7-amino-metabolite (e.g. 7-aminoflunitrazepam and 7-aminoclonazepam).

To demonstrate the applicability of this procedure, Figs. 1–4 represent the chromatograms obtained after analysis of subjects having consumed benzodiazepines or hypnotics stopped by the police while driving impaired, or tested in the laboratory in case of a controlled study.

As discussed previously, the measured concentrations were rather low. This method is rapid and simple, detecting all compounds from one aliquot. Therefore, it can be used for the analysis of a large number of oral fluid specimens. Specificity is observed by using two daughter ions for each compound. Finally, the procedure is flexible, as it is always possible to include new compounds, such as drugs coming from foreign countries (e.g. flurazepam, estazolam, phenazepam etc.).

4. Conclusions

Like any bio-fluid from human subject, oral fluid may transmit infectious agents and should be handled with the

appropriate precautions. As oral fluid collection with the Intercept device is non-invasive and can be done by the donor himself, it is more acceptable to many people than providing urine and can be carried out, with respect to suitable hygiene, while the donor is under observation by the collector.

Studies over the last five years have investigated the use of oral fluid as an alternative matrix to blood and urine, especially when non-intrusive and quick sampling procedures are important (e.g. screening at the roadside or workplace drug testing). However, the detection in oral fluid of benzodiazepines and hypnotics, the most abused pharmaceutical drugs in the world, appears not to be well documented as few papers are focused on drugs of abuse. This sensitive, specific and reproducible method developed is suitable for the detection and quantification of 17 benzodiazepines and hypnotics in oral fluid after collection with the Intercept device.

This technology may be useful in applications, such as the monitoring of epileptic patients or the documentation of exposure in forensic cases involving drug impairment. When compared with urine analysis or hair analysis, taking into account refusal rates and ease of implementation, oral fluid analysis was described [12] as the most feasible testing methodology for use in household surveys. There is no doubt that the development of more sensitive immunochemistry tests (on-site devices) will enhance the practicability of oral fluid collection and thus the need of confirmatory chromatographic methods.

References

- [1] N. Samyn, A. Verstraete, C. van Haeren, P. Kintz, Analysis of drugs of abuse in saliva, *Forensic Sci. Rev.* 11 (1999) 1–19.
- [2] M. Grönholm, P. Lillsunde, A comparison between on-site immunoassay drug-testing devices and laboratory results, *Forensic Sci. Int.* 121 (2001) 37–46.
- [3] C. Hallstrom, M.H. Lader, Diazepam, *N*-desmethyldiazepam concentrations in saliva, plasma and CSF, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 9 (1980) 333–339.
- [4] T. Takatori, S. Tomii, K. Terazawa, A comparative study of diazepam levels in bone marrow vs. serum, saliva and brain tissue, *Int. J. Leg. Med.* 104 (1991) 185–188.
- [5] B.J. Hart, J. Wilting, Sensitive gas chromatographic method for determining nitrazepam in serum and saliva, *J. Chromatogr.* 424 (1988) 403–409.
- [6] L. Kangas, H. Allonen, R. Lammintausta, Pharmacokinetics of nitrazepam in saliva and serum after a single oral dose, *Acta Pharmacol. Toxicol.* 45 (1979) 20–24.
- [7] N. Samyn, G. De Boeck, V. Cirimele, A. Verstraete, P. Kintz, Detection of flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam in oral fluid after controlled administration of rohypnol, *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 211–215.
- [8] P. Kintz, M. Villain, B. Ludes, Testing for zolpidem in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 811 (2004) 59–63.

- [9] P. Kintz, M. Villain, V. Cirimele, G. Pépin, B. Ludes, Windows of detection of lorazepam in urine, oral fluid and hair, with a special focus on drug-facilitated crimes, *Forensic Sci. Int.* 145 (2004) 131–135.
- [10] V. Spiehler, Drugs in saliva, in: A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop (Eds.), *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, 3rd ed., Pharmaceutical Press, London, 2004, pp. 109–123.
- [11] H.K. Nordgren, K. Bodin, O. Beck, Chromatographic screening for zopiclone and metabolites in urine using liquid chromatography and liquid chromatography–mass spectrometry techniques, *Ther. Drug Monit.* 24 (2002) 410–416.
- [12] M. Fendrich, T.P. Johnson, J.S. Wislar, A. Hubbell, Drug test feasibility in a general population household survey, *Drug Alcohol Depend.* 73 (2004) 237–250.

Determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in oral fluid using high performance liquid chromatography with native fluorescence detection

Marta Concheiro, Ana de Castro, Oscar Quintela,
Manuel López-Rivadulla, Angelines Cruz *

*Forensic Toxicology Service, Institute of Legal Medicine, University of Santiago de Compostela,
c/ San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain*

Received 24 November 2004; received in revised form 2 December 2004; accepted 2 December 2004
Available online 6 April 2005

Abstract

This paper describes the analytical methodology for the determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in oral fluid. After a liquid–liquid extraction, the analysis was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC), with fluorescence detection. The detector wavelength was fixed at 285 nm for excitation and 320 nm for emission. The mobile phase, a mixture of phosphate buffer (pH = 5) and acetonitrile (75:25), and the column, Kromasil 100 C8 5 μ m 250 mm $\times$ 4.6 mm, allowed good separation of the compounds in an isocratic mode in only 10 min. The method was validated and showed good limits of detection (2 ng/mL) and quantitation (10 ng/mL) for all the amphetamine derivatives. No interfering substances were detected. A stability study of these compounds in oral fluid stored at three different temperatures (–18, 4 and 20 °C) over 10 weeks was conducted, showing a time-dependent degradation of the four compounds.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: MDMA; MDA; MDEA; MBDB; Oral fluid; HPLC; Fluorescence

1. Introduction

Drug dependency is a very serious health problem in the world. Many substances are used as recreational drugs including the amphetamine derivatives, MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine), MDA (3,4-methylenedioxymphetamine), MDEA (3,4-methylenedioxyethylamphetamine) and MBDB (*N*-methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butamine), as stimulants or hallucinogens. Their use is increasing sharply in the last few years. In Spain the number of tablets confiscated increased 62% between 2001

and 2002, whereas the number of abuse and dependent ecstasy treatments increased from 226 in 1996 to 335 in 2001 [1].

For these reasons it is very useful to have a very quick, sensitive and specific procedure for detecting these drugs in biological samples in clinical and forensic settings.

Oral fluid (OF) is considered as the main alternative matrix to blood to document recent use of medicines or drugs of abuse [2]. OF contains saliva and other fluids and substances which are present in oral cavity. Substances tend to be detectable in OF for shorter periods than in urine, typically for the 12–24 h after consumption [3]. The greatest advantages of OF are non-invasive sample collection and staff can directly observe patients when they produce the samples, usually by placing a collection tube or device in

* Corresponding author. Tel.: +34 981582327;
fax: +34 981580336.

E-mail address: apimlgel@usc.es (A. Cruz).

their mouth; this assures staff that the sample comes from the patient and the procedure respects the patients' dignity. The disadvantage of OF is that people are sometimes unable to produce sufficient amounts of fluid for analysis.

Only a few studies have published the detection of amphetamine derivatives in OF. The technologies applied were GC–MS [2,4] and LC–MS/MS [5–7]. GC–MS is a very sensitive and specific method, but its main disadvantage is that amphetamines need derivatization, which is time consuming and expensive. LC–MS/MS is one of the best technologies but there are a lot of toxicology laboratories that cannot afford such instrumentation.

HPLC with fluorescence detection is among the most used techniques for the analysis of MDMA and analogue compounds. In the literature Sadeghipour and Veuthey developed a method in serum and tablets [8], Herráez-Hernández et al. in plasma and urine [9], Clauwaert et al. in whole blood, serum, vitreous humor and urine [10], da Costa and da Matta Chasin in urine [11], Tagliaro et al. [12] and Kaddoumi et al. [13] in hair. Mancinelli et al. [14] applied a fluorimetric procedure for the determination of amphetamines in biological matrices and street samples, and gave a brief reference to OF.

Stability must be included in the method validation. Knowledge of the stability of a drug is of importance for toxicologists in several situations, limitations of a logistic nature often introduce variable time intervals between sampling of the matrices and analysis. Even in these kinds of situations, the toxicologist should be able to determine if interpretation of the obtained quantitative data can be performed reliably [15]. Only two stability studies were found in the literature. Garret et al. [16] investigated the stability of MDA and MDMA during 47 days in frozen plasma, and Clauwaert et al. [15] studied the stability of MDA, MDMA, MDEA and MBDB over a period of 21 weeks in serum, whole blood, water and urine. No references were found on the stability of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in OF.

We present a rapid, simple and specific validated method that allows the simultaneous determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in OF using HPLC with fluorescence detection, including a preliminary stability study of amphetamine derivatives over a period of 10 weeks in OF.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All the reagents were of analytical-reagent grade. Acetonitrile, methanol, potassium dihydrogen phosphate, sodium hydroxide were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), and sodium sulphate anhydride from Panreac (Barcelona, Spain). Standards of MDMA, MDA, MDEA and MBDB were obtained from Lipomed (Arlesheim, Switzerland). Standard solutions of each compound were prepared

at a concentration of 1 mg/mL in methanol. Tox tubes A[®] from Varian (Middelburg, The Netherlands) were used for the liquid–liquid extraction.

2.2. Equipment and chromatography

The chromatographic system used was a model 616 Pump, model 717 plus Autosampler and model 474 Scanning Fluorescence Detector from Waters (Milford, Massachusetts). The detector wavelength was fixed at 285 nm for excitation and 320 nm for emission, Gain 100. A Kromasil 100 C8 5 μ m 250 mm $\times$ 4.6 mm column from Teknokroma (Barcelona, Spain) was used for the separation of analytes and, as guard cartridge, a Spherisorb[®] S5 C8 4.6 mm $\times$ 10 mm from Waters (Milford, Massachusetts). The mobile phase used was a mixture of potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄) 0.03 M pH = 5 and acetonitrile (75:25) in isocratic mode, pumped at 1 mL/min flow-rate.

2.3. Sample preparation

2.3.1. Spiked samples

Different volumes of the working standard solutions, that had been prepared in water, were added to 1 mL of drug-free OF (obtained from laboratory staff) to obtain spiked OF samples at 10, 25, 50, 125 and 250 ng/mL.

2.3.2. Liquid–liquid extraction procedure

One milliliters of OF and 1 mL of distilled water were introduced in a Tox tube A[®]. After shaking during 15 min and centrifuging during 10 min at 4800 rpm, the organic layer (1.4 mL) was collected and transferred to a clean tube. Five milliliters of NaOH 0.05 M was added. After shaking for 15 min, and before centrifuging 10 min at 4800 rpm, 8.5 g of anhydrous sodium sulphate was added.

One milliliters of the organic layer was transferred to a conical tube containing 50 μ L of methanolic HCl (5 M hydrochloric acid in methanol) and evaporated to dryness under a fine stream of nitrogen at 30 °C. The residue was reconstituted with 200 μ L of mobile phase and a 20 μ L aliquot was injected into the HPLC system.

2.4. Validation of the method

The method was validated for linearity, intra- and inter-assay precision, recovery, limits of detection and quantitation, selectivity and stability. The analytical validation was performed according to the guidelines of the FDA [17].

2.4.1. Linearity

Calibration curves were carried out for MDA, MDMA, MDEA and MBDB at concentrations between 10 and 250 ng/mL (10, 25, 50, 125, 250 ng/mL). The simplest model that adequately described the concentration–response relationship was linear regression.

Table 1

Validation parameters of the described method for the determination of MDA, MDMA, MDEA and MBDB in oral fluid by HPLC/FD

	MDA	MDMA	MDEA	MBDB
Linearity	10–250 ng/mL; $r^2 = 0.998$	10–250 ng/mL; $r^2 = 0.996$	10–250 ng/mL; $r^2 = 0.998$	10–250 ng/mL; $r^2 = 0.995$
Intra-assay precision (CV%)				
25 ng/mL	8.4	3.3	3.3	6.4
250 ng/mL	8.6	7.0	6.5	7.1
Inter-assay precision (CV%)				
25 ng/mL	7.9	8.6	5.9	8.8
250 ng/mL	16.4	19.1	20	23.5
Recovery (%)				
25 ng/mL	55.4	59.7	61.2	63.0
250 ng/mL	45.4	50.7	53.1	51.3
LOD (ng/mL)	2	2	2	2

2.4.2. Intra- and inter-assay precision

Precision, expressed as the coefficient of variation (CV) of the measured values, was expected to be less than 15% at all concentrations, except for the lower limit of quantitation (LLOQ), for which 20% was acceptable. For intra-assay precision six replicates at 25 and 250 ng/mL were analyzed on the same batch and for inter-assay precision five replicates at 25 and 250 ng/mL were analyzed on five different days.

2.4.3. Recovery

Three individual extracts and three replicates of the compounds, prepared directly in the mobile phase, were injected onto the column. The assay recovery for each compound was determined as follows: mean peak area of the extract/mean peak area direct injection $\times 100$. The recovery was determined at 25 and 250 ng/mL.

2.4.4. Limits of detection and limits of quantitation

The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were determined by analyzing decreasing concentrations of the compounds added to drug-free OF. The LOD was defined as the lowest concentration that produced a response three times higher than the background noise. The LOQ was defined as the lowest concentration that could be quantified with an imprecision $<20\%$ and was established as the lowest point of the calibration graph.

2.4.5. Selectivity

Selectivity is the ability of an analytical method to differentiate and quantify the analyte in the presence of other components in the sample. For selectivity, blank oral fluids from six different sources were analyzed and potential interfering substances were investigated. For this propose, several drugs were dissolved in mobile phase at high concentration (1 $\mu\text{g/mL}$) and were injected into the HPLC system under the same conditions of the method [10].

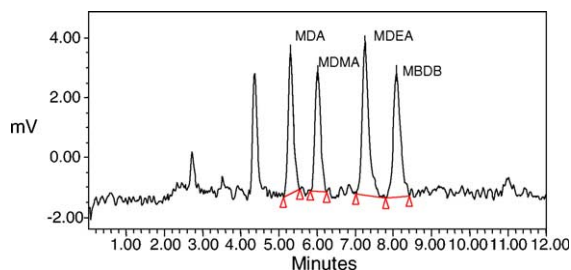


Fig. 1. Chromatogram of a blank oral fluid spiked with 2 ng/mL of MDA, MDMA, MDEA and MBDB.

2.4.6. Stability

A pool sample with MDA, MDMA, MDEA and MBDB at concentration of 10 ng/mL was prepared in water and in OF. In the case of OF a pool of blank sample was also prepared. The pools were divided in 1.5 mL aliquots in Eppendorf tubes. These tubes were stored at -18 , 4 and 20°C protected from light. One aliquot of each matrix for each storage condition was analyzed at different time intervals (weeks 1–4, 6, 8 and 10). For the quantitation, a calibration curve and quality controls at 10 ng/mL were performed for each stability sample. The samples stored in water were not extracted.

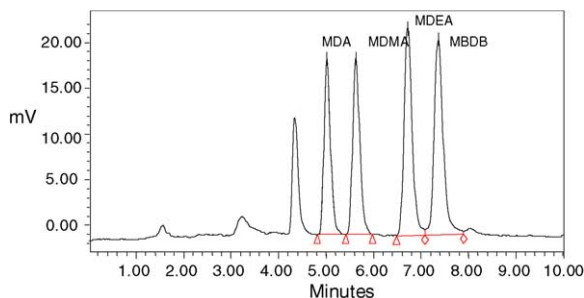


Fig. 2. Chromatogram of a blank oral fluid spiked with 10 ng/mL of MDA, MDMA, MDEA and MBDB.

Table 2

Drugs investigated as possible interferences in the determination of MDA, MDMA, MDEA and MBDB by HPLC/FD

Drugs of abuse and metabolites	Cocaine, benzoylecgonine, THC, amphetamine, methamphetamine, LSD
Opiates and relatives	Morphine, codeine, methadone, propoxyphene, pentazocine, papaverine, nalorphine
Benzodiazepines	Alprazolam, lorazepam, diazepam, nordiazepam, flunitrazepam, triazolam, oxazepam, midazolam, bromazepam, medazepam, lormetazepam
Antidepressives	Clomipramine, amitriptyline, nortriptyline, imipramine, citalopram, fluoxetine, fluvoxamine, venlafaxine
Miscellaneous	Zopiclone, haloperidol, ibuprofen, caffeine, paracetamol, acetylsalicylic acid

Statistical data analysis applied to this stability study was least squares ($y = C + \beta_1 \text{ TI} + \beta_2 \text{ TE}$; TI is the time and TE is the temperature). The statistical analyses applied were *F*-test and *t*-test. In both tests, *P* value under 0.05 showed that the effect was statistically significant. *t*-Test showed the effect of the time and of the temperature separately and *F*-test showed the effect of the time and the temperature at the same time.

3. Results and discussion

Under the described conditions the separation of MDA, MDMA, MDEA and MBDB was complete (resolution > 1.5). The run time was only 10 min in isocratic mode. In the literature, chromatographic methods using isocratic mode were found, but the run time was over 10 min [11,12], or MDA and MDMA were not completely resolved [9]. Gradient mode with run time over 20 min was also performed [10]. Other authors achieved the complete separation of the amphetamines in 10 min in isocratic mode

using different columns and mobile phases (composition, pH) than in the described method [8,14].

The ring-substituted amphetamines exhibited a good native fluorescence, with excitation and emission maxima at 285 and 320 nm, respectively. No spectral differences were found between the different compounds. The same wavelengths for excitation and emission were used as described in the literature [8,12].

The validation parameters of the method related to linearity, intra- and inter-assay precision, recovery, and LOD, for MDA, MDMA, MDEA and MBDB in oral fluid are shown in Table 1. Figs. 1 and 2 represent chromatograms of blank oral fluid spiked with 2 and 10 ng/mL of MDA, MDMA, MDEA and MBDB. As can be seen CV for inter-assay precision of MDMA, MDEA and MBDB at 250 ng/mL was over 15%, which was out of the preferred range. This may be explained by the absence of internal standard. The concentration 250 ng/mL is the upper limit of quantitation (ULOQ), the extreme higher value of the calibration range, so it is not surprising to see this kind of result in the absence of internal standard. Despite this problem, we

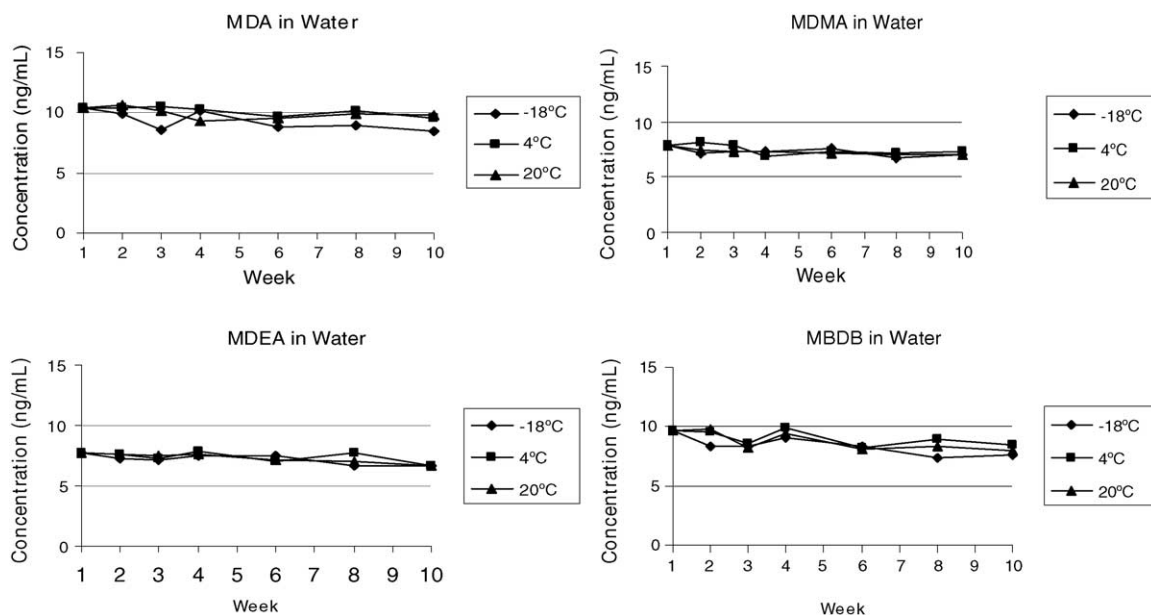


Fig. 3. Stability of MDA, MDMA, MDEA and MBDB in water (at 10 ng/mL).

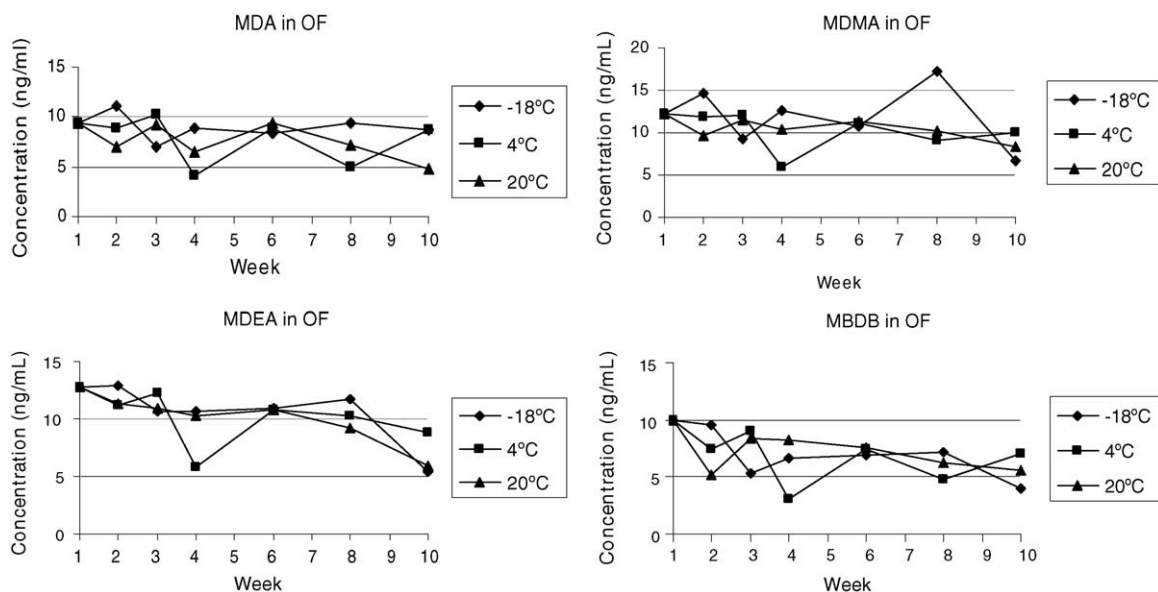


Fig. 4. Stability of MDA, MDMA, MDEA and MBDB in oral fluid (at 10 ng/mL).

decided not to use an internal standard because it was very difficult to find a compound with native fluorescence and with good chromatographic properties (retention time, resolution) under isocratic conditions.

The list of drugs evaluated as possible interferences are shown in Table 2. All these drugs were not detectable either because of the specificity of the fluorescence detector or because they were not retained in the column or not extracted. No interfering peaks with MDA, MDMA, MDEA and MBDB were identified for any screened compounds. These results are in accord with the literature [10,12].

We found that there was degradation of MDA, MDMA, MDEA and MBDB in water and in oral fluid. This loss of the amphetamine derivatives was time-dependent ($P < 0.05$) but temperature independent ($P > 0.05$) for all compounds in water and in OF, except for MDA in OF that was also temperature-dependent ($P < 0.05$). The rates of drug lost after 10 weeks in water were 12% for MDA, 10% for MDMA, 13% for MDEA and 14% for MBDB. In OF the loss was 31% for MDA, 28% for MDMA, 38% for MDEA and 37% for MBDB. These losses are related to the initial drug amount. In the case of MDA in OF, 18% of the drug was lost when the sample was stored at 20 °C in comparison with the samples stored at 4 and -18 °C. This degradation is shown in Figs. 3 and 4. No new endogenous interferences were observed in blank oral fluid stored in the described conditions.

4. Conclusion

In this work, a rapid, simple and specific method for the determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in oral

fluid using high performance liquid chromatography with fluorescence detection was developed and validated. This method, with few modifications, was used also successfully for the determination of amphetamine derivatives in other biological matrices (whole blood, plasma and urine).

The LOD (2 ng/mL) and LOQ (10 ng/mL) are lower than the recommended cut-offs in road side testing assessment (ROSITA) for these compounds (25 ng/mL). Regarding these limits, it would be expected good analytical results could also be obtained with lower OF volume (0.5 mL instead of 1 mL) but validation was not conducted.

Acknowledgment

This work was supported by a grant from the Dirección Xeral de Investigación Científica de la Xunta de Galicia (XUGA 1999). Special thanks to M. Carmen Guisan, Professor of Econometrics of the University of Santiago de Compostela, for her invaluable help and advice on statistical test and calculations.

References

- [1] Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, Informe No. 6 Observatorio Español sobre Drogas, November 2003, Ministerio del Interior, Spain. <http://www.mir.es/pnd>.
- [2] N. Samyn, G. De Boeck, A. Verstraete, The use of oral fluid and sweat wipes for the detection of drugs of abuse in drivers, *J. Forensic Sci.* 47 (2002) 1–8.
- [3] E.J. Cone, Saliva testing for drugs of abuse, *Ann. NY Sci.* 694 (1993) 91–127.

- [4] P. Kintz, Excretion of MBDB and BDB in urine, saliva, and sweat following single oral administration, *J. Anal. Toxicol.* 21 (1997) 570–575.
- [5] K. Mortier, K. Maudens, W. Lambert, K. Clauwaert, J. Van Bocxlaer, D. Deforce, C. Van Peteghem, A. De Leenheer, Simultaneous, quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 779 (2002) 321–330.
- [6] N. Samyn, G. De Boeck, M. Wood, C. Lamers, D. De Waard, K. Brookhuis, A. Verstraete, W. Riedel, Plasma, oral fluid and sweat wipe ecstasy concentrations in controlled and real life conditions, *Forensic Sci. Int.* 128 (2002) 90–97.
- [7] M. Wood, G. De Boeck, N. Samyn, M. Morris, D. Cooper, R. Maes, E. Bruijn, Development of a rapid and sensitive method for the quantitation of amphetamines in human plasma and oral fluid by LC–MS–MS, *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 78–87.
- [8] F. Sadeghipour, J.-L. Veuthey, Sensitive and selective determination of methylenedioxylated amphetamines by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection, *J. Chromatogr. A* 787 (1997) 137–143.
- [9] R. Herráez-Hernández, P. Camps-Falcó, J. Verdú-Andrés, Sensitive determination of methylenedioxylated amphetamines by liquid chromatography, *Analyst* 126 (2001) 581–586.
- [10] K. Clauwaert, J. Van Bocxlaer, E. De Letter, S. Van Calenbergh, W. Lambert, A. De Leenheer, Determination of the designer drugs 3,4-methylenedioxymethamphetamine, and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, and 3,4-methylenedioxyamphetamine with HPLC and fluorescence detection in whole blood, serum, vitreous humor, and urine, *Clin. Chem.* 46 (2000) 1968–1977.
- [11] J. da Costa, A. da Matta Chasin, Determination of MDMA, MDEA and MDA in urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* 811 (2004) 41–45.
- [12] F. Tagliaro, Z. De Battisti, A. Groppi, Y. Nakahara, D. Scarcella, R. Valentín, M. Marigo, High sensitivity simultaneous determination in hair of the major constituents of ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine) by high-performance liquid chromatography with direct fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* 723 (1999) 195–202.
- [13] A. Kaddoumi, R. Kikura-Hanajiri, K. Nakashima, High-performance liquid chromatography determination of 3,4-methylenedioxymethamphetamine, methamphetamine and their metabolites in human hair using DIB-Cl as a label, *Biomed. Chromatogr.* 18 (2004) 202–204.
- [14] R. Mancinelli, S. Gentili, M. Guiducci, T. Macchia, Simple and reliable high-performance liquid chromatography fluorimetric procedure for the determination of amphetamine-derived designer drugs, *J. Chromatogr. B* 735 (1999) 243–253.
- [15] K. Clauwaert, J. Van Bocxlaer, A. De Leenheer, Stability study of the designer drugs “MDA, MDMA and MDEA” in water, serum, whole blood, and urine under various storage temperatures, *Forensic Sci. Int.* 124 (2001) 36–42.
- [16] R. Garret, K. Seyda, P. Marroum, High performance liquid chromatographic assays of the illicit designer drugs “Ecstasy”, a modified amphetamine, with applications to stability, partitioning and plasma protein binding, *Acta Pharm. Nord.* 3 (1991) 9–14.
- [17] US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Beltsville, MD, 2001.

Short communication

Development and validation of a method for the quantitation of Δ^9 tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography electrospray–mass-spectrometry

M. Concheiro, A. de Castro, O. Quintela, A. Cruz, M. López-Rivadulla*

Forensic Toxicology Service, Institute of Legal Medicine, Faculty of Medicine, Universidad de Santiago de Compostela, S. Francisco s/n, 15786 Santiago De Compostela, Spain

Received 15 June 2004; accepted 9 August 2004

Abstract

Analysis of Δ^9 tetrahydrocannabinol (Δ^9 THC) and its metabolites in biological samples is of great relevance for forensic purposes. In the case of oral fluid (OF), the analysis should determine Δ^9 THC, whereas in urine, it detects the inactive metabolite tetrahydrocannabinol carboxylic acid (THC-COOH). Most laboratories analyze Δ^9 THC in such samples using GC–MS methods, but these procedures are time-consuming and involve unavoidable previous extraction and derivatization. No data is yet available on the application of liquid chromatography–mass-spectrometry to detect Δ^9 THC in oral fluid. We report a validation method in which the Δ^9 THC is isolated from oral fluid by a simple liquid–liquid extraction with hexane and subsequently analyzed by liquid chromatography–mass-spectrometry.

The method here reported for the determination of Δ^9 THC in oral fluid only requires 200 μ l of sample and achieves limits of detection of 2 ng/ml, and has been used to analyze oral fluid samples collected from current drug users.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Δ^9 Tetrahydrocannabinol; Oral fluid; LC–MS

1. Introduction

The oral fluid (OF) contains both saliva and other fluids and substances which are present in the oral cavity. Substances tend to be detectable in saliva for shorter periods than in urine, typically for the 12–24 h after consumption [1]. A disadvantage of studying OF is that people are sometimes unable to produce sufficient amounts of fluid for analysis. The greatest advantage of analysing OF is that samples can be collected in ways that both respect patients dignity and also assure staff that the sample comes from the patient. Staff can directly observe patients when they produce samples, usually by placing a collection tube or

device in their mouth. The possibility of contamination or substitution is minimal. The levels in saliva of substances to be detected tend to be rather lower than those of the drugs metabolites in urine, thus analysis of OF is a more sensitive process.

The usefulness of oral fluid testing for Δ^9 tetrahydrocannabinol (Δ^9 THC) is related to its use as a diagnostic indicator of recent inhalation of marijuana smoke. Δ^9 THC was identified as the major component in oral fluid with a detection time ranging from 2 to 10 h [2]. However, the detection of Δ^9 THC in oral fluid is linked to the contamination of the oral cavity during smoking [3–5]. Contrary to what Schramm et al. [6] stated, neither carboxytetrahydrocannabinol nor 11-hydroxytetrahydrocannabinol were detected in oral fluid, and only in some cases were cannabinol and cannabidiol detected with Δ^9 THC [7]. Huestis and Cone [8], reported a significant correlation between mean values of oral fluid

* Corresponding author. Tel.: +34 981 582327/563100x12205; fax: +34 981 580336.

E-mail address: apimlriv@usc.es (M. López-Rivadulla).

Table 1
Conditions of measurements of Δ^9 THC

Compound	Retention time	<i>m/z</i>	Voltage (V)
Δ^9 THC	3.1	315.4	20
		193.1	50
Δ^9 THC-d3	3.1	318.4	20

Δ^9 THC concentrations and performance measure of drug effect, although with high individual variability. According to Idowu and Caddy [9], the oral fluid/plasma concentration ratio of Δ^9 THC varies over a wide range but, until now, including recent reviews [10–13], there is not enough data to clarify this relationship. Despite this, oral fluid is an interesting biological sample for forensic interpretation purposes. Its main advantages are: it uses a non-invasive specimen, is easy and rapid to take, and requires no special equipment or facilities; also, the supervision of the collection of this sample is more acceptable for the donor than urine or blood collection.

Most laboratories analyze Δ^9 THC in blood and oral fluid by time-consuming GC–MS methods [14–18]. Hughes et al. [19] were pioneers in setting up a LC–MS–MS method for the analysis of Δ^9 THC in blood which involved comparing several ionization techniques, columns, SPE procedures and mobile phases. The main problem encountered was a low recovery rate (30%). Maralikova and Weinmann [20] reported a sensitive LC–MS–MS method for the simultaneous analysis of three forensic most relevant cannabinoids, Δ^9 THC, 11-hydroxy- Δ^9 THC and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 THC, in plasma. Recently, Valiveti and Stinchcomb [21] applied LC–MS to quantify Δ^9 THC and metabolites in plasma and obtained high levels of recovery when applying the method to pharmacokinetic studies in rats. However, no data are yet available on the application of LC–MS to detect Δ^9 THC in oral fluid.

The method here reported for the determination of Δ^9 THC in oral fluid only requires 200 μ l of sample, and achieves limits of detection of 2 ng/ml, using a simple liquid–liquid extraction procedure with hexane.

Table 2
Repeatability and reproducibility results

Compound	Concentration (ng/ml)	Recovery (%)	Repeatability (<i>n</i> = 6)			Reproducibility (<i>n</i> = 6)		
			Concentration mean (ng/ml)	C.V. (%)	Bias (%)	Concentration mean (ng/ml)	C.V. (%)	Bias (%)
Δ^9 THC	2	88.3	2.08	6.3	3.92	1.89	14.7	−5.5
	5		4.54	6.8	−9.3	4.87	4.3	−2.6
	10		10.20	10.0	2.0	11.06	8.0	10.6
	25	84.9	24.83	5.6	−0.7	24.68	6.5	−1.3
	50		50.45	9.0	0.9	51.66	6.0	3.3
	125		120.26	5.4	−3.8	115.70	6.3	−7.4
	250		247.61	5.3	−1.0	257.13	2.6	2.8

Calibration curve: slope 0.0123 ± 0.009 , intercept 0.073 ± 0.004 , coefficient of determination (R^2) 0.995 ± 0.003 .

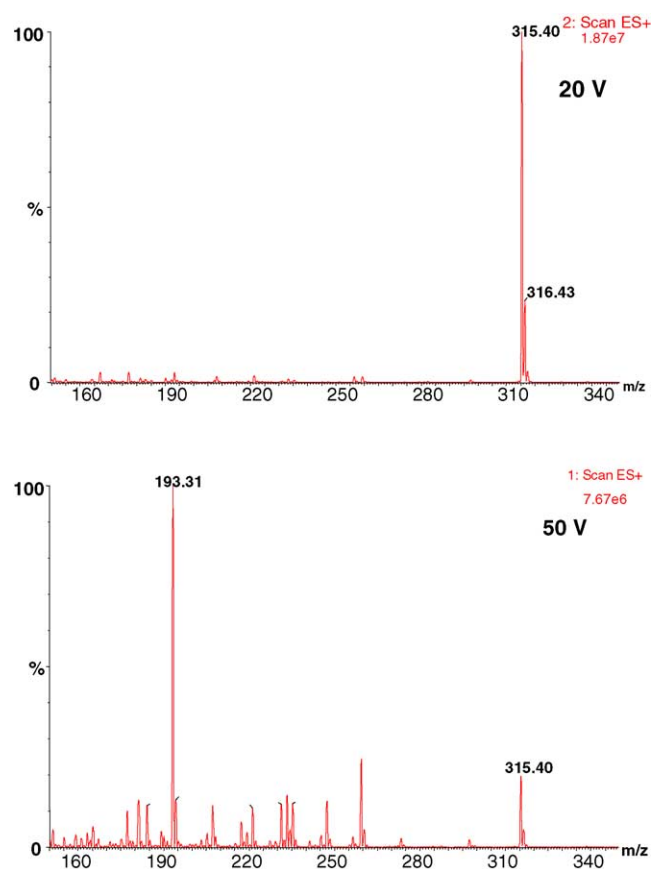


Fig. 1. Full scan mass spectrum of Δ^9 THC at different cone voltages.

2. Experimental

2.1. Chemical and reagents

Tetrahydrocannabinol (Δ^9 THC) 1 mg/ml in metanol and Δ^9 THC deuterated (d3) (Δ^9 THC-d3) 100 μ g/ml in methanol as pure standards were supplied by Radian International (Austin TX, USA). LC–MS Chromasolv[®] grade Acetonitrile (99.98% pure) was from Riedel de H  en Sigma–Aldrich Chemie (Schnelldorf, Germany). Hexane, formic acid (98–100%), potassium dihydrogen phosphate and di-sodium hydrogen phosphate were from Merck (Barcelona, Spain).

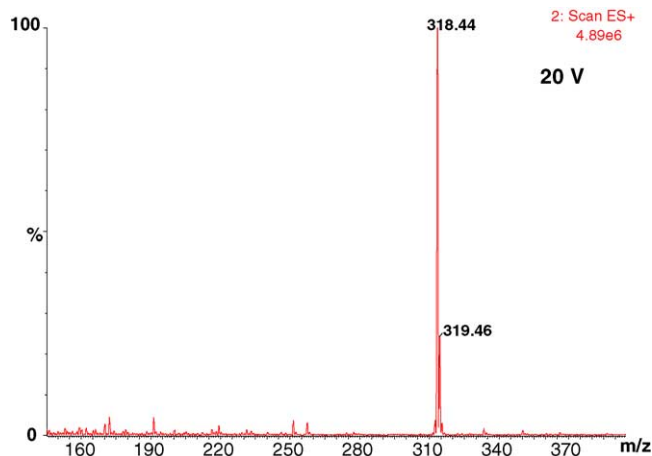


Fig. 2. Full scan mass spectrum of Δ^9 THC-d3 at 20 V.

2.2. Preparation of standards and sample extraction

Calibration standards of Δ^9 THC were prepared in drug-free oral fluid by spiking with concentrated standards in order to obtain a concentration range between 2 and 250 ng/ml. 25 μ l of internal standard Δ^9 THC-d3 (1 μ g/ml) was added for all concentrations.

The procedure was carried out with 200 μ l of oral sample mixed with 1 ml of phosphate buffer pH 6 Soërensen buffer (1/15 M), prepared by dissolving 9.07 g of potassium dihydrogen phosphate into 1 l of deionised water, and 11.6 g of disodium hydrogen phosphate anhydrous into 1 l of deionised water (the Na_2HPO_4 solution was used to adjust the KH_2PO_4 solution to pH 6) and 5 ml of hexane in a 25 ml borosilicate glass tube. After mechanical shaking (30 min) and centrifugating (10 min at $2792.5 \times g$), the organic phase was transferred to a borosilicate tube and evaporated under N_2 at 45 °C. The dry extract was reconstituted in 40 μ l of mobile phase. The samples were transferred into autosampler vials, and 15 μ l was injected onto the LC–MS.

2.3. Chromatographic conditions

The final optimized LC separation was performed using a Waters Alliance 2795 separation module system. Chromatography was carried out at ambient temperature, using a XTerra[®] MS C18 column (2.1 mm $\times$ 100 mm, 3.5 μ m), eluted isocratically using 0.1% formic acid/acetonitrile 15:85, (v/v), delivered at a flow rate of 0.25 ml/min.

Various tests were carried out with different formic acid and acetonitrile ratios. For our purposes the ratio 0.1% formic acid/acetonitrile 15:85 (v/v), was ideal for rapid analysis following previous elution of coextracted endogenous substances, and the high content in acetonitrile improved the ionization of the analyte. The best separation results were obtained using a XTerra[®] MS column as contrasted with others (Symmetry[™] and SymmetryShield[™]). Data acquisition was controlled using MassLynx NT 3.5 software.

MS procedure was performed using a Micromass ZMD 2000 detector fitted with a Z-spray ion interface. Ionization was achieved using electrospray in the positive ionization mode (ESI+). The following conditions were found to be optimal for the analysis of Δ^9 THC: capillary voltage, 3.5 kV, source block temperature, 115 °C and desolvation gas (nitrogen) heated to 300 °C and delivered at 500 l/h. Table 1 summarizes the conditions for the measurement of Δ^9 THC and its deuterated analogue.

The specificity (the ability of analytical method to differentiate and quantify the analyte in the presence of other

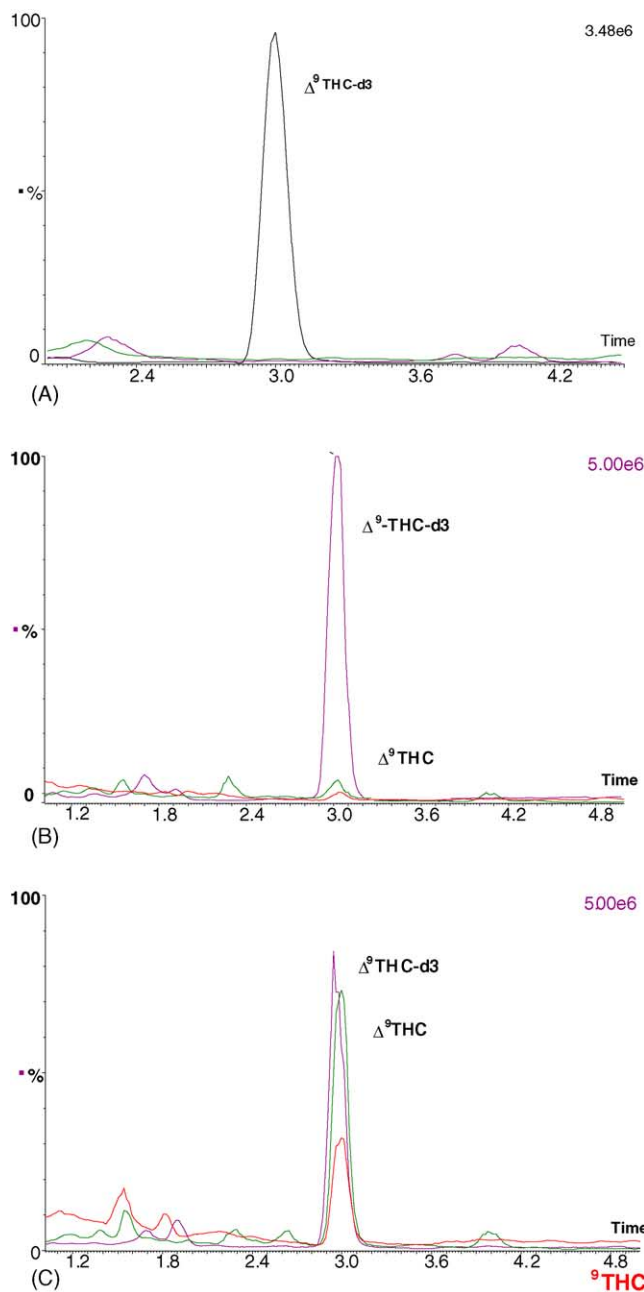


Fig. 3. (A) Blank Oral fluid with internal standard Δ^9 THC-d3; (B) Oral fluid drug-free spiked with 5 ng/ml of Δ^9 THC; (C) Oral fluid drug-free spiked with 125 ng/ml of Δ^9 THC.

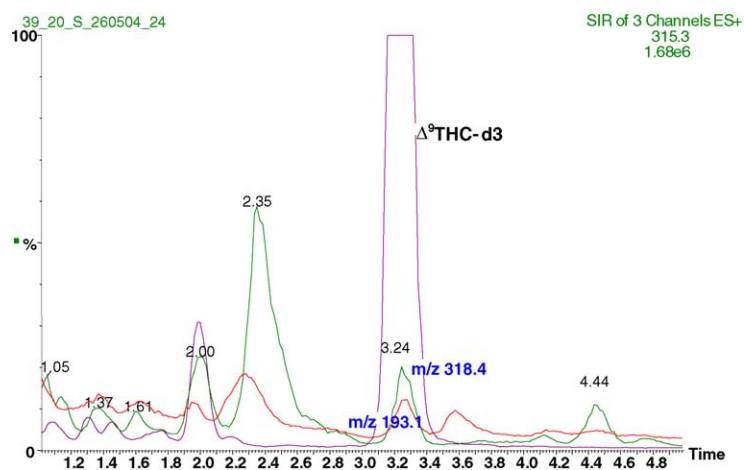


Fig. 4. Chromatogram corresponding to real sample (case 9: 6.79 ng/ml).

components) was achieved by applying the extraction procedure to six different sources (oral fluid collected from the saliva of six non-drug consuming subjects), according Shah et al. [22]. The blank oral fluid extract with the internal standard processed with this procedure showed a typical ion chromatogram (Fig. 3A). Dams et al. [23] achieved selectivity by a unique combination of retention time, precursor and fragment ion (SRM mode in triple quadrupole). In our case, selectivity was obtained by a combination of retention time and SIR mode. Two m/z ratios for Δ^9 THC were monitored in SIR mode, one corresponding to pseudomolecular ion (315.4), and the other to the appropriate fragment of the analyte (193.1). This latter fragment was obtained through collision in the cone with the residual solvent and gas molecules, by a procedure described by Marquet [24] as “collision induced dissociation” (CID), and can be used as confirmation ion for quantitation purposes.

3. Results and discussion

3.1. Validation of the analytical method

The repeatability (within-day precision) and reproducibility (between-day precision), determined by analyzing six quality control samples at seven concentration levels (in the same day and on six separate days, respectively), are shown in Table 2. Results indicated that the accuracy of the assay was >90% and CV did not exceed 15%. According to Causon [25], all parameters obtained fall within the optimal precision and accuracy criteria.

For recovery studies, six replicates of two intermediate concentrations (10 and 125 ng/ml) with internal standard (Δ^9 THC-d3) were extracted by applying the previously described extraction procedure. Six blank saliva samples with internal standard (Δ^9 THC-d3), were then extracted in the same way and the final dried extracts were spiked with the appropriate amounts of Δ^9 THC in mobile phase. Absolute

recoveries for Δ^9 THC in oral fluid were carried out by comparing the analyte peak areas of the fortified samples with those of the blank samples spiked, after extraction, with the same amount of the analyte.

The limit of quantitation (LOQ), defined as the lowest concentration of analyte that could be measured reproducibly and accurately (CV <20% and bias $\pm$ 20%), was 2 ng/ml. It should be noted that the observed LOQ for this technique was achieved by using 200 μ l of oral fluid, whereas normally 500–1000 μ l of specimen is used for GC–MS.

Linearity was obtained with an average correlation coefficient (R_2 , weighting factor $1/x$) >0.99 over a range from the LOQ value up 250 ng/ml

The ESI mass spectra of Δ^9 THC and its deuterated analogue are shown in Figs. 1 and 2. In order to obtain a best yield for the molecular ions (315.4 for Δ^9 THC and 318.4 for Δ^9 THC-d3, respectively), 20 V was the optimal cone voltage, while 50 V was chosen for the qualifying ion (193.1).

Drug-free oral fluid spiked at 5 and 125 ng/ml with the analyte and the internal standard, and extracted according the proposal method showed typical ion chromatograms seen in Fig. 3B and C.

Table 3
Results obtained applying the method to 14 oral fluid samples

Sample	Elapsed time (h)	Δ^9 THC (ng/ml)
1	<1	>250
2	5	78.78
3	1–2	>250
4	1	>250
5	3	240.64
6	Unknown	22.58
7	>10	27.80
8	8	34.84
9	>10	6.79
10	>10	22.82
11	>10	2.42
12	>10	22.17
13	4–5	117.04
14	1–2	>250

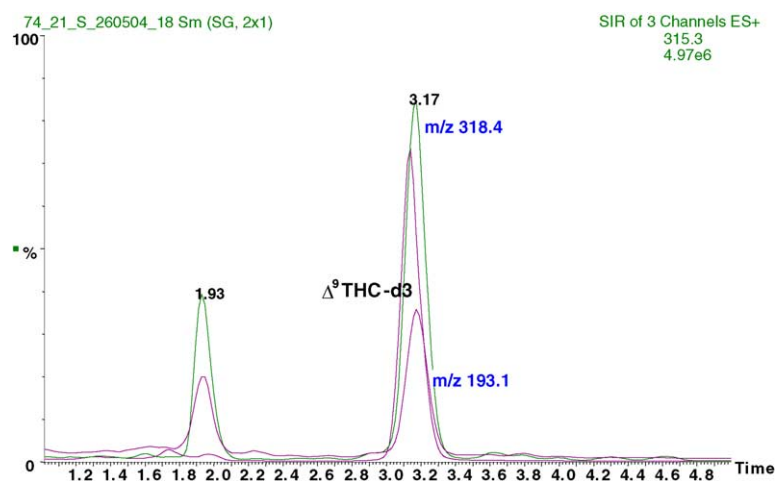


Fig. 5. Chromatogram corresponding to real sample (case 5: 240.64 ng/ml).

Matrix effects were evaluated by postcolumn infusion of Δ^9 THC into the MS detector and autosampler injection of extracted blank onto the analytical column, according experimental setup developed by King et al. [26]. The experiment was performed by triplicate to ensure its validity. We detected no suppressive effect.

Oral fluid samples from drivers who had admitted taking cannabis when they tested positive to roadside controls were provided without stimulation by spitting into a polypropylene tube to obtain 1–2 ml. The samples were frozen at -20°C with dry ice until analysis in the laboratory. Stability of the samples were no tested.

Some drivers were asked to give the lapsed time from the last cannabis intake. Table 3 shows the results obtained by applying the proposed method, and Figs. 4 and 5 show typical chromatograms of cases 9 and 5.

4. Conclusion

The use of oral fluid as a non-invasive specimen alternative to blood as an indicator of recent drug use is particularly indicated in countries where the legislation restricts blood collection. Further studies to evaluate the usefulness of such specimens should involve pharmacological research to determine the expected concentrations, because at the moment the results are still controversial.

In summary, we have developed a simple and rapid method for THC quantitation in oral fluid by using LC–MS. The procedure is sensitive and specific and involves a very simple liquid–liquid extraction method. It has been validated and applied to fourteen real samples.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Dirección Xeral de Investigación Científica de la Xunta de Galicia (XUGA

2001) to research groups of excellence, and by EU under ROSITA project.

References

- [1] E.J. Cone, Ann. N.Y. Acad. Sci. 694 (1993) 91.
- [2] M.A. Huestis, S. Dickerson, E.J. Cone, AAFS 92 (1992) 190.
- [3] L.K. Thompson, E.J. Cone, J. Chromatogr. 421 (1987) 91.
- [4] C. Maseda, K. Hama, Y. Fukui, K. Matsubara, S. Takahashi, A. Akane, Forensic Sci. Int. 32 (1986) 259.
- [5] W.W. Just, N. Filipovic, G. Werner, J. Chromatogr. 96 (1974) 189.
- [6] W. Schramm, R. Smith, P.A. Craig, D.A. Kidwell, J. Anal. Toxicol. 16 (1992) 1.
- [7] N. Fucci, N. De Giovanni, M. Chiarotti, S. Scarlata, Forensic Sci. Int. 119 (2001) 318.
- [8] M.A. Huestis, E.J. Cone, in: S. Karch (Ed.), Drug Abuse Handbook, CRC Press, Boca Raton, FL, 1998, p. 799, Chapter 11.
- [9] O.R. Idowu, B. Caddy, J. Forensic Sci. Soc. 22 (1982) 123.
- [10] V. Spiehler, D. Baldwin, C. Hand, in: A.J. Jenkins, B.A. Goldberger (Eds.), On-Site Drug Testing, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2002, p. 95, Chapter 8.
- [11] A. Jehanli, S. Brannan, L. Moore, V. Spiehler, J. Forensic Sci. 46 (2000) 1214.
- [12] N. Samyn, A. Verstraete, C. Van Haeren, P. Kintz, Forensic Sci. Int. Rev. 11 (1999) 1.
- [13] D.A. Kidwell, J.C. Holland, S. Athanaselis, J. Chromatogr. B 713 (1998) 111.
- [14] M. Yonamine, N. Tawil, R.L.M. Moreau, O. Alves Silva, J. Chromatogr. B 789 (2003) 73.
- [15] E.J. Cone, L. Presley, M. Lehrer, W. Seiter, M. Smith, K.W. Kardos, D. Fritch, S. Salamone, R.S. Niedbala, J. Anal. Toxicol. 26 (2002) 541.
- [16] R.S. Niedbala, K.W. Kardos, D.F. Fritch, S. Kardos, T. Fries, J. Waga, J. Robb, E.J. Cone, J. Anal. Toxicol. 25 (2001) 289.
- [17] N. Samyn, A.C. Van Haeren, Int. J. Legal Med. 113 (2000) 150.
- [18] P. Kintz, V. Cirimele, B. Ludes, J. Anal. Toxicol. 24 (2000) 557.
- [19] J.M. Hughes, D.M. Andrenyak, D.N. Crouch, M. Slawson, Poster at the 2002 SOFT Meeting Portland, J. Anal. Toxicol. 27 (2003) 191.
- [20] B. Maralikova, W. Weinmann, J. Mass Spectrom. 39 (2004) 526.

- [21] S. Valiveti, A.L. Stinchcomb, *J. Chromatogr. B* 803 (2004) 243.
- [22] V.P. Shah, K.K. Mida, J.W.A. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonnelli, C.T. Viswanathan, A. Jacobi, *Pharm. Res.* 17 (2000) 1551.
- [23] R. Dams, C.M. Murphy, R.E. Choo, W.E. Lambert, A.P. De Leenher, M.A. Huestis, *Anal. Chem.* 75 (2003) 798.
- [24] P. Marquet, *Ther. Drug Monit.* 24 (2002) 255.
- [25] R. Causon, *J. Chromatogr. B* 689 (1997) 175.
- [26] R. King, R. Bonfiglio, C. Fernández-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000) 942.

Liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry for the determination of nine selected benzodiazepines in human plasma and oral fluid

O. Quintela, A. Cruz, A. de Castro, M. Concheiro, M. López-Rivadulla*

*Forensic Toxicology Service, Institute of Legal Medicine, University of Santiago de Compostela,
C/San Francisco s/n, Santiago de Compostela, Spain*

Received 16 October 2004; accepted 22 December 2004
Available online 10 February 2005

Abstract

A new simple and rapid liquid chromatographic–mass spectrometric technique was designed for the determination of nine benzodiazepines in plasma and oral fluid. Benzodiazepines were extracted from alkalised spiked and clinical plasma and oral fluid samples using a single step, liquid–liquid extraction procedure with diethyl ether. The chromatographic separation was performed with a Xterra® RP₁₈, 5 µm (150 × 2.1 mm i.d.) reversed-phase column using deuterated analogues of the analytes as internal standard. The recovery ranged from 70.3 to 86.9% for plasma and 63.9 to 77.2% for oral fluid. The limits of detection ranged from 0.5 to 1 ng/ml in plasma and 0.1 to 0.2 ng/ml for oral fluid. The method was validated for all the compounds, including linearity and the main precision parameters. The procedure, showed to be sensitive and specific, was applied to real plasma and oral fluid samples. The method is especially useful to analyse saliva samples from drivers undergoing roadside drug controls.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Liquid chromatography; Benzodiazepines; Plasma; Oral fluid; Saliva; Liquid-chromatography-mass spectrometry

1. Introduction

Benzodiazepines (BZP) are a large class of psychoactive drugs, very commonly prescribed all over the world, mostly as minor tranquillizers, hypnotics and muscle relaxants [1–4]. Their clinical applications have been associated to their wide safety margin and minimal adverse side effects. From a toxicological point of view, these drugs are associated to different cases of misuse: they are often abused by illicit drug users to relieve withdrawal symptoms and, recently, the use of such substances to commit sexual abuse had spread [5]. Furthermore, they are the most documented group with regard to the influence on driving behaviour [6]. So, they are usually present in clinical and forensic toxicological cases [7–9].

A large number of analytical methods have been published so far for the determination of Benzodiazepines. Numerous gas chromatography (GC) procedures have been reported for the analysis of BZP [10–13], including NPD and ECD detectors. Generally, capillary GC coupled to mass spectrometry (MS) is the method of choice for most of the toxicological analysis. Electronic impact GC–MS provides a selective analytical procedure for the analysis of BZP in biological samples [14–17] although several authors have demonstrated that the negative-ion chemical ionisation (NCI) is a more sensitive technique [18–21]. However, this method is generally tedious to apply because BZP are very polar and thermally unstable, so they cannot be evaporated and chromatographed without decomposition, unless previous derivatisation [22]. Gas chromatography–mass spectrometry determinations have been reviewed by Maurer [23]. In recent years, the coupling of liquid chromatography (LC) to MS

* Corresponding author.

has provided a useful procedure for the analysis of organic compounds and an alternative to GC–MS in order to avoid the excessive manipulation of polar and unstable compounds. The use of HPLC–MS for clinical and forensic purposes have been reviewed by Maurer [24], Hoja [25], Marquet [26] and Van Boxclaer [27].

The excellent review done by Drummer [28] about extraction procedures and methods for the measurement of BZP in biological samples is outstanding. Finally, some references related to the determination of BZP in biological samples by HPLC–DAD [29–32] and capillary electrophoresis [33–35] must be included in order to complete a full revision of the analytical methodology.

The biological samples most commonly used for the analysis of BZP are plasma/blood and urine. The use of an alternative specimen such as saliva has been proposed [36] in the roadside places. In this context the use of saliva for the BZP detection can become a very useful tool.

For this reason we have developed a simple HPLC–MS procedure for the determination of nine BZP in human plasma and oral fluid, in order to detect small quantities. In addition, a preliminary pharmacokinetic study for two of them (midazolam and lorazepam) was carried out in order to obtain the possible correlation between plasma and oral fluid levels.

2. Material and methods

2.1. Reagents

Midazolam, bromazepam, tetrazepam, alprazolam, lorazepam, triazolam, flunitrazepam, diazepam and lormetazepam, from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Internal standards (IS): Alprazolam- d_5 , lorazepam- d_4 and diazepam- d_5 , from Cerilliant (Barcelona, Spain). Formic acid (99% pure) was obtained from Merck (Barcelona, Spain). Chromasolv[®] grade Acetonitrile (99.98% pure) was from Riedel de Hën Sigma–Aldrich Chemie (Schnellendorf, Germany). Purified water was obtained in the laboratory using a Milli-Q water system (Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland). A 0.1 M ammonium carbonate pH 9.30 buffer was prepared by adding a 1 M ammonium hydroxide solution to 900 ml of ammonium carbonate solution (9.6 g/l) to pH 9.3 (determined using a pH meter) and making up the solution to 1000 ml with ammonium carbonate (to oral fluid samples).

A pH 9.0 borate buffer was prepared by mixing 6.2 g of H_3BO_3 and 7.5 g of KCl with 420 ml of a solution of 0.1 M sodium hydroxide, and adding water until 1000 ml (to plasma samples).

Fresh and drug-free human plasma and oral fluid (OF). Liquid–liquid extraction: Diethylether Multisolvant, from Scharlau (Sentmenat, Spain).

Salivette[®] device for collecting OF, with and without citric acid stimulation (Sarstedt Nümbrecht, Germany).

2.2. Preparation of stock solutions and standards

Stock solutions of each BZP and respective IS were prepared at 1 g/l in methanol or acetonitrile and were kept at $-20^{\circ}C$ in the dark for a maximum of 6 months. Each day, working solutions of each, containing 0.02, 0.1, 0.5 and 2.5 mg/l, for plasma and 0.002, 0.005, 0.01, 0.1 and 0.25 mg/l for saliva, were prepared by appropriate dilution with Milli-Q water. The working solutions of respective internal standards at 1 mg/l (for plasma) and 0.4 mg/l (for saliva) were prepared by appropriate dilution with methanol.

2.3. Sample preparation

To 0.5 ml of plasma were added 50 μ l of a 1 mg/l IS solution, 0.5 ml of the pH 9.0 borate buffer and 8 ml of the extraction solvent (diethyl ether), in a 10-ml borosilicate tube. The tubes were shaken for 15 min then centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The organic phase (7.2–7.8 ml) was transferred to a 10-ml borosilicate tube and evaporated to dryness at $45^{\circ}C$ under a gentle stream of nitrogen. The dry extract was re-dissolved in 100 μ l of a mixture of formic acid 0.1%–acetonitrile (90:10, v/v). The samples were transferred into autosampler vials, and 15 μ l was injected into the LC–MS.

In the case of saliva samples, the process was slightly different. To 0.5 ml of saliva were added 50 μ l of a 0.4 mg/l IS solution, 0.5 ml of the 0.1 M ammoniac carbonate buffer, pH 9.30, and 6 ml of the extraction solvent (diethyl ether), in a 10-ml borosilicate tube. The tubes were shaken for 15 min then centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The organic phase (5.2–5.8 ml) was transferred to a 10-ml borosilicate tube and evaporated to dryness at $45^{\circ}C$ under a gentle stream of nitrogen. The dry extract was re-dissolved in 50 μ l of a mixture of formic acid 0.1%–acetonitrile (93:7, v/v), of which 15 μ l was injected into the chromatographic system.

Two sets of calibrating standards, one for plasma at 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 125 and 250 ng/ml, and one for saliva at 0.2, 0.5, 1, 2, 10 and 25 ng/ml of the mixture of BZP, were prepared with each series, by spiking blank plasma and saliva samples with the appropriate working solutions.

2.4. Liquid chromatography–mass spectrometry

The HPLC system was a Waters Alliance 2795 (Waters, Watford, UK) separation Module. Chromatographic separation was performed with a Xterra[®] RP₁₈, 5 μ m (150 $\times$ 2.1 mm i.d.) reversed-phase column (Waters, Milford, USA). The mobile phase, delivered at a flow-rate of 0.25 ml/min at room temperature, was a gradient of acetonitrile in 0.1% formic acid programmed as follows: for plasma, 10% acetonitrile during 1.5 min, increased to 72% in 14 min and decreased to 10%, i.e., original conditions, in 1 min; and for saliva, 7% acetonitrile during 2 min, increased to 72%

in 12.5 min and decreased to 7%, i.e., original conditions, in 0.5 min.

The detection was performed using a Micromass ZMD 2000 mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) fitted with a Z-spray ion interface. Ionisation was achieved using electrospray in the positive ionisation mode (ESI+). Nitrogen was used as nebulisation and desolvation gas. For optimising ionisation and ion transmission conditions of each BZP and the IS, 15 µl of a 10 µg/ml solution of each compound in the mobile phase were injected without HPLC separation into the ion source. In order to obtain the highest possible intensity for quantitation and confirmation ions, fragmentation energy (cone voltage) was optimised. During this experiment, a mass range from m/z 100 to 400 was monitored. Acquisition was made in the selected ion-monitoring mode of positive ions, with a dwell time of 0.15 s. For the quantitation of each BZP the protonated molecule $[M + H]^+$ was selected as the quantifying ion and one main fragment was selected as the confirmation ion. Table 1 summarizes the conditions for the measurement of each BZP and the deuterated IS. The other main parameters settings were: drying gas temperature 300 °C, source heater temperature 115 °C, nebulisation gas flow 550 l/h, cone gas flow 100 l/h and capillary voltage 3000 V.

Data acquisition, peak integration and calculation were interfaced to a computer workstation running Mass Lynx NT 3.5 and QuanLynx 3.5 software.

Table 1
Retention times, selected ions and cone voltages of the nine selected benzodiazepines

Compound	Retention time (min)		Selected m/z ratios ^a	Cone voltage (V)
	PI	OF		
Alprazolam	11.6	12.6	309.1	40
			281.2	60
Bromazepam	9.8	10.8	318.0	30
			290.0	50
Diazepam	13.4	14.1	285.3	20
			257.2	60
Flunitrazepam	12.9	13.8	314.2	30
			268.2	60
Lorazepam	12.2	13.2	321.0	30
			303.1	40
Lormetazepam	13.2	14.2	335.0	30
			289.0	60
Midazolam	9.27	10.1	326.1	30
			291.3	60
Tetrazepam	11.1	12.2	289.2	40
			261.3	55
Triazolam	12.0	12.9	343.1	45
			308.1	55
Alprazolam-d ₅	11.6	12.5	314.2	40
Diazepam-d ₅	13.3	14.2	290.3	40
Lorazepam-d ₄	12.2	13.2	325.1	25

^a Quantifying ions are in bold characters.

2.5. Validation

The analytical validation was performed according the recommendations of Shah [37] and Peters [38].

Recoveries were determined in quintuplicate at two concentrations (low and high) of each BZP in plasma and saliva. For each concentration, five blank samples were fortified with the IS and the appropriate amount of each BZP, while five others only with the IS. They were extracted as previously described. The dry extracts of the fortified samples were re-dissolved in 50 µl of the reconstitution solvent, while the extracts of the blank samples were re-dissolved with 50 µl of the reconstitution solvent containing the respective nominal amounts of BZP. The latter were used as neat standards.

In addition, the recovery from the cotton-roll of Salivette[®] was calculated in a similar way at 1 and 25 ng/ml of each BZP in saliva. For each concentration, 10 blank saliva samples were fortified with the respective BZP and IS. Five samples of each concentration were absorbed with Salivette[®] devices, centrifuged and then extracted as previously described. The other five, directly extracted, were used as neat standards.

Within-day precision and accuracy were determined at three concentrations, the lower limit of quantitation (LLOQ), the upper limit of quantitation (ULOQ) and an intermediate level, by preparing and analysing on the same day six replicates for each level. Between-day precision and accuracy, as well as linearity and the lower limit of quantitation (LLOQ) were assessed by analysing each day for 6 days a set of plasma samples spiked at 1, 2, 5, 10, 20, 50, 125 and 250 ng/ml and saliva samples at 0.2, 0.5, 1, 2, 10 and 25 ng/ml, respectively. Precision, expressed as the coefficient of variation (CV) of the measured values, was expected to be less than 15% at all concentrations, except for the LLOQ, for which 20% was acceptable. In the same way, accuracy was evaluated using the mean relative error (MRE), which had to be less than 15% of theoretical values at each concentration level except for the LLOQ, for which 20% was acceptable [37,38]. Therefore, LLOQ was defined as the lowest concentration yielding between-day precision CV and MRE of less than 20% each.

The validation of a partial or increased sample volume was done by diluting 1/5 additional quality controls (QC) with a concentration five times above the ULOQ in plasma and saliva (1250 and 250 ng/ml, respectively). Five replicates of each control sample were analysed together with a calibration curve after appropriate dilution of the samples, with blank plasma or saliva, to the validated concentration range. The calculated concentrations of diluted QCs, when multiplied by their respective dilution factors must fall within the defined precision and accuracy criteria for that QC [39].

The specificity of the method was evaluated by analysing plasma and saliva samples from 10 healthy non-drug-consuming subjects.

The matrix effect on the ESI response was evaluated by using a post-column infusion system [40–42]. Mobile phase was delivered into the electrospray interface at a rate of

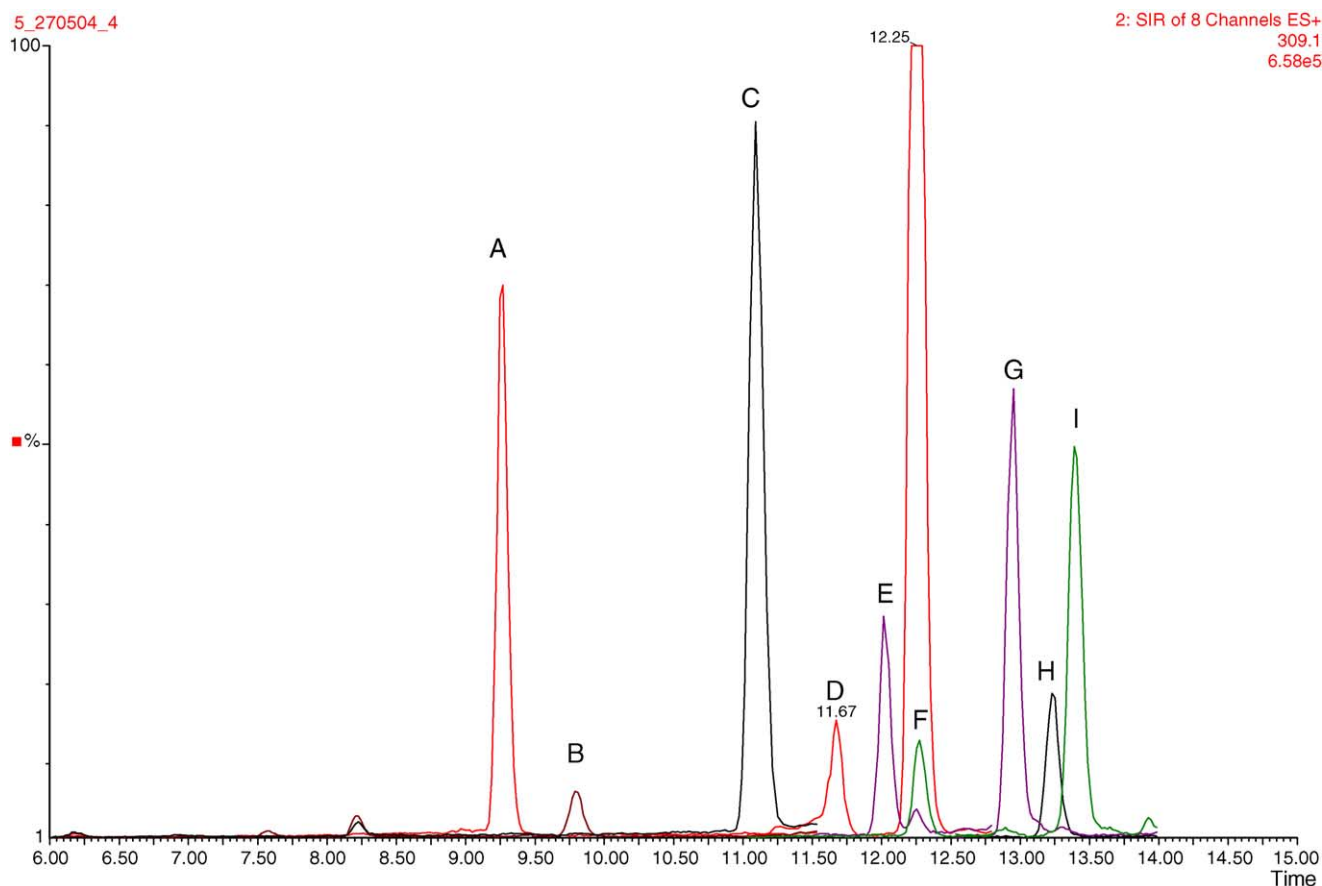


Fig. 1. LC-ES-MS ion chromatograms of a plasma sample spiked at 5 ng/ml of nine benzodiazepines.

250 μ l/min while analyte was being infused, post-column, through a Valco zero dead volume tee using a Harvard Apparatus Model 11 (South Natick, MA, USA) syringe pump. Five plasma and saliva samples without BZP nor IS were extracted as previously described, reconstituted with mobile phase, and 15 μ l of each plasma extract were injected onto the XTerra column. Effluent from the HPLC column combined with the infused analytes and entered the electrospray interface.

Midazolam was administered parenterally in a single 2 mg-dose to patients undergoing minor surgery. Patients were conscious during the OF sampling in all cases. Lormetazepam was administered orally at a 1 mg dose to healthy volunteers.

3. Results and discussion

Deuterated analogues are commonly used as internal standards as they are essentially identical in chemical and chromatographic properties to the respective unlabelled compounds whilst being readily distinguishable by mass spectrometry because of their mass difference. In our case alprazolam- d_5 , lorazepam- d_4 and diazepam- d_5 were chosen for this purpose.

The ion chromatograms of the nine BZP are presented in Fig. 1. The retention time and the selected ions are reported in Table 1. Likewise, their respective optimised fragmentation voltages are shown in the same table as responsible to obtain the highest intensity of the base product ions. CID conditions were adjusted in order to obtain the optimum intensity for one product ion for each analyte.

No endogenous plasma and saliva components were observed at the retention times of the nine analytes nor internal standards.

The within-day precision, as well as the between-day precision and accuracy were satisfactory under all the tested concentrations (Tables 2 and 3). The linearity of the compound-to-IS peak area ratio versus the theoretical concentration was verified in plasma and saliva by using a $1/x$ weighted linear regression. The correlation coefficients were typically better than 0.99 and the curvature was tested on a set of six calibration curves (Table 4). The limits of detection (LOD), defined as the lowest tested concentration yielding a signal-to-noise ratio higher than 3, and the recoveries, calculated as described in the validation section, are shown in the same table. The LLOQs and the ULOQs, also can be seen on Table 4, and correspond to the lowest and the highest concentration level of the calibration range, respectively, for each analyte.

Table 2
Within-day precision and accuracy for the determination of nine benzodiazepines in plasma (Pl) and oral fluid (OF) samples

Compound		Precision (R.S.D., %)			Mean relative error ^a (%)		
		Low level	Medium level	High level	Low level ^b	Medium level ^c	High level ^d
Alprazolam	Pl	7.7	4.2	2.7	4.0	4.7	4.8
	OF	6.9	2.1	3.3	7.7	1.3	2.4
Bromazepam	Pl	11.7	13.0	7.2	1.2	6.8	1.8
	OF	11.3	10.8	9.8	9.3	1.6	2.1
Diazepam	Pl	9.5	2.0	3.7	6.0	1.5	0.8
	OF	8.5	2.4	0.9	0.8	4.9	4.6
Flunitrazepam	Pl	6.3	2.9	6.9	3.5	3.0	0.7
	OF	5.5	6.5	1.1	0.1	3.0	1.8
Lorazepam	Pl	8.9	3.5	3.6	5.0	6.6	3.3
	OF	8.4	3.8	2.3	1.1	1.4	4.0
Lormetazepam	Pl	7.7	8.6	1.2	1.5	8.5	3.6
	OF	9.2	7.4	2.2	0.8	5.2	0.7
Midazolam	Pl	2.3	3.4	8.9	0.8	8.2	5.8
	OF	13.4	3.8	5.2	3.3	5.7	6.6
Tetrazepam	Pl	5.3	6.7	7.9	4.3	7.3	6.8
	OF	6.4	3.9	2.3	7.5	5.2	0.9
Triazolam	Pl	5.6	8.2	6.7	0.2	1.7	4.7
	OF	9.7	8.1	2.8	5.8	5.7	2.7

^a Mean relative error = $|\text{Mean measured value} - \text{theoretical value}| \times 100 / \text{theoretical value}$.

^b Low level, the LLOQ of each compound.

^c Medium level, 50 ng/ml in plasma and 2 ng/ml in OF samples.

^d High level, the ULOQ of each compound.

Table 3
Between-day precision and accuracy for the determination of 9 benzodiazepines in plasma (Pl) and oral fluid samples (OF)

Compound		Precision (R.S.D., %)			Mean relative error ^a (%)		
		Low level ^b	Medium level ^c	High level ^d	Low level ^b	Medium level ^c	High level ^d
Alprazolam	Pl	5.7	4.2	2.1	13.3	3.4	0.6
	OF	5.1	3.9	1.7	1.1	1.2	0.4
Bromazepam	Pl	8.3	9.9	2.6	1.2	1.1	2.4
	OF	12	4.7	2.5	7.7	5.9	0.1
Diazepam	Pl	12.6	4.6	1.3	2.6	1.8	1.9
	OF	9.1	2.2	0.9	10.0	6.4	2.5
Flunitrazepam	Pl	14.7	4.1	2.0	1.4	4.4	3.5
	OF	8.2	8.4	1.4	7.9	0.4	1.2
Lorazepam	Pl	13.8	4.6	1.3	5.4	2.3	2.3
	OF	6.6	4.3	1.3	8.6	5.2	2.1
Lormetazepam	Pl	12.8	2.4	3.4	1.3	3.0	1.1
	OF	8.1	7.0	1.8	5.0	4.0	0.9
Midazolam	Pl	13.7	3.3	2.8	5.0	6.9	4.0
	OF	12.5	5.4	2.9	3.3	3.2	0.1
Tetrazepam	Pl	14.8	5.8	2.0	5.8	8.3	3.8
	OF	6.2	3.5	1.4	14.3	6.4	2.8
Triazolam	Pl	11.7	4.5	1.0	1.6	3.2	4.5
	OF	13.3	4.6	2.5	6.4	4.2	0.7

^aMean relative error = $|\text{Mean measured value} - \text{theoretical value}| \times 100 / \text{theoretical value}$. ^bLow level, corresponding with the LLOQ of each compound.

^cMedium level, corresponding with 50 ng/ml in plasma and 2 ng/ml in OF samples. ^dHigh level, corresponding with the ULOQ of each compound.

Table 4
Calibration data, limits of detection, and recoveries for the examined compounds

Compound	Biological sample	Calibration range (ng/ml)	Linearity ($n = 6$)	R^2	S.D. (on slope)	LOD ^a (ng/ml)	Recovery (%) ($n = 5$)	
							Low ^b	High ^c
Alprazolam	Pl	1–400	$y = 0.004x + 0.0015$	0.999	0.0002	0.5	77.5	76.7
	OF	0.5–50	$y = 0.0212x + 0.0039$	0.999	0.0041	0.2	70.6	67.6
Bromazepam	Pl	5–250	$y = 0.003x + 0.0024$	0.996	0.0008	1	85.9	84.0
	OF	0.5–25	$y = 0.0066x + 0.0014$	0.998	0.0022	0.2	70.3	70.5
Diazepam	Pl	1–250	$y = 0.0053x + 0.0026$	0.999	0.0003	0.5	81.6	89.0
	OF	0.2–50	$y = 0.0161x + 0.0028$	0.999	0.0012	0.1	77.2	67.2
Flunitrazepam	Pl	1–400	$y = 0.0061x + 0.0011$	0.998	0.0003	0.5	82.3	91.0
	OF	0.2–50	$y = 0.0202x + 0.001$	0.999	0.0069	0.1	76.1	72.1
Lorazepam	Pl	1–250	$y = 0.0032x + 0.0018$	0.999	0.0001	0.5	71.9	78.0
	OF	0.5–25	$y = 0.0295x + 0.0036$	0.998	0.0029	0.2	72.7	72.3
Lormetazepam	Pl	1–400	$y = 0.0018x + 0.0006$	0.998	0.0001	0.5	77.7	82.4
	OF	0.2–50	$y = 0.006x + 0.0007$	0.999	0.0011	0.1	70.5	71.0
Midazolam	Pl	1–250	$y = 0.005x + 0.0017$	0.996	0.0013	0.5	70.3	71.6
	OF	0.2–25	$y = 0.0143x + 0.0021$	0.998	0.0029	0.1	68.3	69.9
Tetrazepam	Pl	1–250	$y = 0.0074x + 0.001$	0.996	0.001	0.5	86.9	96.8
	OF	0.2–50	$y = 0.0276x + 0.0024$	0.998	0.0014	0.1	72.1	69.3
Triazolam	Pl	2–250	$y = 0.0149x - 0.0004$	0.994	0.0007	0.5	74.5	69.9
	OF	0.2–50	$y = 0.0118x + 0.001$	0.998	0.0011	0.1	63.9	64.9

^a Defined as the lowest concentration of the drug resulting in a signal-to-noise ratio of 3:1.

^b Low levels, 5 ng/ml in plasma and 2 ng/ml in OF samples.

^c High levels, 125 ng/ml in plasma and 25 ng/ml in OF samples.

Table 5
Evaluation of partial sample dilution in plasma and oral fluid samples, and recoveries of benzodiazepines from the cotton roll of the Salivette[®] devices

Compound		Dilution 1/5 ($n = 6$)		Recovery from Salivette [®] (%) ($n = 5$)	
		R.S.D. (%)	Mean relative error ^a	1 ng/ml	25 ng/ml
Alprazolam	Pl	1.6	0.2	101.2	82.7
	OF	2.6	3.4		
Bromazepam	Pl	12.8	2.3	91.6	90.0
	OF	9.2	1.5		
Diazepam	Pl	2.4	0.7	68.0	67.7
	OF	2.2	3.8		
Flunitrazepam	Pl	3.1	0.8	88.8	78.7
	OF	1.6	0.6		
Lorazepam	Pl	2.5	1.4	65.8	70.3
	OF	1.6	1.8		
Lormetazepam	Pl	2.9	1.4	81.8	73.5
	OF	1.5	7.2		
Midazolam	Pl	9.7	3.9	52.2	55.0
	OF	10.0	2.7		
Tetrazepam	Pl	5.4	7.3	55.0	53.7
	OF	3.7	3.6		
Triazolam	Pl	5.9	3.7	89.8	87.4
	OF	5.8	13.2		

^a Mean relative error = $|\text{Mean measured value} - \text{theoretical value}| \times 100/\text{theoretical value}$.

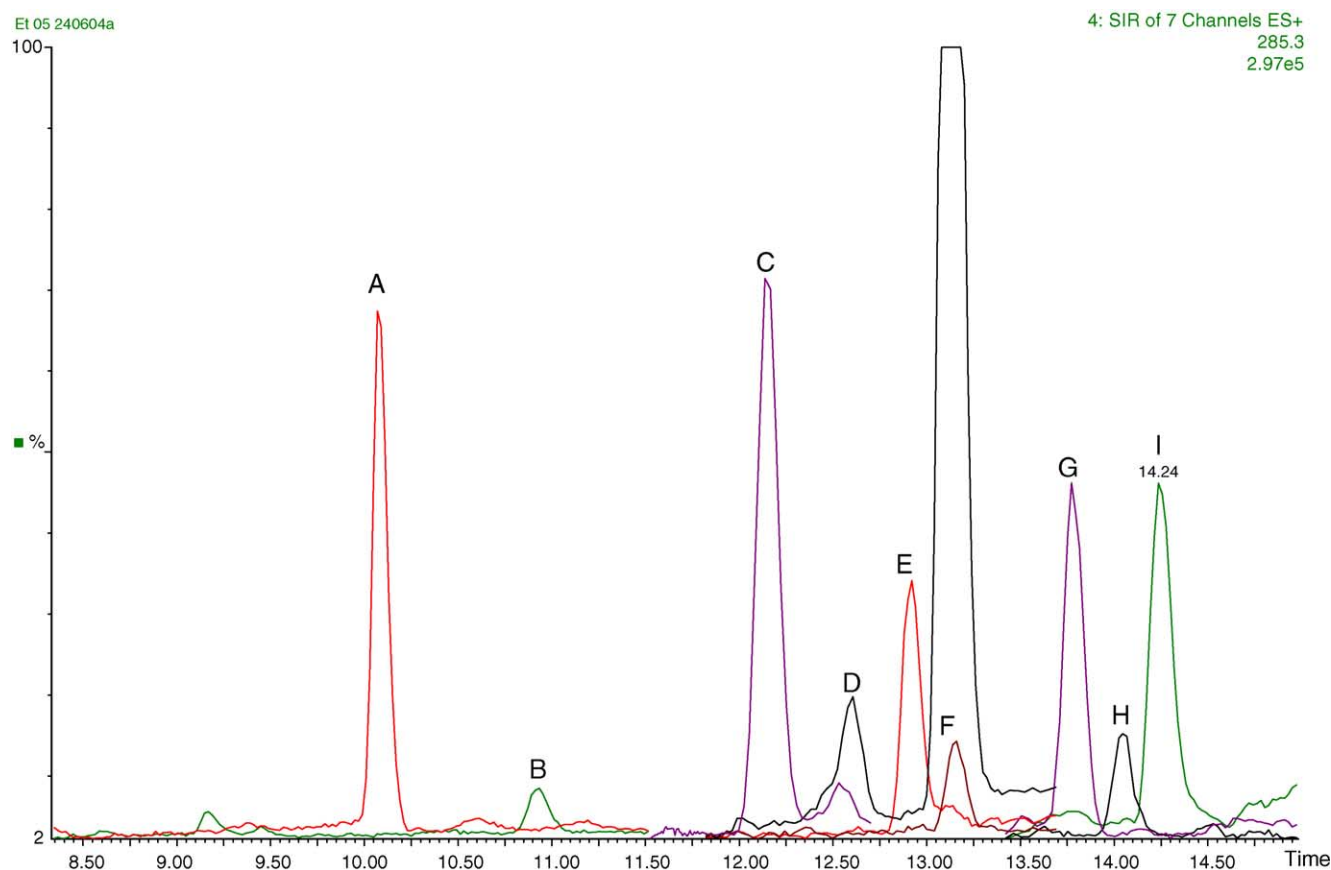


Fig. 2. LC-ES-MS ion chromatograms of an OF sample spiked at 0.5 ng/ml of nine benzodiazepines.

As an alternative to the extension of the calibration curve for the measurement of concentrations, which are above the highest calibration standard, the sample can be re-analysed after dilution with blank matrix [40–42]. The validation of this procedure showed the following results: the 1/5 dilution

of a plasma concentration of 1250 ng/ml and a saliva concentration of 250 ng/ml for each BZP yielded results within the defined precision and accuracy criteria (Table 5). The same table also shows the recoveries of the nine BZP from the Salivette device. In our study the recovery from the cotton

Table 6
Results of the kinetic study done in patients undergoing lorazepam treatment

Case number	Extraction time	Concentration found (ng/ml)		
		Plasma	Oral fluid (Salivette without stimulation)	Oral fluid (Salivette with stimulation)
1	–5	N.A.	0.00	0.00
	30	N.A.	3.39	2.01
	60	4.56	1.48	0.72
	90	5.50	0.45	0.30
	120	2.58	<LOQ	<LOQ
	150	3.92	<LOQ	<LOD
	180	3.73	<LOD	<LOD
	300	N.A.	N.A.	N.A.
2	360	2.58	N.A.	N.A.
	–5		0.00	0.00
	30		0.77	0.45
	60		0.49	0.27
	90		0.35	0.24
	120		<LOQ	<LOQ
	180		<LOQ	<LOD
	240		<LOD	<LOD
	420		<LOD	<LOD

roll of Salivette[®] was very variable, and ranged from only 52.2% for midazolam and 101.2% for alprazolam, respectively. This means that more than 50% of the drug present in saliva can remain in the cotton, which represents another difficulty in the interpretation of saliva results: It is very risky, as we showed, to establish a relation between plasma/saliva concentrations for selected BZP, and in any case specific studies for each new drug should be done. In any case the proposed analytical procedure is sensitive enough as to detect very low saliva concentrations, which permit to diagnose recent consumption of the nine BZP studied. Figs. 1 and 2 show the ion chromatograms of a plasma sample spiked at 5 ng/ml and a saliva sample spiked at 0.5 ng/ml with BZP, respectively.

No suppressive effect was detected in the region of interest after the evaluation of the ion suppression effect by the post-column infusion system.

Finally, Tables 6 and 7 show the results of the kinetic study done in patients undergoing midazolam or lormetazepam treatment. Fig. 3 represents the ion chromatogram of a saliva sample from a patient undergoing lormetazepam treatment. In summary, we have developed a simple and rapid method for the BZP quantitation in plasma and oral fluid by using LC–MS. The procedure is sensitive and specific and involves

Table 7

Results of the kinetic study done in patients undergoing midazolam treatment

Case number	Concentration found (ng/ml)	Sample extraction time (min)		
		10	30	50
1	Plasma	197.87	54.29	43.36
	OF	13.98 ^a	2.56 ^a	1.04
2	Plasma	282.9	140.6	51.8
	OF	N.A.	N.A.	N.A.
		20	40	60
3	Plasma	1101.74	156.7	28.19
	OF	1.98 ^a	0.57	0.57
4	Plasma	50.64	25.48	30.2
	OF	0.79 ^a	1.42 ^a	0.22 ^a
5	Plasma	308.87	26.29	15.04
	OF	1.73 ^a	2.16 ^a	N.A.

N.A., no sample available.

^a Not enough volume of sample (<500 µl).

a very simple liquid–liquid extraction method. It has been validated and applied to real samples. The method is especially useful to analyse saliva samples from drivers undergoing road side drug controls.

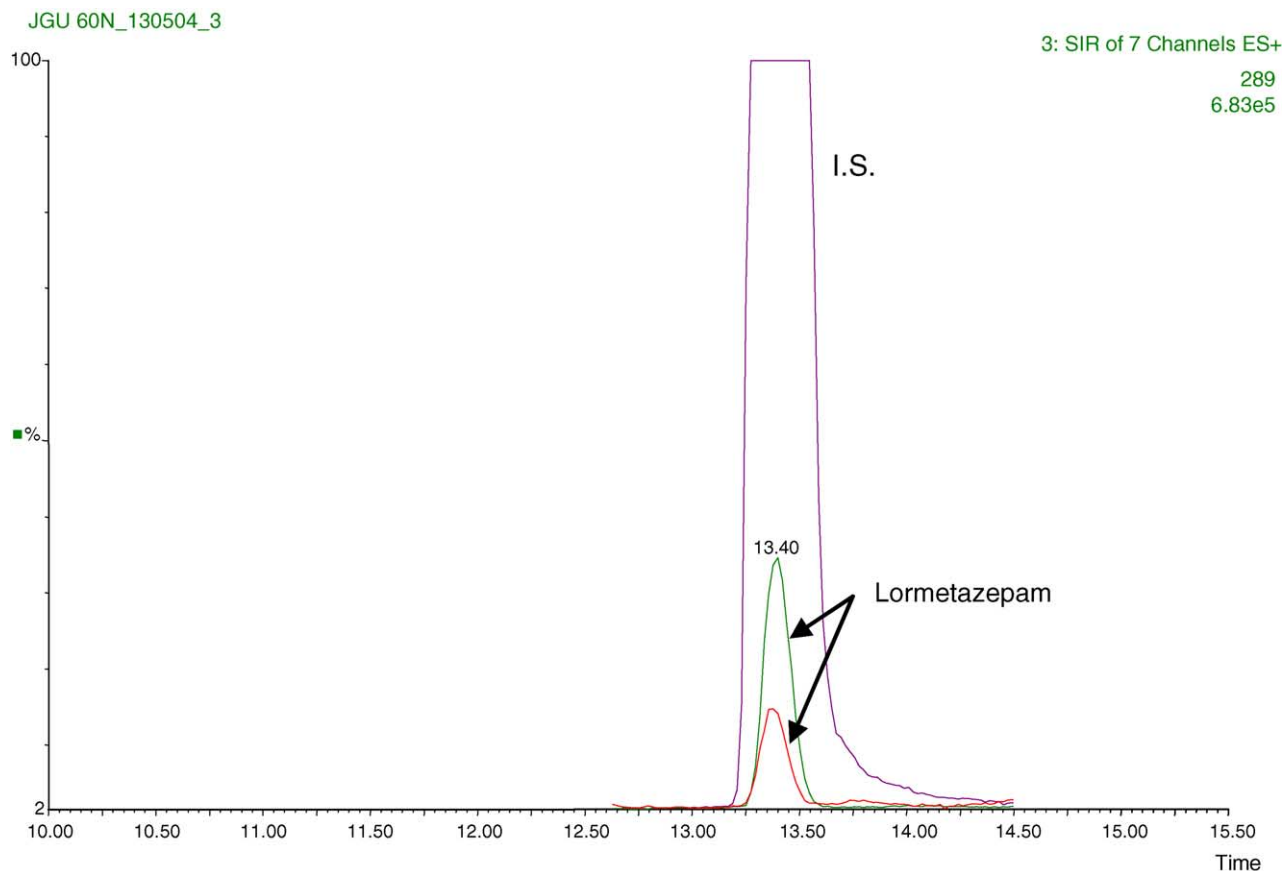


Fig. 3. Selected ion chromatograms of OF sample collected at 60 min after administration of single oral dose of 1 mg lormetazepam with Salivette[®] device. The concentration measured was: 1.48 ng/ml.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Dirección Xeral de Investigación Científica de la Xunta de Galicia (XUGA 2001) to research groups of excellence, and by EU under ROSITA project.

References

- [1] H.J. Möller, J. Psychopharmacol. 19 (1999) 2S.
- [2] J.W. Dundee, N.J. Halliday, K.W. Harper, R.N. Brogden, *Drugs* 28 (1984) 519.
- [3] M.H. Lader, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 9 (1999) 399.
- [4] O.H. Drummer, D.L. Ranson, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 17 (1996) 336.
- [5] S.J. Salamone, *Benzodiazepines and GHB: Detection and Pharmacology*, Humana Press, Totowa, NJ, 2001.
- [6] V. Maes, C. Charlier, O. Grenez, A. Verstraete, ROSITA D1, DGVII PL98-3032, 1999 (available from <http://www.rosita.org>).
- [7] B. Verwey, P. Elling, H. Wientjes, F.J. Zitman, *J. Clin. Psychiatry* 61 (2000) 456.
- [8] S. Pirnay, I. Ricordel, D. Libong, S. Bouchonnet, *J. Chromatogr. A* 954 (2002) 235.
- [9] A. Perisolo, *Encéphale* 22 (1996) 187.
- [10] D.J. Greenblatt, J.I. Javaid, A. Locnistar, J.S. Harmatz, R.I. Shader, *J. Chromatogr.* 534 (1990) 202.
- [11] H. Gjerde, E. Dahlin, A.S. Christopherson, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10 (1992) 317.
- [12] I. Klebovich, M. Kapas, L. Vereczkey, *Acta Pharm. Hung.* 2 (1982) 246.
- [13] T.V. Beischlag, T. Inaba, *J. Anal. Toxicol.* 16 (1992) 236.
- [14] P. Kintz, P. Mangin, *J. Anal. Toxicol.* 15 (1991) 202.
- [15] H. Maurer, K. Pfleger, *J. Chromatogr.* 422 (1987) 85.
- [16] W.A. Joern, *J. Anal. Toxicol.* 16 (1992) 363.
- [17] D.A. Black, G.D. Clark, V.M. Haver, J.A. Garbin, A.J. Saxon, *J. Anal. Toxicol.* 18 (1991) 185.
- [18] R.L. Fitzgerald, D.A. Rexin, D.A. Herold, *J. Anal. Toxicol.* 17 (1993) 347.
- [19] E.R. Cairns, B.R. Dams, J.C. Ouwerkerk, L.J. Porter, *J. Anal. Toxicol.* 18 (1994) 1.
- [20] E.M. Koves, B. Yen, *J. Anal. Toxicol.* 13 (1989) 69.
- [21] K.M. Höld, D.J. Chrouh, D.E. Rollins, D.G. Wilkins, D.V. Canfield, R.A. Maes, *J. Mass Spectrom.* 31 (1996) 1033.
- [22] J. Segura, R. Ventura, C. Jurado, *J. Chromatogr. B* 713 (1998) 61.
- [23] H.H. Maurer, *J. Chromatogr.* 580 (1992) 3.
- [24] H.H. Maurer, *J. Chromatogr. B* 713 (1998) 3.
- [25] H. Hoja, P. Marquet, B. Berneil, H. Lotfi, B. Penicaut, G. Lachâtre, *J. Anal. Toxicol.* 21 (1997) 116.
- [26] P. Marquet, *Ther. Drug Monit.* 24 (2002) 255.
- [27] J.F. Van Boxlaer, K.M. Clauwaert, W.E. Lambert, D.L. Deforce, E.G. Van den Eeckhout, A.P. De Leenheer, *Mass Spectrom. Rev.* 19 (2000) 165.
- [28] O.H. Drummer, *J. Chromatogr. B* 713 (1998) 3.
- [29] J.L. Valentine, J.R. Middleton, C. Sparks, *J. Anal. Toxicol.* 20 (1996) 416.
- [30] K.K. Akerman, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 56 (1996) 609.
- [31] F. Mußhoff, T. Daldrup, *Int. J. Legal Med.* 105 (1992) 105.
- [32] M. Casas, L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11 (1993) 277.
- [33] S.C. Bishop, M.L. Lerch, B.R. McCord, *Forensic Sci. Int.* 141 (2001) 7.
- [34] P. Wernly, W. Thormann, *Anal. Chem.* 64 (1992) 2155.
- [35] M. Schafroth, W. Thormann, *Allemann Electrophor.* 15 (1994) 72.
- [36] ROSITA D1, DGVII PL98-3032, 1999 (available from <http://www.rosita.org>).
- [37] V.P. Shah, K.K. Mida, J.W.A. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonnelli, C.T. Viswanathan, A. Jacobi, *Pharm. Res.* 17 (2000) 1551.
- [38] F.T. Peters, H.H. Maurer, *Accred. Qual. Assur.* 7 (2001) 441.
- [39] D. Dadgar, P.E. Burnett, M.G. Choc, K. Gallicano, J.W. Hooper, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 89.
- [40] R. Bonfiglio, R.C. King, T.V. Olah, K. Merkle, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1175.
- [41] C. Müller, P. Schäfer, M. Störtzel, S. Vogt, W. Weinmann, *J. Chromatogr. B* 773 (2002) 47.
- [42] Y. Hsieh, M. Chintala, H. Mei, J. Agans, J.M. Ng, K. Brisson, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 2481.

Screening method for benzodiazepines and hypnotics in hair at pg/mg level by liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry

Marion Villain^{a,*}, Marta Concheiro^b, Vincent Cirimele^a, Pascal Kintz^a

^a Laboratoire ChemTox, rue Grüniger, 67400 Illkirch, France

^b Instituto de Medicina Legal, c/San Francisco s/n, Facultad de Medicina, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Received 16 October 2004; accepted 24 December 2004

Available online 11 February 2005

Abstract

A procedure is presented for the screening of 16 benzodiazepines and hypnotics in human hair by LC–MS/MS (alprazolam, 7-aminoclonazepam, 7-aminoflunitrazepam, bromazepam, clobazam, diazepam, lorazepam, lormetazepam, midazolam, nordiazepam, oxazepam, temazepam, tetrazepam, triazolam, zaleplon and zolpidem). The method involves decontamination of hair with methylene chloride, hair cut into small pieces, incubation of 20 mg in phosphate buffer (pH 8.4) in the presence of 1 ng diazepam-d₅ used as internal standard, liquid–liquid extraction with diethyl ether/methylene chloride (10/90) and separation using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. The limits of quantification for all benzodiazepines and hypnotics range from 0.5 to 5 pg/mg using a 20-mg hair sample. Linearity is observed from the limit of quantification of each compound to 200 pg/mg ($r^2 > 0.99$). Coefficients of variation measured on six points and at two concentrations (10 and 50 pg/mg) range from 5 to 20% for all drugs but one. Extraction recovery, measured at the two same concentrations range from 32 to 76%. These results were found suitable to screen for 16 benzodiazepines in hair and detect them at very low concentrations, making this method suitable to monitor single dose.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Benzodiazepines; Hypnotics; Hair; LC–MS/MS

1. Introduction

Hair testing is widely employed to evaluate drug use. In the past decades, particular attention has been given to the use of hair for the detection of drugs of abuse, on chronic bases. However, the detection in human hair of benzodiazepines, the most abused pharmaceutical drugs in the world, appears not to be well documented. One old paper reports their detection by radioimmunoassay [1]. Diazepam was readily detected, but alprazolam and lorazepam were not found in subjects receiving therapeutic dosages. In 1995, Couper et al. [2] established a procedure for the detection of psychotic drugs in hair by HPLC, but diazepam, nitrazepam and oxazepam were not detected in hair samples from subjects under treatment.

Nordiazepam and its major metabolite, oxazepam, were identified by Kintz et al. [3] using GC–NCI–MS after derivatization by silylation. In 1996, Gaillard and Pépin [4] identified alprazolam by GC–EI–MS. In 1997, Cirimele et al. [5] published two different analytical procedures for the detection of flunitrazepam and its major metabolite, 7-amino-flunitrazepam, using GC–NCI–MS after derivatization with heptafluorobutyric anhydride and for the detection of lorazepam after silylation [6]. In 2000, Negrusz et al. [7] presented an analytical procedure for the detection of clonazepam and 7-amino-clonazepam, using GC–NCI–MS after derivatization with heptafluorobutyric anhydride.

All these procedures were able to test for one or two benzodiazepines only.

In 1997, Cirimele et al. [8] established the first screening procedure for the simultaneous detection in human hair of eight forensically relevant benzodiazepines using

* Corresponding author. Fax: +33 3 90 400 541.

E-mail address: mvillain@labochemtox.com (M. Villain).

GC–NCI–MS after silylation. Limits of detection were in the range 1–20 pg/mg, using a 50 mg sample.

El Mahjoub and Staub [9] published in 2001 a screening method for five benzodiazepines in human hair by on-line high-performance liquid chromatography using a restricted access extraction column, with limits of detection of about 200 pg/mg.

More recently, Kronstrand et al. [10] established an analytical procedure for the screening of seven benzodiazepines and metabolites, using LC–MS–MS, in hair of psychiatric patients. Typical limits of quantification were 25–125 pg/mg.

The purpose of our work was to establish a screening method for the simultaneous detection of 16 benzodiazepines and hypnotics present in hair at pg/mg level.

2. Materials and methods

2.1. Specimens

Blank hair samples (blond) were obtained from laboratory personnel, through verbal consent.

2.2. Chemicals and reagents

Alprazolam, 7-amino-clonazepam, 7-amino-flunitrazepam, bromazepam, clobazam, diazepam, lorazepam, lormetazepam, midazolam, nordiazepam, oxazepam, temazepam, triazolam, zolpidem and diazepam- d_5 were obtained from Promochem (Molsheim, France) and tetrazepam from Euromedex (Souffelweyersheim, France).

Table 1
MRM transitions for the detection of 16 benzodiazepines and hypnotics and IS by LC–MS/MS

Compound	Retention time (min)	Parent ion (m/z)	Daughter ions (m/z)	Cone (V)	Collision energy (eV)
Alprazolam	10.9	309.1	281.3	45	40
			<u>274.2</u>	45	26
7-Aminoclonazepam	7.5	286.1	222.2	40	25
			<u>250.2</u>	40	20
7-Aminoflunitrazepam	8.2	284.2	<u>135.1</u>	40	28
			227.2	40	25
Bromazepam	9.6	316.0	<u>182.3</u>	35	30
			209.3	35	25
Clobazam	11.7	301.1	224.2	30	33
			<u>259.1</u>	30	20
Diazepam	12.0	285.2	<u>154.2</u>	40	25
			193.3	40	30
Lorazepam	11.0	321.1	229.1	30	27
			<u>275.1</u>	30	22
Lormetazepam	11.7	335.1	177.1	28	40
			<u>289.1</u>	28	20
Midazolam	9.3	326.1	244.1	44	25
			<u>291.2</u>	44	28
Nordiazepam	11.1	271.2	<u>140.1</u>	40	25
			165.1	40	28
Oxazepam	10.8	269.1	163.1	45	32
			<u>241.2</u>	45	20
Temazepam	11.5	301.1	283.1	30	40
			<u>255.2</u>	30	20
Tetrazepam	11.1	289.2	225.2	40	26
			<u>253.2</u>	40	22
Triazolam	11.0	343.1	<u>308.1</u>	45	26
			315.1	45	27
Zaleplon	10.4	306.2	<u>236.2</u>	40	28
			264.2	40	20
Zolpidem	8.4	308.2	<u>235.3</u>	40	35
			263.2	40	26
Diazepam- d_5	12.0	290.2	<u>154.1</u>	40	30
			198.3	40	30

The transition for quantification is underlined.

Zaleplon was provided by Wyeth laboratories (Paris, France). Formic acid was from Prolabo (Paris, France). Acetonitrile, methanol and methylene chloride HPLC grade were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Diethyl ether was from SDS (Peypin, France). Chemicals for the saturated phosphate buffer— $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ adjusted to pH 8.4 with hydrochloric acid 1N—were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Drugs and diazepam- d_5 were prepared in methanol after appropriate dilutions and were stored at $+4^\circ\text{C}$.

2.3. Extraction

After decontamination of the hair strand with methylene chloride ($2 \times 5\text{ ml}$ for 2 min), hair was segmented, if necessary, and cut into small pieces. About 20 mg were incubated overnight in 1 ml of phosphate buffer pH 8.4, in the presence of 1 ng of diazepam- d_5 used as internal standard (IS), and extracted by 5 ml methylene chloride/diethylether (90/10, v/v). After horizontal agitation (15 min) and centrifugation ($10,000 \times g$ for 15 min), the

organic phase was collected and evaporated to dryness using a SpeedVac[®]. The residue was reconstituted by adding 60 μl of methanol.

2.4. LC–MS/MS procedure

A 10 μl aliquot of the extract was injected onto the column (XTerra MS C18 3.5 μm , 100 mm $\times$ 2.1 mm i.d.), protected by a 1 mm C18 frit. Each 20 min chromatographic run was carried out with a gradient (5% acetonitrile–95% formic acid 0.1% to a ratio 80–20% at 10 min), at a flow rate of 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. The HPLC system was a Waters Alliance 2695.

Detection was carried out by a Micromass Quattro Micro tandem mass spectrometer equipped with an ionspray atmospheric pressure interface. The instrument was operated in the positive ionization mode. Best results were obtained with a capillary voltage of 1 kV, source block temperature of 120°C and desolvation gas (nitrogen) heated to 350°C and delivered at 550 l/h. Collision cell pressure was 4 mbar of argon.

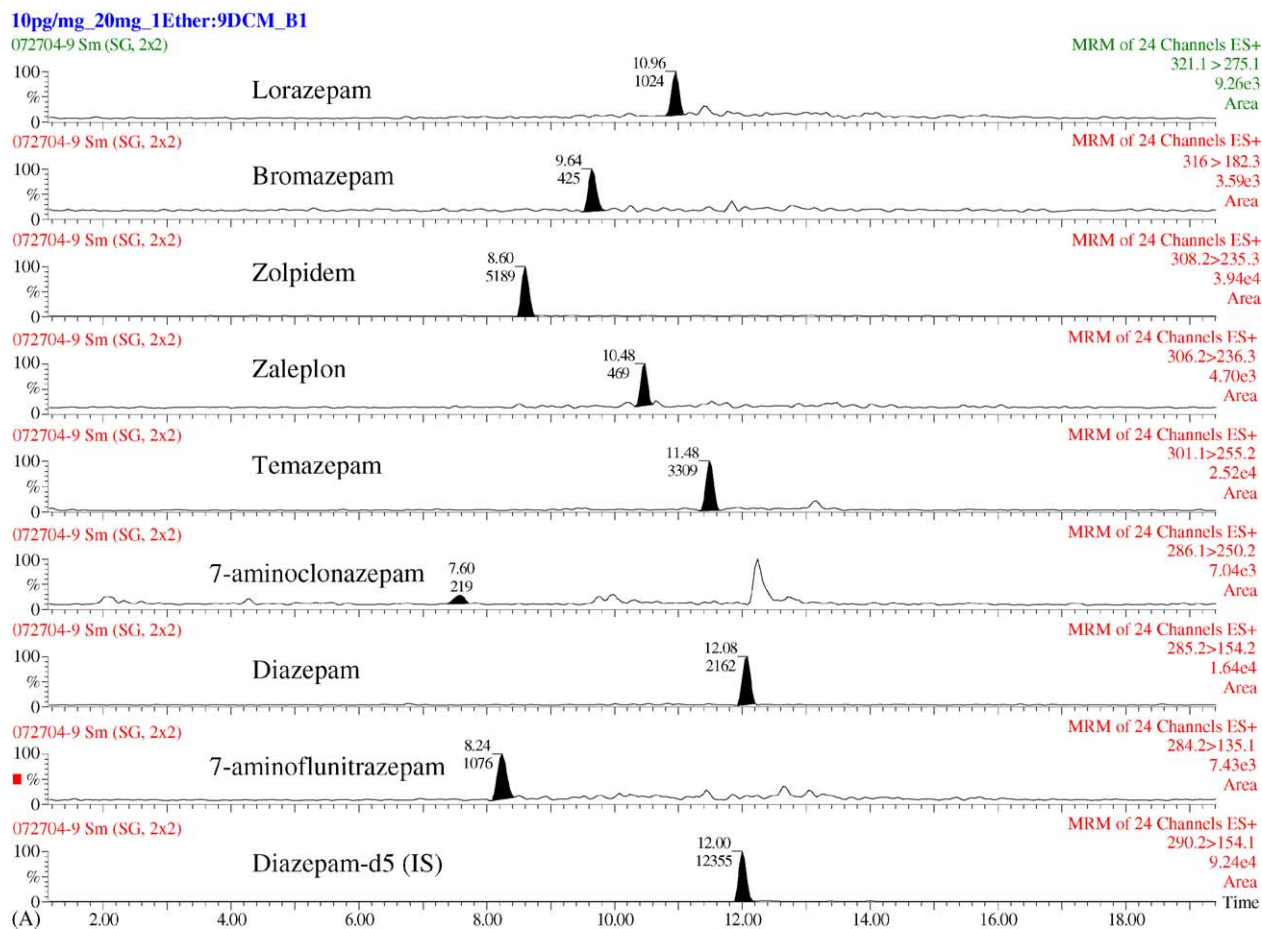


Fig. 1. Chromatogram of a blank hair (20 mg) spiked at a final concentration of 10 pg/mg with, from the top to the bottom, the quantification ions of (A) lorazepam, bromazepam, zolpidem, zaleplon, temazepam, 7-amino-clonazepam, diazepam, 7-amino-flunitrazepam and the IS (50 pg/mg) and (B) triazolam, lormetazepam, midazolam, alprazolam, clobazam, tetrazepam, nordiazepam, oxazepam and the IS (50 pg/mg).

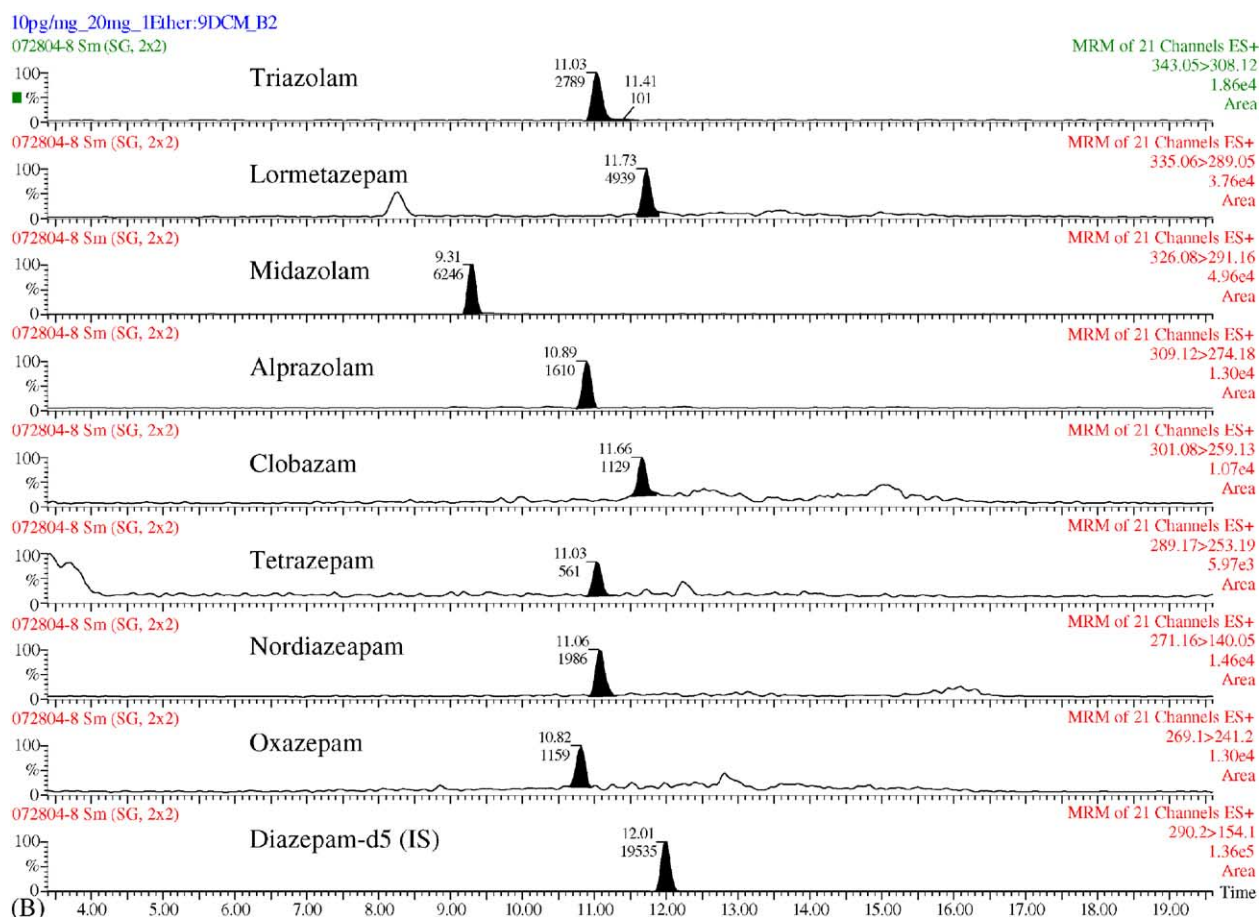


Fig. 1. (Continued.)

Table 2
Validation parameters for the different compounds

Compound	Linearity	Extraction recovery (%)	Within batch precision (C.V., $n = 6$)	Within batch accuracy (%Bias, $n = 6$)	LOQ (pg/mg)
Alprazolam	1–200 pg/mg, $r^2 = 0.9999$	59.2 (10 pg/mg) 69.5 (50 pg/mg)	12.9 (10 pg/mg) 9.9 (50 pg/mg)	10.5 (10pg/mg) 3.9 (50 pg/mg)	1
7-Aminoclonazepam	5–200 pg/mg, $r^2 = 0.9976$	38.5 (10 pg/mg) 46.1 (50 pg/mg)	28.6 (10 pg/mg) 14.9 (50 pg/mg)	0.8 (10 pg/mg) 12.8 (50 pg/mg)	5
7-Aminoflunitrazepam	2–200 pg/mg, $r^2 = 0.9972$	56.7 (10 pg/mg) 48.4 (50 pg/mg)	12.1 (10 pg/mg) 19.7 (50 pg/mg)	3.0 (10 pg/mg) 0.9 (50 pg/mg)	2
Bromazepam	2–200 pg/mg, $r^2 = 0.9977$	51.7 (10 pg/mg) 45.3 (50 pg/mg)	9.9 (10 pg/mg) 11.6 (50 pg/mg)	1.3 (10 pg/mg) 2.4 (50 pg/mg)	2
Clobazam	2–200 pg/mg, $r^2 = 0.9985$	56.5 (10 pg/mg) 75.8 (50 pg/mg)	11.4 (10 pg/mg) 10.1 (50 pg/mg)	10.7 (10 pg/mg) 6.2 (50 pg/mg)	2
Diazepam	1–200 pg/mg, $r^2 = 0.9994$	54.5 (10 pg/mg) 59.9 (50 pg/mg)	5.3 (10 pg/mg) 8.5 (50 pg/mg)	0.8 (10 pg/mg) 11.2 (50 pg/mg)	1
Lorazepam	5–200 pg/mg, $r^2 = 0.9996$	32.2 (10 pg/mg) 38.0 (50 pg/mg)	6.1 (10 pg/mg) 9.1 (50 pg/mg)	17.7 (10 pg/mg) 12.2 (50 pg/mg)	5
Lormetazepam	2–200 pg/mg, $r^2 = 0.9978$	59.3 (10 pg/mg) 63.5 (50 pg/mg)	6.6 (10 pg/mg) 9.7 (50 pg/mg)	7.9 (10 pg/mg) 3.3 (50 pg/mg)	2
Midazolam	0.5–200 pg/mg, $r^2 = 0.9989$	54.5 (10 pg/mg) 63.8 (50 pg/mg)	17.9 (10 pg/mg) 7.2 (50 pg/mg)	4.7 (10 pg/mg) 1.8 (50 pg/mg)	0.5

Table 2 (Continued)

Compound	Linearity	Extraction recovery (%)	Within batch precision (C.V., $n = 6$)	Within batch accuracy (%Bias, $n = 6$)	LOQ (pg/mg)
Nordiazepam	2–200 pg/mg, $r^2 = 0.9999$	49.2 (10 pg/mg) 60.1 (50 pg/mg)	9.9 (10 pg/mg) 8.1 (50 pg/mg)	1.1 (10 pg/mg) 1.7 (50 pg/mg)	2
Oxazepam	1–200 pg/mg, $r^2 = 0.9996$	38.6 (10 pg/mg) 50.3 (50 pg/mg)	13.0 (10 pg/mg) 7.5 (50 pg/mg)	8.6 (10 pg/mg) 1.1 (50 pg/mg)	1
Temazepam	1–200 pg/mg, $r^2 = 0.9997$	52.5 (10 pg/mg) 54.4 (50 pg/mg)	5.8 (10 pg/mg) 8.3 (50 pg/mg)	5.8 (10 pg/mg) 3.8 (50 pg/mg)	1
Tetrazepam	5–200 pg/mg, $r^2 = 0.9999$	35.9 (10 pg/mg) 41.7 (50 pg/mg)	13.1 (10 pg/mg) 7.3 (50 pg/mg)	20.2 (10 pg/mg) 3.0 (50 pg/mg)	5
Triazolam	0.5–200 pg/mg, $r^2 = 0.9991$	55.0 (10 pg/mg) 63.0 (50 pg/mg)	9.2 (10 pg/mg) 6.4 (50 pg/mg)	11.0 (10 pg/mg) 4.6 (50 pg/mg)	0.5
Zaleplon	1–200 pg/mg, $r^2 = 0.9970$	58.7 (10 pg/mg) 52.7 (50 pg/mg)	9.3 (10 pg/mg) 9.4 (50 pg/mg)	3.9 (10 pg/mg) 4.5 (50 pg/mg)	1
Zolpidem	0.5–200 pg/mg, $r^2 = 0.9993$	45.7 (10 pg/mg) 40.9 (50 pg/mg)	4.6 (10 pg/mg) 19.6 (50 pg/mg)	4.3 (10 pg/mg) 20.4 (50 pg/mg)	0.5

Data were recorded in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. Parent ions, the corresponding daughter ions, retention time, cone voltage and collision energy optimized for the 16 benzodiazepines and IS are presented in Table 1.

2.5. Method validation

Standard calibration curves were obtained by preparing authentic spiked blank hair (20 mg) containing final 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 and 200 pg/mg of the 16 compounds. Within

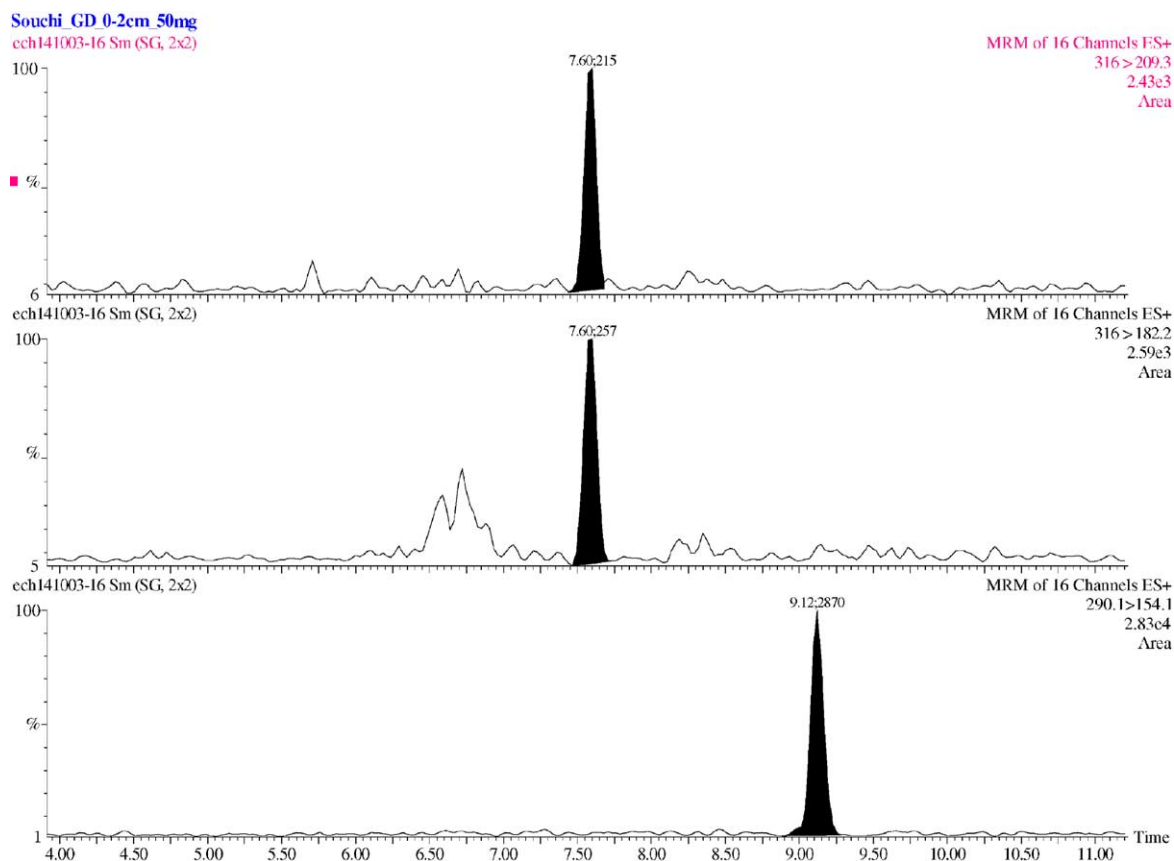


Fig. 2. Chromatogram obtained after analysis of the root segment of the hair of a volunteer who was administered a single dose of 10 mg of zolpidem 1 month before. On the top, the two daughter ions of zolpidem, on the bottom, the daughter ion of the IS. Concentration was 1.8 pg/mg.

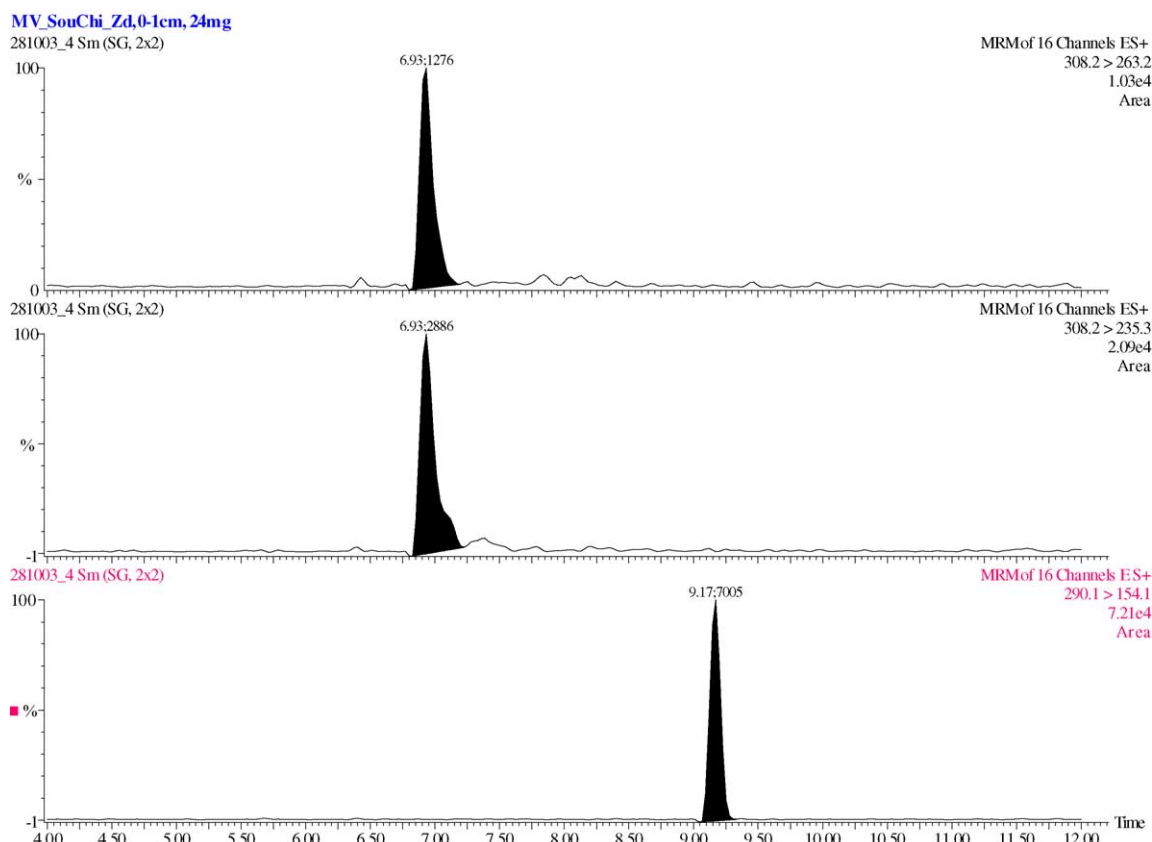


Fig. 3. Chromatogram obtained after analysis of the root segment of the hair of a volunteer who was administered a single dose of 6 mg of bromazepam 1 month before. On the top, the two daughter ions of bromazepam, on the bottom, the daughter ion of the IS. Concentration was 4.7 pg/mg.

batch precisions and accuracies ($n = 6$) were determined using blank hair spiked with the 16 compounds at 10 and 50 pg/mg. Recovery was established, at 10 and 50 pg/mg, by comparing the analyte peak areas of three extracted samples with those of three extracted samples blanks spiked with the same amounts of the analyte after extraction.

The limit of quantification (LOQ) is the lowest concentration of analyte that could be measured specifically with the presence of the two transitions and corresponds to the lowest point of the linearity for each molecule.

3. Results and discussion

Under the chromatographic conditions used, there was no interference with the analytes by any extractable endogenous materials present in hair. There were no blank effects.

The chromatogram of a blank hair spiked with the 16 benzodiazepines and hypnotics at 10 pg/mg is shown Fig. 1A and B. The method provides good resolution of the different drugs.

Validation data are presented in Table 2.

The limit of quantification for all benzodiazepines and hypnotics range from 0.5 to 5 pg/mg using a 20-mg hair sample. The method was linear in hair for each compound,

from the limit of quantification to 200 pg/mg ($r^2 > 0.99$). Precisions and accuracies, at 10 and 50 pg/mg, were $<20\%$ in all cases but one. Extraction recovery, measured at the two same concentrations, range from 32 to 76%, that is suitable for a screening procedure.

As proposed by several authors [5,7], in case of nitro-benzodiazepines, the target compound is the 7-amino-metabolite. Due to their stability in alkaline medium, in contrast with other benzodiazepines, it is possible to lower their LOQ about five times with a specific extraction after sodium hydroxide hydrolysis [11].

To demonstrate the applicability of this procedure, Figs. 2 and 3 represent the chromatograms obtained after analysis of the root segment of volunteers who have been administered a single dose of 10 mg of zolpidem (women, 28-year-old, 60 kg) or 6 mg of bromazepam (women, 26-year-old, 50 kg), 1 month before. These findings demonstrate that it is possible to track a single drug exposure using an ultra-sensitive procedure. Fig. 4 is the chromatogram obtained after analysis of the hair of a 12-year-old girl sexually abused by her father since she was 6. During the last months, she was sometimes administered half a white tablet of Xanax 0.5 mg, to be more willing. The chromatogram represents the analysis of the root segment (0–2 cm) and relate the exposition to alprazolam during the 2 last months.

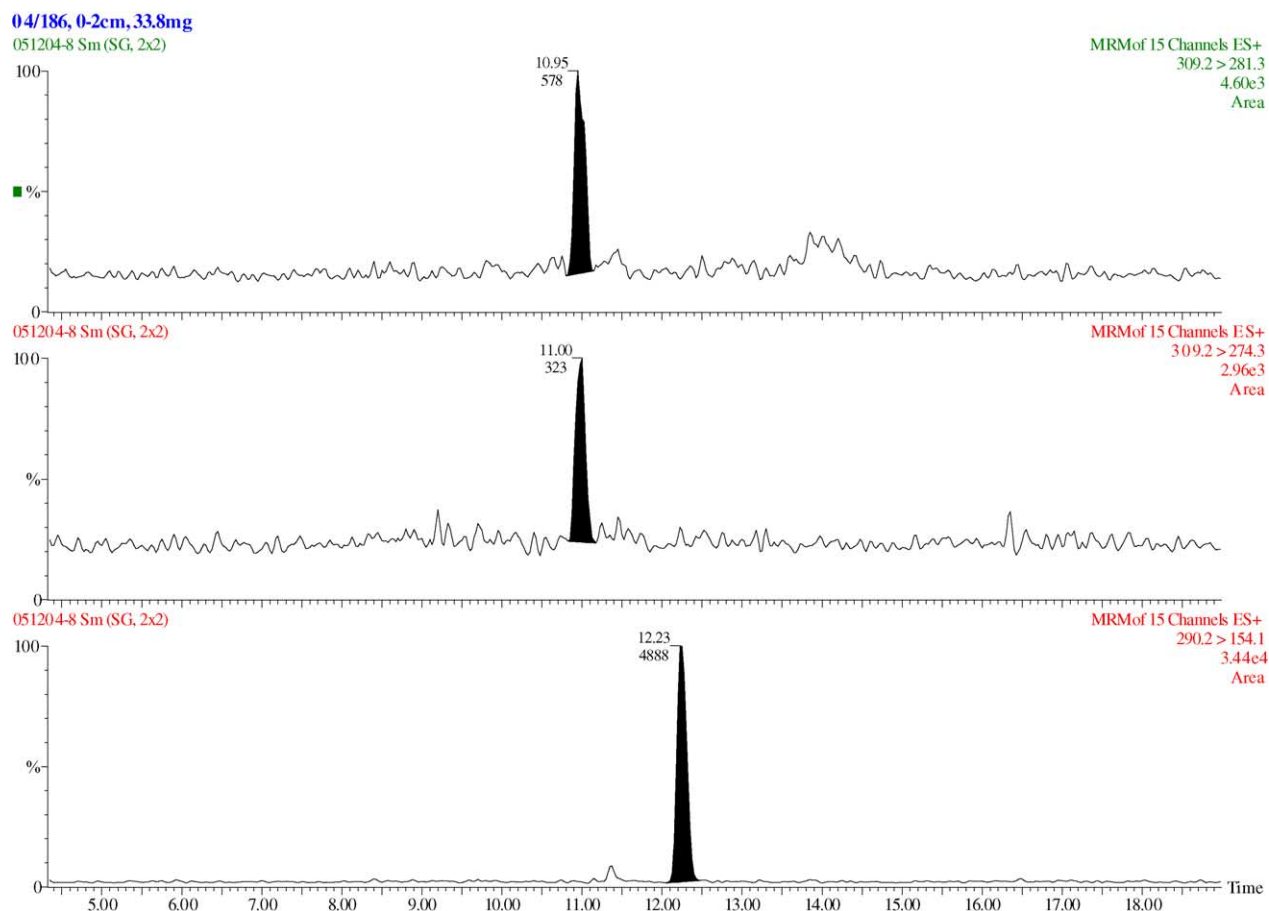


Fig. 4. Chromatogram obtained after the analysis of the hair of a girl sexually abused by her father under the influence of alprazolam. Alprazolam tested positive at 4.9 pg/mg.

This method appears rapid and simple, detecting all compounds from an aliquot. Therefore, it can be used for the analysis of a large number of hair specimens. Specificity is observed by using two daughter ions for each compound. Finally, the procedure is flexible, as it is always possible to include new compounds, such as drug coming from foreign countries (e.g. phenazepam used in east Europe, . . .).

4. Conclusion

This sensitive, specific and reproducible method developed is suitable for the detection and quantification of 16 benzodiazepines and hypnotics in human hair.

This technology may find useful applications, such as the monitoring of a single dose or to document exposure in forensic cases involving drug-facilitated crimes.

References

- [1] J.J. Sramek, W.A. Baumgartner, T.N. Ahrens, V.A. Hill, N.R. Cutler, *Ann. Pharmacother.* 26 (1992) 469.
- [2] F.J. Couper, I.M. McIntyre, O.H. Drummer, *J. Forensic Sci.* 40 (1995) 83.
- [3] P. Kintz, V. Cirimele, F. Vaysette, P. Mangin, *J. Chromatogr. B* 677 (1995) 241.
- [4] Y. Gaillard, G. Pépin, *Toxicorama* 8 (1996) 29.
- [5] V. Cirimele, P. Kintz, C. Staub, P. Mangin, *Forensic Sci. Int.* 84 (1997) 189.
- [6] V. Cirimele, P. Kintz, P. Mangin, *Int. J. Leg. Med.* 108 (1996) 265.
- [7] A. Negrusz, C.M. Moore, J.L. Kern, P.G. Janicak, M.J. Strong, N.A. Levy, *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 614.
- [8] V. Cirimele, P. Kintz, B. Ludes, *J. Chromatogr. B* 700 (1997) 119.
- [9] A. El Mahjoub, C. Staub, *Forensic Sci. Int.* 123 (2001) 17.
- [10] R. Kronstrand, I. Nyström, M. Josefsson, S. Hodgins, *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 479.
- [11] M. Chêze, M. Villain, G. Pépin, *Forensic Sci. Int.* 145 (2004) 123.

Determination of drugs of abuse and their metabolites in human plasma by liquid chromatography–mass spectrometry

An application to 156 road fatalities

Marta Concheiro, Ana de Castro, Óscar Quintela,
Manuel López-Rivadulla, Angelines Cruz*

*Forensic Toxicology Service, Institute of Legal Medicine, University of Santiago de Compostela, Spain,
C/San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain*

Received 10 November 2005; accepted 22 December 2005

Available online 24 January 2006

Abstract

A method, using 0.2 ml of plasma, was designed for the simultaneous determination of morphine, 6-monoacetylmorphine, amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, benzoylecgonine and cocaine. The drugs were analysed by LC–MS, after solid phase extraction in the presence of the deuterated analogues. Reversed phase separation on an Atlantis dC18 column was achieved in 10 min, under gradient conditions. The method was full validated, including linearity (2–250 ng/ml, $r^2 > 0.99$), recovery (>50%), within-day and between-day precision and accuracy (CV and bias <15%), limit of detection (0.5 and 1 ng/ml) and quantitation (2 ng/ml), relative ion intensities and no matrix effect was observed. The procedure showed to be sensitive and specific, and was applied to 156 real cases from road fatalities (7.1% cases positive to cocaine and 0.6% to designer drugs).

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Drugs of abuse; LC–MS; DUID; Plasma

1. Introduction

Concern over driving under the influence of drugs (DUID) as a risk factor and a cause of road accidents has recently risen. Illicit drugs can influence driving performance in different ways. Opiates induce sedation, indifference to external stimuli and increase reaction time. Stimulating drugs such as cocaine, amphetamines and designer drugs (MDMA, MDEA), induce a loss of concentration and attentiveness, produce dilated pupils, which increase sensitivity to blinding by light, and the euphoric phase may lead to increased risk-taking in traffic. Cannabis can influence perception, psychomotor performance, cognitive and affective functions, and finally, hallucinogens produce hallucinations, sleepiness and psychotic reactions incompatible with safe driving [1]. However, despite this knowledge of their effects, few epidemiological and experimental data are currently avail-

able on this issue. The influence of illicit drugs on driving performance and accident risk can be derived from epidemiological studies involving analysis of biological samples of fatally injured drivers for drugs. The most relevant matrices to be analyzed for this purpose, are plasma or blood, because their concentrations correlate best with the pharmacological or toxic effects. Moreover, blood samples are mandatory in cases of DUID in most European countries and some states of the USA [2].

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) is still the most widely method of reference used, but liquid chromatography coupled single-stage or tandem mass spectrometry (LC–MS, LC–MS–MS) is becoming increasingly important for the identification and quantification of analytes [3–6], especially for the more polar, thermolabile, or low-dosed drugs, as indicated by Maurer [7].

Many LC–MS methods for the determination of drugs of abuse in plasma have been published for the determination of opiates [8–15], cocaine and its metabolites [16–19], amphetamines and designer drugs [20–23], opiates and cocaine [24–26] and opiates, cocaine and LSD [27]. However, only

* Corresponding author. Tel.: +34 981582327; fax: +34 981580336.
E-mail address: apiml@usc.es (A. Cruz).

two methods for the simultaneous determination of opiates, amphetamines, benzoylecgonine and cocaine based on LC–MS/MS in oral fluid analysis [28–30] and in urine analysis [31] have been published.

We have developed and full validated, simple and low-cost LC–MS method, which includes relative ion intensity data, for the determination of morphine, 6-monoacetylmorphine (6-MAM), amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, benzoylecgonine and cocaine in plasma after solid phase extraction (SPE). In an initial attempt to obtain epidemiological data, this method has been applied to 156 road fatalities.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Morphine, 6-acetyl-morphine, D,L-amphetamine, D,L-methamphetamine, D,L-MDA, D,L-MDMA, D,L-MDEA, D,L-MBDB, benzoylecgonine, cocaine and internal standards (IS) D,L-MDMA-d₅, D,L-MBDB-d₅, benzoylecgonine-d₃ and cocaine-d₃ were obtained from Lipomed (Arlesheim, Switzerland) in solid form. LC–MS Chromasolv[®] grade acetonitrile (99.98% pure) was from Riedel de H  en-Sigma-Aldrich Chemie (Schnelldorf, Germany). Purified water was obtained in the laboratory by using a Milli-Q water system (Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland). Methanol, formic acid (99%), ammonia solution 25%, acetic acid (glacial) 100% anhydrous, H₃BO₃, KCl and NaOH were from Merck (Darmstadt, Germany). Ammonium formate was from Fluka-Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Switzerland). Solid-phase extraction (SPE) cartridges OASIS[®] HLB (3 cc, 60 mg) were from Waters (Milford, MA, USA).

A pH 9.0 borate buffer was prepared by mixing 6.2 g of H₃BO₃ and 7.5 g of KCl with 420 ml of a solution of 0.1 M NaOH, and adding water until 1000 ml. Fresh and drug-free human plasma were obtained from a local blood bank.

2.2. Preparation of stock solutions and standards

Individual stock solutions of the compounds were prepared in methanol, except for cocaine and its deuterated analogue, which was prepared in acetonitrile, at a concentration of 1 g/l and stored at –20 °C in the dark for a maximum of 6 months. Working solutions were monthly prepared in methanol at 100 mg/l separately for each compound, and stored in the dark at 4 °C. Daily, mixed working solutions of non-deuterated compounds at 0.008, 0.04, 0.2 and 1 mg/l, and a mixed working solution of D,L-MDMA-d₅, D,L-MBDB-d₅ and benzoylecgonine-d₃ at 1 mg/l and cocaine-d₃ at 0.5 mg/l were prepared by appropriate dilution with methanol.

2.3. Specimens

Blood samples were obtained from femoral veins. The specimens were frozen at –20 °C until analysis, which was performed within 15 days.

2.4. Sample preparation

One milliliter volume of each sample was centrifuge for 10 min at 12,100 × *g* to remove cell debris. To 0.2 ml of supernatant were added 25 µl of a mixed working solution of IS (D,L-MDMA-d₅, D,L-MBDB-d₅ and benzoylecgonine-d₃ at 1 mg/l and cocaine-d₃ at 0.5 mg/l), and 1 ml of pH 9.0 borate buffer in a 10 ml borosilicate tube. The calibrating standards of plasma at 0, 2, 5, 10, 25, 50, 125 and 250 ng/ml were prepared by spiking blank plasma samples with the appropriate working solution volumes.

After conditioning with 2 ml methanol and 2 ml water, the samples previously prepared were applied onto the SPE cartridges. Clean-up was accomplished with successive 2 ml washes of water–5% methanol (95:5, v/v) and a mixture water–2% NH₄OH in methanol (80:20, v/v). The cartridges were dried by applying full vacuum for 10 min before elution with 2 ml of 2% acetic acid in methanol. The elution solution was evaporated to dryness at 35 °C under a stream of nitrogen. The dry extract was re-dissolved in 100 µl of a mixture of a pH 3.0 ammonium formate buffer (ammonium formate 0.002 M and formic acid 0.1%) and acetonitrile (95:5, v/v). The sample was transferred into autosampler vials, and 20 µl were injected into the LC–MS.

2.5. Liquid chromatography–mass spectrometry

The HPLC system was a Waters Alliance 2795 separation module with a Waters Alliance series column heater/cooler (Waters, Milford, MA, USA). Chromatographic separation was performed with an Atlantis dC18, 3 µm (100 mm × 2.1 mm i.d.) reversed-phase column. The mobile phase, delivered at a flow rate of 0.2 ml/min at 26 °C, was a gradient of acetonitrile and a pH 3.0 ammonium formate buffer, programmed as follows: 5% acetonitrile during 1 min, linearly increased to 50% in 10 min, kept that percentage for 1 min, decreased to 5% (original conditions) in 1 min and equilibrated for 4 min, which resulted in a total run time of 17 min.

The detection was performed by using a Micromass ZMD 2000 mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) fitted with a Z-spray ion interface. Ionisation was achieved by using electrospray in the positive ionisation mode (ESI+). Nitrogen was used as nebulisation and desolvation gas. To optimise ionisation and ion transmission conditions for each compound and for the IS, separately 5 µl of a 10 µg/ml solution in the mobile phase were injected without HPLC separation into the ion source. In order to obtain the highest possible intensity for quantitation and confirmation ions, fragmentation energy (cone voltage) was optimised. During this experiment, a mass range from *m/z* 100 to 400 was monitored in SCAN mode, applying different cone voltages. Acquisition was made in the selected ion-monitoring mode (SIM). For the quantitation of each compound, the protonated molecule [M + H]⁺ was selected as the quantifier ion and one main fragment was selected as the confirmation ion. In the case of deuterated IS only the protonated molecule was selected. Table 1 summarizes the conditions for the measurement of each compound and the

Table 1

SIR functions, time windows of SIR functions, selected ions, cone voltages, retention times and corresponding IS

Compound	SIR function	Time window SIR function (min)	Selected <i>m/z</i> ratios ^a	Cone voltage (V)	Retention time (min)	IS
Morphine	Funtion 1 SIR of 2 <i>m/z</i>	2.0–5.0	286.0	40	3.7	Cocaine-d3
			201.0	55		
Amphetamine	Funtion 2 SIR of 9 <i>m/z</i>	5.0–8.2	136.1	15	7	MDMA-d5
			119.0	20		
Methamphetamine			150.1	15	7.4	MDMA-d5
			119.0	20		
MDA			180.2	15	7.4	MDMA-d5
			163.2	20		
6-Acetylmorphine			328.1	30	7.5	MDMA-d5
			211.0	60		
MDMA			194.2	15	7.7	MDMA-d5
			163.2	20		
MDMA-d ₅			199.3	15	7.7	MDMA-d5
MDEA	Funtion 3 SIR of 10 <i>m/z</i>	8.0–12.0	208.3	20	8.3	MBDB-d5
			163.2	20		
MBDB			208.3	20	8.7	MBDB-d5
			177.1	25		
MBDB-d ₅			213.3	15	8.7	
Benzoylecgonine			290.0	20	8.6	Benzoylecgonine-d3
			168.2	25		
Benzoylecgonine-d ₃			293.2	25	8.6	
Cocaine			304.2	20	9.5	Cocaine-d3
			182.1	30		
Cocaine-d ₃			307.1	25	9.5	

^a Quantifier ions are in bold characters.

deuterated IS. The other main parameters were: drying gas temperature 300 °C, source heater temperature 120 °C, nebulisation gas flow 500 l/h, cone gas flow 50 l/h and capillary voltage 3000 V.

Data acquisition peak integration and calculation were interfaced to a computer workstation running MassLynx NT 3.5 and QuanLynx 3.5 software.

2.6. Validation

The analytical validation was performed according the recommendations of Shah et al. [32] and Peters and Maurer [33].

The specificity of the method was evaluated by analysing plasma from 10 healthy non-drug-consuming subjects.

Linearity was obtained with an average determination coefficient (r^2) > 0.99 over a range from the lower limit of quantitation (LLOQ) up to the upper limit of quantitation (ULOQ). A weighting factor $1/x$ was used.

Within-day precision and accuracy were determined at four concentration levels (the LLOQ, the ULOQ and two intermediate levels) by preparing and analysing same day six replicates for each level. Between-day precision and accuracy were assessed by analysing on 5 different days a set of plasma samples spiked at 2, 5, 10, 25, 50, 125 and 250 ng/ml. Precision, expressed as

the coefficient of variation (CV) of the measured values, was expected to be less than 15% for all concentration levels, except for the LLOQ, for which 20% was acceptable. In the same way, accuracy was evaluated by using bias, measured as a percentage deviation from the accepted reference value, which had to be less than 15% for all concentration levels, except for the LLOQ, for which 20% was acceptable.

Lower limit of detection (LOD) was defined as the lowest concentration of the drug resulting in a signal-to-noise ratio of 3:1. LLOQ was defined as the lowest concentration yielding within-day and between-day CV and bias less than 20%.

Recoveries were determined in quintuplicate at two concentration levels (low and high) for each compound in plasma. For each concentration, five blank samples were fortified with the appropriate amount of each compound. These fortified samples and five blank samples were extracted as previously described. The dry extracts of the fortified samples were re-dissolved in 100 µl of the reconstitution solvent containing the IS, while the extracts of the blank samples were re-dissolved with 100 µl of the reconstitution solvent containing the respective nominal amounts of the compounds and the IS. The latter were used as neat standards.

The ion suppression effect on the ESI response was evaluated by using a post-column infusion system [34–36] for all

combined with the infused analyte and entered the electrospray interface.

Relative intensities of the detected ions were expressed as a percentage of the intensity of the quantifier ion (relative ion intensities = intensity of confirmation ion $\times$ 100/intensity of quantifier ion).

All the concentrations above the corresponding linearity ranges should be considered as “semiquantitative”, because the determination of such a high concentrations is not covered by the validated experiments. In our case, the plasma samples above the upper limit of quantitation (ULOQ) were diluted with drug-free plasma.

Carry-over effect was assayed by analyzing blank samples after a high positive sample (1000 ng/ml of each compound) and checking that in the blank samples the compounds were not detected.

3. Results and discussion

Deuterated analogues are commonly used as internal standards as they are essentially identical in chemical and chromatographic properties to the respective unlabelled compounds, whilst being readily distinguishable by mass spectrometry because of their mass differences. In our case MDMA-d₅, MBDB-d₅, benzoylecgonine-d₃ and cocaine-d₃ were chosen for this purpose. As expected, the deuterated substances eluted at the same time or a little earlier. In order to avoid cartridges clotting, samples were centrifuged before the extraction and the corresponding supernatant (0.2 ml) was diluted with a buffer (1 ml); in addition, the largest SPE cartridges were selected (3 cc instead of 1 cc cartridges).

The ion chromatograms of the 10 compounds are shown in Fig. 1. The retention times and the selected ions are reported in Table 1. Likewise, their respective optimised fragmentation voltages are shown in the same table.

Under chromatographic conditions used, there was no interference with the analytes by any extractable endogenous components of the plasma.

The linearity of the compound-to-IS peak area ratio versus the theoretical concentration was verified in plasma by using a $1/x$ weighted linear regression. The determination coefficients were above 0.99 and the curvature was tested on a set of five calibration curves. The within-day precision and accuracy, as well as the between-day precision and accuracy were satisfactory for all the tested concentrations. Recoveries obtained at 5 and 125 ng/ml for all compounds were >50%. These results and the relative ion intensities obtained are summarized in Tables 2–4.

The limit of detection (LOD) was 0.5 ng/ml for methamphetamine, MDMA, Benzoylecgonine and cocaine, and 1 ng/ml for morphine, 6-MAM, MDA, MDEA and MBDB. The LLOQ and ULOQ, which correspond to the lowest and highest concentration level of the calibration range, were 2 and 250 ng/ml for all the compounds.

The ion suppression effect, evaluated by the post column infusion system, was not detected in the region of interest for any compound or their deuterated analogues (Fig. 2).

Carry-over effect, tested in the previously described conditions, was not detected. Needle wash between injections was carried out with methanol.

The main advantage of using LC–MS versus GC–MS for the determination of these compounds is the non-use of derivatives, and so the whole procedure was simpler, faster and less expensive. Moreover, in the case of GC–MS methods, the simultaneous determinations of these drugs of abuse is very complex because different kinds of derivative agents have to be used for each group of compounds.

This method was applied to 156 road fatalities corresponding to 2004 and the first 6 months of 2005. Of this number,

Table 3
Calibration data, recovery, within-day precision and accuracy, between-day precision and accuracy and relative ion intensities for benzoylecgonine and cocaine

Compound	Concentration (ng/ml)	Recovery (%)	Within-day precision and accuracy (<i>n</i> = 6)			Between-day precision and accuracy (<i>n</i> = 5)			Relative ion intensities (<i>n</i> = 5)	
			Mean value	CV	Bias	Mean value	CV	Bias	Mean value	CV
Benzoylcegonine	2	99.7	2	7.2	−1.6	1.9	17.1	−7.4	45.5	4.6
	5					4.98	10.9	−0.5	63.1	21.3
	10		9.8	3.4	−2.2	10.5	5.9	5	68.2	19.4
	25	103.4				25.7	6.1	2.8	73.8	11.6
	50		53.1	6.7	6.2	51.1	7.5	2.1	70.8	15.6
	125					121.8	4.2	−2.6	73.5	8.1
	250		263.8	8.6	5.5	251.2	2.4	0.5	75.1	4.2
Calibration curve (<i>n</i> = 5): slope = 0.2256 ± 0.0928, intercept = 0.4062 ± 0.1525, <i>r</i> ² = 0.9985 ± 0.0012										
Cocaine	2	92.7	1.9	10.3	−5.7	2	13.9	0.9	59.5	23.1
	5					4.8	4.2	−3.6	52.7	3.7
	10		11	3	9.9	10.4	6.2	4.4	49.6	4.2
	25	83				24.7	9.5	−1.4	52.2	4.4
	50		52.3	5.5	4.6	51.3	4.4	2.5	52.3	8
	125					119.3	3.5	−4.6	51	2.8
	250		250.8	5.2	0.3	254.5	2.8	1.8	53.3	6.1
Calibration curve (<i>n</i> = 5): slope = 2.7447 ± 0.8394, intercept = −0.6488 ± 2.7220, <i>r</i> ² = 0.9978 ± 0.0019										

Table 4
Calibration data, recovery, within-day precision and accuracy, between-day precision and accuracy and relative ion intensities for amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA and MBDB

Compound	Concentration (ng/ml)	Recovery (%)	Within-day precision and accuracy (<i>n</i> = 6)			Between-day precision and accuracy (<i>n</i> = 5)			Relative ion intensities (<i>n</i> = 5)	
			Mean value	CV	Bias	Mean value	CV	Bias	Mean value	CV
Amphetamine	2	72.6	2.1	6.05	3.3	1.8	4.2	−9.7	118	14
	5					5	7.4	−1.1	125.8	9
	10		10.6	2.8	6.1	10.5	6.1	4.6	140.5	12.2
	25					26.5	7.9	5.9	142.9	0
	50	54.6	2.7	9.1	52.1	4.8	4.3	147.6	7.2	
	125	78.8				118.7	5.1	−5	147.6	7.2
	250		269.4	2.5	7.8	252.5	2.9	1	142.9	0
Calibration curve (<i>n</i> = 5): slope = 0.5927 ± 0.1173, intercept = 0.4665 ± 0.2377, <i>r</i> ² = 0.9975 ± 0.0033										
Metamphetamine	2	86	1.9	8.2	−5.3	1.9	8.1	−5.7	51.2	5.9
	5					4.9	6.7	−1.6	54.5	5.1
	10		10.5	4.9	5.3	10.6	4.3	5.8	56.4	6.5
	25					25.9	6.4	3.5	59.1	7.7
	50	53.8	3.1	7.7	50.7	4.3	1.5	61.2	6.9	
	125	92.3				118.5	6.2	5.2	61.8	2.7
	250		263.7	3.3	5.5	254.5	3.5	1.8	60.3	3.3
Calibration curve (<i>n</i> = 5): slope = 1.5822 ± 0.3101, intercept = 0.5984 ± 0.6689, <i>r</i> ² = 0.9966 ± 0.0021										
MDA	2	74.2	1.8	7.5	−10.3	1.7	4.5	−14.2	195	22.9
	5					4.8	7.3	−4.5	273.3	21.4
	10		10.9	5	9.1	10.5	4.5	5.1	273.3	21.4
	25					27.3	5.5	9.3	300	15.2
	50	53.9	4.1	7.8	53.3	4.7	6.6	283.3	16.1	
	125	69.8				124.9	2.7	−0.1	283.3	16.1
	250		247.2	5.1	−1.1	244.5	1.2	−2.2	290	21.5
Calibration curve (<i>n</i> = 5): slope = 0.2433 ± 0.0381, intercept = 0.5748 ± 0.2830, <i>r</i> ² = 0.9985 ± 0.0006										
MDMA	2	100	1.9	8.1	−5.3	1.8	4.8	−12.3	80.2	23.6
	5					4.9	5.6	−2.9	87	21.7
	10		10.5	6	4.6	11	2.6	9.5	85.3	26
	25					25.7	4.4	2.6	93.4	19.9
	50	53.9	3	7.7	53.3	2.3	6.6	83.4	26.6	
	125	78.3				120.2	4	−3.9	88.6	18.1
	250		266.9	2.4	6.8	250.3	2	0.1	92.2	13.3
Calibration curve (<i>n</i> = 5): slope = 0.9281 ± 0.0903, intercept = 0.7802 ± 0.5812, <i>r</i> ² = 0.9985 ± 0.0007										
MDEA	2	92.5	2	11.2	−2.3	1.8	11	−9.1	102.6	8.4
	5					4.9	6.44	−1.9	107.2	10.3
	10		10.5	4.5	5.3	10.7	5.7	6.6	113	15.6
	25					25.7	5.1	2.9	107.2	10.3
	50	53.4	4.3	6.8	52.4	3	4.9	107.2	10.3	
	125	83				120.5	2	−3.6	109.4	9.4
	250		266.1	2.6	6.4	251	1.4	0.4	111.7	7.9
Calibration curve (<i>n</i> = 5): slope = 0.9979 ± 0.0921, intercept = 0.6042 ± 0.1015, <i>r</i> ² = 0.9991 ± 0.0005										
MBDB	2	83.5	1.8	5.5	−12.4	1.8	8.1	−8.7	77.2	33.4
	5					4.8	6.5	−3.2	66.7	14.1
	10		11	2.5	9.7	10.9	3.3	8.6	60.2	18.7
	25					25.7	3.5	2.7	61.6	3
	50	53.7	2.2	7.4	52.4	3.5	4.8	61.8	7.5	
	125	69.7				118.3	2.3	−5.3	64.6	3.7
	250		256	2	2.4	253.1	0.8	1.2	64.7	6.9
Calibration curve (<i>n</i> = 5): slope = 0.6817 ± 0.0337, intercept = 0.2706 ± 0.1602, <i>r</i> ² = 0.9985 ± 0.001										

144 cases tested negative to opiates, amphetamines and cocaine, while 11 cases tested positive to cocaine (Fig. 3) and 1 case to amphetamine derivatives, which means 7.1 and 0.6%, respectively; 57 cases (36.5%) tested positive to alcohol. Table 5 shows the more important epidemiological parameters for the positive

cases for drugs. More data should be collected for a more conclusive statistic study. Also, it would be interesting to establish whether the subjects were chronic or occasional drug consumers, since the difference in tolerance to the drugs could have a diverse influence on driving performance.

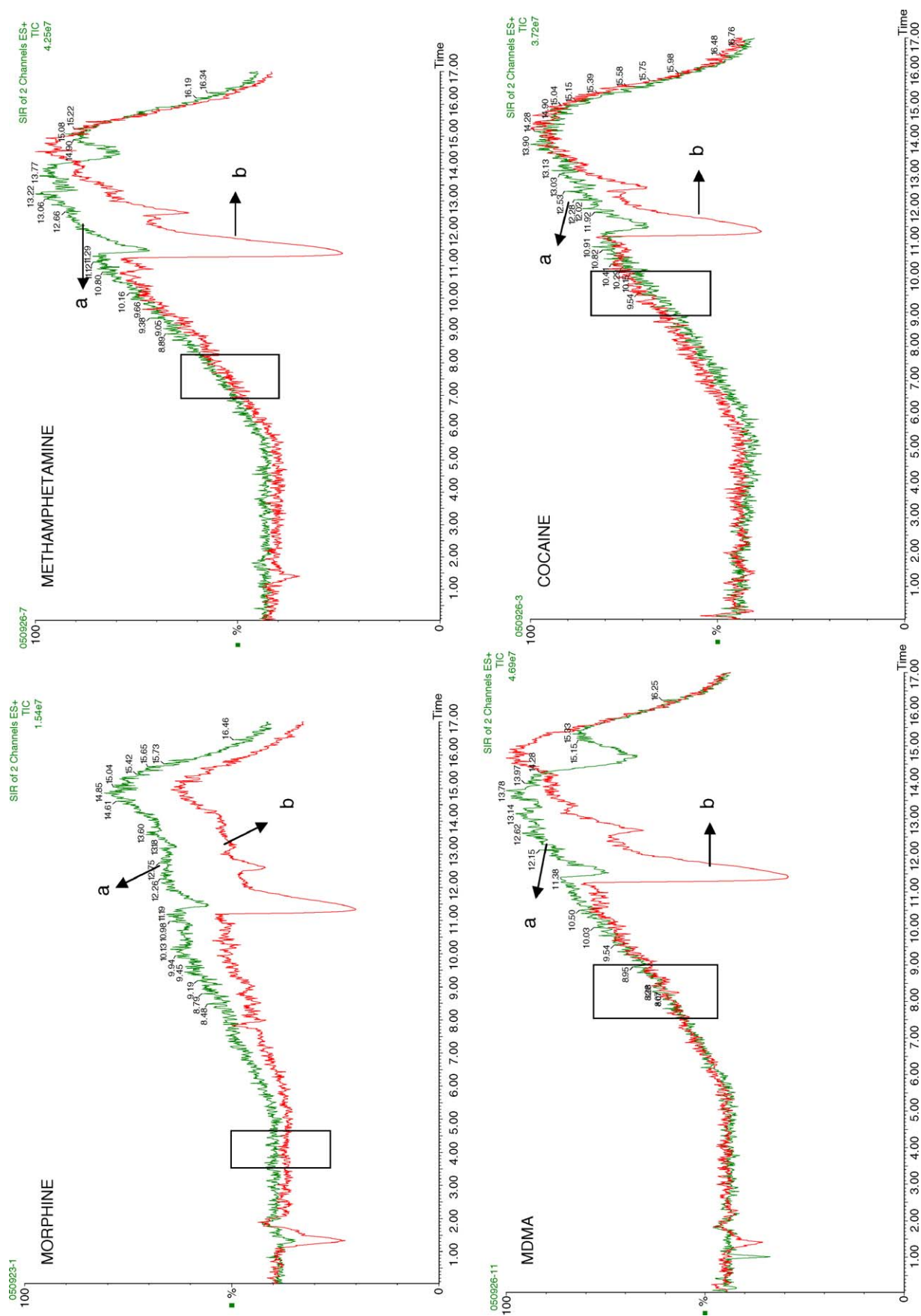


Fig. 2. Evaluation of the ion suppression effect on morphine, methamphetamine, MDMA and cocaine response by post-column infusion following a mobile phase injection (a) and an extracted blank sample (b). The dotted areas indicate the retention time for the corresponding compound.

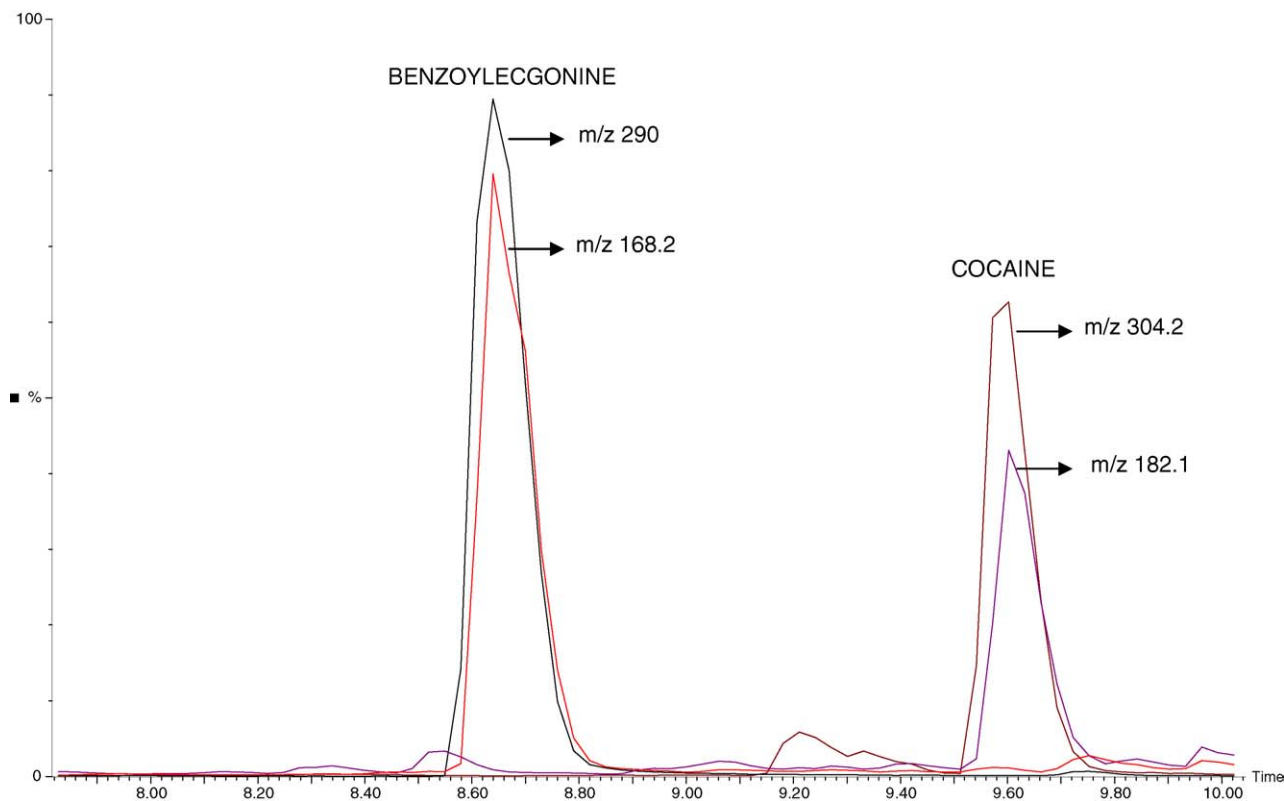


Fig. 3. LC–MS ion chromatograms of a real case from a decedent driver. The figure shows the quantifier and confirmation ion for benzoylecgonine (1041 ng/ml, semiquantitative result) and cocaine (109 ng/ml).

Table 5

Analytical results of the positive cases, indicating age, sex of the decedent, quantitative result of the corresponding drug and/or metabolite and alcohol in blood

Case (sex, age)	Drug and/or metabolite (ng/ml)	Alcohol (g/l)
1 (male, ? years)	Benzoylecgonine 47.3 ng/ml	0.2
2 (male, 19 years)	Benzoylecgonine 12.8 ng/ml	0
3 (male, 21 years)	Benzoylecgonine 38.7 ng/ml Cocaine 8.4 ng/ml	1.9
4 (male, 28 years)	Benzoylecgonine 36 ng/ml	1.7
5 (male, ? years)	Benzoylecgonine 680 ng/ml ^a	0
6 (female, 28 years)	Benzoylecgonine 391 ng/ml ^a	0
7 (male, 32 years)	Benzoylecgonine 15 ng/ml	3.2
8 (female, 26 years)	Benzoylecgonine 1600 ng/ml ^a	0
9 (male, 24 years)	Benzoylecgonine 1200 ng/ml ^a Cocaine 30 ng/ml	1.1
10 (male, 35 years)	Benzoylecgonine 1600 ng/ml ^a Cocaine 18 ng/ml	2.1
11 (male, 16 years)	Benzoylecgonine 1041 ng/ml ^a Cocaine 109 ng/ml	1
12 (male, 22 years)	Methamphetamine 6 ng/ml MDA 12.5 ng/ml	2.5

? years = unknown age.

^a Semiquantitative results.

4. Conclusion

A method was developed and validated for the determination of morphine, 6-MAM, amphetamine, methamphetamine,

MDA, MDMA, MDEA, MBDB, Benzoylecgonine and cocaine by LC–MS after solid phase extraction. Only 0.2 ml of plasma/blood was needed to do the analysis. The method was successfully applied to 156 road fatalities, providing important data for epidemiological studies of DUID.

Acknowledgements

This work was done thanks to financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (F.P.U. Grant number AP-2002-2935 and AP-2002-2878). Special thanks to Daniel González Aído, laboratory technician, for his invaluable help.

References

- [1] A. Verstaete, ROSITA: Roadside Testing Assessment. ROSITA Contract No. DGVII PL 98-3032, Ghent University, Ghent, Belgium, 2000, pp. 7–8.
- [2] M.R. Moeller, T. Kraemer, *Ther. Drug Monit.* 24 (2002) 210.
- [3] H.H. Maurer, *Comb. Chem. High Throughput Screen* 3 (2000) 461.
- [4] J.F. Van Bocxlaer, K.M. Clauwaert, W.E. Lambert, D.L. Deforce, E.G. Van de Eeckhout, A.P. de-Leenheer, *Mass Spectrom. Rev.* 19 (2000) 165.
- [5] P. Marquet, *Ther. Drug Monit.* 24 (2002) 225.
- [6] H.H. Maurer, *Clin. Chem. Lab. Med.* 42 (2004) 1310.
- [7] H.H. Maurer, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 110.
- [8] M.J. Bogusz, R.D. Maier, M. Erkens, S. Driessen, *J. Chromatogr. B* 703 (1997) 115.
- [9] A. Dienes-Nagy, L. Rivier, C. Giroud, M. Augsburger, P. Mangin, *J. Chromatogr. A* 854 (1999) 109.

- [10] M.H. Slawson, D.J. Crouch, D.M. Andrenyak, D.E. Rollins, J.K. Lu, J. Anal. Toxicol. 23 (1999) 468.
- [11] W. Naidong, J.W. Lee, X. Jiang, M. Wehling, J.D. Hulse, P.P. Lin, J. Chromatogr. B 735 (1999) 255.
- [12] W.Z. Shou, M. Pelzer, T. Addison, X. Jiang, W. Naidong, J. Pharm. Biomed. Anal. 27 (2002) 143.
- [13] D. Projean, T. Minh, J. Ducharme, J. Chromatogr. B 787 (2003) 243.
- [14] S.R. Edwards, M.T. Somith, J. Chromatogr. B 814 (2005) 241.
- [15] J. Bengtsson, B. Jansson, M. Hammarlund-Udenaes, Rapid Commun. Mass Spectrom. 19 (2005) 2116.
- [16] S.N. Lin, D.E. Moody, G.E. Bigelow, R.L. Foltz, J. Anal. Toxicol. 25 (2001) 497.
- [17] P.M. Jeanville, J.H. Woods, T.J. Baird, E.S. Estape, J. Pharm. Biomed. Anal. 23 (2000) 897.
- [18] K. Srinivasan, P.P. Wang, A.T. Eley, C.A. White, M.G. Bartlett, J. Chromatogr. B 745 (2000) 287.
- [19] A. Klingmann, G. Skopp, R. Aderjam, J. Anal. Toxicol. 25 (2001) 425.
- [20] M.J. Bogusz, K.D. Krüger, R.D. Maier, J. Anal. Toxicol. 24 (2000) 77.
- [21] K.A. Mortier, R. Dams, W.E. Lambert, E.A. De Letter, S.V. Calenbergh, A.P. De Leenheer, Rapid Commun. Mass Spectrom. 16 (2002) 865.
- [22] M. Wood, G. De Boeck, N. Samyn, M. Morris, D.P. Cooper, R.A. Maes, E.A. De Bruijn, J. Anal. Toxicol. 27 (2003) 78.
- [23] H.P. Hendrickson, A. Milesi-Hallé, E.M. Laurenzana, S.M. Owens, J. Chromatogr. B 806 (2004) 81.
- [24] B. Maralikova, W. Weinmann, J. Chromatogr. B 811 (2004) 21.
- [25] E.J. Rook, M.J. Hillebrand, H. Rosing, J.M. Van Ree, J.H. Beijnen, J. Chromatogr. B 824 (2005) 213.
- [26] A. Cailleux, A. Le Bouil, B. Auger, G. Bonsergent, A. Turcant, P. Allain, J. Anal. Toxicol. 23 (1999) 620.
- [27] M.J. Bogusz, R.D. Maier, K.D. Krüger, V. Kohls, J. Anal. Toxicol. 22 (1998) 549.
- [28] K.A. Mortier, K.E. Maudens, W.E. Lambert, K.M. Clauwaert, J.F. Van Bocxlaer, D.L. Deforce, C.H. Van Peteghem, A.P. De Leenhaer, J. Chromatogr. B 779 (2002) 321.
- [29] M. Wood, M. Laloup, M.M. Ramirez Fernández, K.M. Jenkins, M.S. Young, J.G. Ramaekers, G. De Boeck, N. Samyn, Forensic Sci. Int. 150 (2005) 227.
- [30] K.M. Jenkins, M.S. Young, M. Wood, 52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville, May 30–June 3, <http://www.asms.org/>.
- [31] Y. Zhang, L. Chen, G. Liu, C. Yu, V.C.X. Gao, 52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville, May 30–June 3, www.asms.org.
- [32] V.P. Shah, K.K. Mida, J.W.A. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonnelli, C.T. Viswanattan, A. Jacobi, Pharm. Res. 17 (2002) 441.
- [33] F.T. Peters, H.H. Maurer, Accred. Qual. Assur. 7 (2002) 441.
- [34] R. Bonfiglio, R.C. King, T.V. Olah, K. Merkle, Rapid Commun. Mass Spectrom. 13 (1999) 1175.
- [35] Y. Hiseh, M. Chintala, H. Mei, J. Agans, J.M. Ng, K. Brisson, Rapid Commun. Mass Spectrom. 15 (2001) 2481.
- [36] C. Müller, P. Schäfer, M. Störtzel, S. Vogt, W. Weimann, J. Chromatogr. B 773 (2002) 47.

A sensitive, rapid and specific determination of midazolam in human plasma and saliva by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry

Oscar Quintela, Angelines Cruz, Marta Concheiro, Ana de Castro and Manuel López-Rivadulla*

Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Received 18 August 2004; Revised 8 October 2004; Accepted 8 October 2004

A rapid, sensitive and selective liquid chromatography/electrospray mass spectrometry (LC/ES-MS) method was developed for the quantitative determination of the anaesthetic benzodiazepine midazolam (MID) in human saliva and plasma from patients undergoing anesthesia procedures. Biological samples spiked with diazepam-*d*₅, the internal standard, were extracted into diethyl ether. Compounds were separated on a Xterra[®] RP₁₈ column using a mobile phase of acetonitrile/formic acid 0.1% at a flow rate of 0.25 mL/min under a linear gradient. Column effluents were analyzed using MS with an ES source in the positive ionization mode. Calibration curves were linear in the concentration ranges of 1–250 and 0.2–25 ng/mL in plasma and saliva, respectively. The limits of detection were 0.5 ng/mL in plasma and 0.1 ng/mL in saliva, using a 0.5-mL sample volume. The recoveries of the spiked samples were above 65%. The method was applied to ten real samples from patients undergoing midazolam treatment. Copyright © 2004 John Wiley & Sons, Ltd.

Midazolam, 8-chloro-6-(2-fluorophenyl)-1-methyl-4*H*-imidazo[1,5-*a*][1,4]benzodiazepine, is a short-acting benzodiazepine that is used clinically for sedative purposes prior to minor medical procedures and surgery.¹ In humans, it has been widely used for cardiac surgery in combination with opioids and for sedation of mechanically ventilated patients, in intensive care units. Oral midazolam is commonly used for procedural sedation in children, despite the lack of a product license for the oral route of administration and a low bioavailability.^{2,3}

The standard for drug testing in toxicology is an immunoassay screen conducted on a urine sample, followed by confirmation by gas chromatography with mass spectrometric (GC/MS) detection.⁴ In recent years, remarkable advances in sensitive analytical techniques have enabled the analysis of drugs in unconventional biological specimens such as saliva. Whole saliva (or oral fluid (OF)) is readily collected, by non-invasive procedures, and contains serum constituents derived from the local vasculature of the salivary glands and also from the oral cavity via the flow of gingival fluid.⁵ The levels of substances to be detected in saliva tend to be rather lower than those of the drug metabolites in urine;

thus analysis of OF is a more sensitive process. Saliva also gives a different time course of drug detection, and substances tend to be detectable in saliva for shorter periods than in urine, typically for 12–24 h after consumption.⁶ The greatest advantage of analyzing OF is that staff can directly observe patients when they produce samples, usually by placing a collection tube or device in their mouth. This assures staff that the sample comes from the patient and the procedure is compatible with respecting patients' dignity. As a diagnostic fluid, saliva also offers distinctive advantages over serum because it can be collected non-invasively by individuals with modest training. Furthermore, saliva may provide a cost-effective approach for the screening of large populations. A disadvantage of studying OF is that people are sometimes unable to produce sufficient amounts of fluid for analysis.

The published techniques for the analysis of midazolam have mainly involved high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection,^{7–10} GC with electron capture or nitrogen-phosphorus detection,^{11–13} or even GC/MS using electron ionization or negative ion chemical ionization techniques.^{14,15} The existing HPLC-UV techniques have generally shown higher limits of detection (LODs) than GC techniques. On the other hand, liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) or capillary zone electrophoresis/tandem mass spectrometry (CZE/MS/MS) techniques still require expensive instruments that are not available in most clinical and toxicological laboratories. Nevertheless, in recent years, LC/MS has rapidly matured

*Correspondence to: M. López-Rivadulla, Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain.

E-mail: apimlrv@usc.es

Contract/grant sponsor: Secretaria Xeral de Investigación e Desenvolvemento, Xunta de Galicia, Galicia, Spain; contract/grant number: PGIDT04PXIB20801PR.

Contract/grant sponsor: EU ROSITA Project.

to become a very powerful and useful analytical tool that is widely applied in many areas of chemistry, pharmaceutical sciences and biochemistry.¹⁶ In fact benchtop single-quadrupole LC/electrospray (ES) MS devices are now affordable and widely available in analytical laboratories.

The aim of the present study was to design a sensitive, specific and fully validated method using LC/ES-MS for the determination of midazolam in human plasma and saliva. This method was intended to be applied to routine therapeutic drug monitoring of patients receiving midazolam for conscious sedation purposes, or to confirm the check on site. The method was designed to permit (in the near future) the simultaneous analysis of the most commonly prescribed benzodiazepines (BDZs) with the same analytical conditions. At the moment the method is being used for the quantitation of midazolam in fluid oral samples originating from drivers who tested positive for BDZs in the European Road Site Testing Assessment (ROSITA) project, in which our group is involved, together with other European and American laboratories.

EXPERIMENTAL

Chemicals

Midazolam (MID) was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and diazepam-*d*₅ (internal standard, IS) was obtained from Cerillant[®] (Barcelona, Spain). Formic acid (99% pure) was obtained from Merck (Barcelona, Spain). Chromasolv[®] grade acetonitrile (99.98% pure) was from Riedel de Haën Sigma-Aldrich Chemie (Schnellendorf, Germany). Diethyl ether of HPLC quality was from Scharlau Multisolvant (Sentmenat, Spain). All other chemicals and solvents were of analytical grade or better. Purified water was obtained in the laboratory using a Milli-Q water system (Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland). Drug-free heparinized human plasma was obtained from the local blood bank. Drug-free oral fluid was obtained from healthy volunteers using Salivette[®] (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) devices.

A 0.1 M ammonium carbonate buffer (pH 9.30) was prepared by adding a 1 M ammonium hydroxide solution to 900 mL of ammonium carbonate solution (9.6 g/L) to pH 9.3 (determined using a pH meter) and making up the solution to 1000 mL with ammonium carbonate.

A pH 9.50 borate buffer was prepared by mixing 6.2 g of H₃BO₃ and 7.5 g of KCl with 420 mL of a solution of 0.1 M sodium hydroxide, and adding water to a volume of 1000 mL.

Preparation of stock solutions and standards

Stock solutions of MID and the IS were prepared at 1 g/L in methanol and were kept at -20°C in the dark for a maximum of 6 months. Each day, working solutions containing MID at 0.02, 0.1, 0.5 and 2.5 mg/L for plasma and 0.002, 0.005, 0.01, 0.1 and 0.25 mg/L for saliva were prepared by appropriate dilution with Milli-Q water. The working solutions of the IS at 1 mg/L (for plasma) and 0.4 mg/L (for saliva) were prepared by appropriate dilution with methanol.

Sample preparation

To 0.5 mL of plasma were added 50 µL of a 1 mg/L IS solution, 0.5 mL of the pH 9.50 borate buffer and 8 mL of the

extraction solvent (diethyl ether), in a 10-mL borosilicate tube. The tubes were shaken for 15 min and then centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The organic phase (7.2–7.8 mL) was transferred to a 10-mL borosilicate tube and evaporated to dryness at 45°C under a gentle stream of nitrogen. The dry extract was redissolved in 100 µL of a mixture of formic acid 0.1%/acetonitrile (90:10, v/v). The samples were transferred into autosampler vials, and 15 µL were injected into the LC/MS system.

In the case of saliva samples, the process was quite different. To 0.5 mL of saliva were added 50 µL of a 0.4 mg/L IS solution, 0.5 mL of the 0.1 M ammonium carbonate buffer, pH 9.30, and 6 mL of the extraction solvent (diethyl ether), in a 10-mL borosilicate tube. The tubes were shaken for 15 min and then centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The organic phase (5.2–5.8 mL) was transferred to a 10-mL borosilicate tube and evaporated to dryness at 45°C under a gentle stream of nitrogen. The dry extract was redissolved in 50 µL of a mixture of formic acid 0.1%/acetonitrile (93:7, v/v), of which 15 µL were injected into the chromatographic system.

Two sets of calibration standards, one for plasma at 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 125 and 250 ng/mL, and one for saliva at 0.2, 0.5, 1, 2, 10 and 25 ng/mL of MID, were prepared with each series, by spiking blank plasma and saliva samples with the appropriate working solutions.

Liquid chromatography/mass spectrometry

The HPLC system was a Waters Alliance 2795 (Waters, Watford, UK) separation module. Chromatographic separations were performed with an Xterra[®] RP₁₈, 5 µm (150 × 2.1 mm i.d.) reversed-phase column (Waters, Milford, MA, USA). The mobile phase, delivered at a flow rate of 0.25 mL/min at room temperature, was a gradient of acetonitrile in 0.1% formic acid programmed as follows: for plasma, 10% acetonitrile during 1.5 min, increased to 72% in 14 min and decreased to 10%, i.e., original conditions, in 1 min; and, for saliva, 7% acetonitrile during 2 min, increased to 72% in 12.5 min and decreased to 7%, i.e., original conditions, in 0.5 min.

The detection was performed using a Micromass ZMD 2000 mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) fitted with a Z-spray ion interface. Ionization was achieved using electrospray in the positive ionization mode (ESI+). Nitrogen was used as nebulization and desolvation gas. To optimize ionization and ion transmission conditions of MID and the IS, 15 µL of a 10 µg/mL solution of each compound in the mobile phase were injected without HPLC separation into the ion source. In order to obtain the highest possible abundance for the quantitation and confirmation of ions, the fragmentation energy ('cone voltage') was optimized. During this experiment, a mass range from *m/z* 100–400 was monitored. Acquisition was made in the selected ion monitoring mode of positive ions, with a dwell time of 0.15 s. For the quantitation of MID the protonated molecule [M+H]⁺ was selected as the quantitation ion and one main fragment was selected as confirmation ion. Table 1 summarizes the conditions for the measurement of MID and the deuterated IS. The other main parameter settings were: drying gas temperature 300°C, source heater temperature 115°C, nebulization gas flow 550 L/h, cone gas flow 100 L/h, and capillary voltage 3000 V.

Table 1. Chromatographic retention times and selected ions of midazolam and diazepam-*d*₅ (IS)

Compound	Retention time (min)		Selected ions (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)
	Plasma	Saliva		
Midazolam	9.2	10.3	326.1	30
			291.3	60
Diazepam- <i>d</i> ₅	13.2	14.3	290.3	40

Quantitation ions are in bold characters.

Data acquisition, peak integration and calculation were interfaced to a computer workstation running MassLynx NT 3.5 and QuanLynx 3.5 software.

Validation

The analytical validation was performed according the guiding principles of the FDA.¹⁷ Recoveries were determined in quintuplicate at concentrations of 5 and 125 ng/mL of MID in plasma, and 2 and 25 ng/mL of MID in saliva. For each concentration, five blank samples were fortified with MID and the IS and five others with the IS only. They were extracted as previously described. The dry extracts of the fortified samples were redissolved in 50 µL of reconstitution solvent, while the extracts of the blank samples were redissolved in 50 µL of reconstitution solvent containing the respective nominal amounts of midazolam. The latter were used as neat standards.

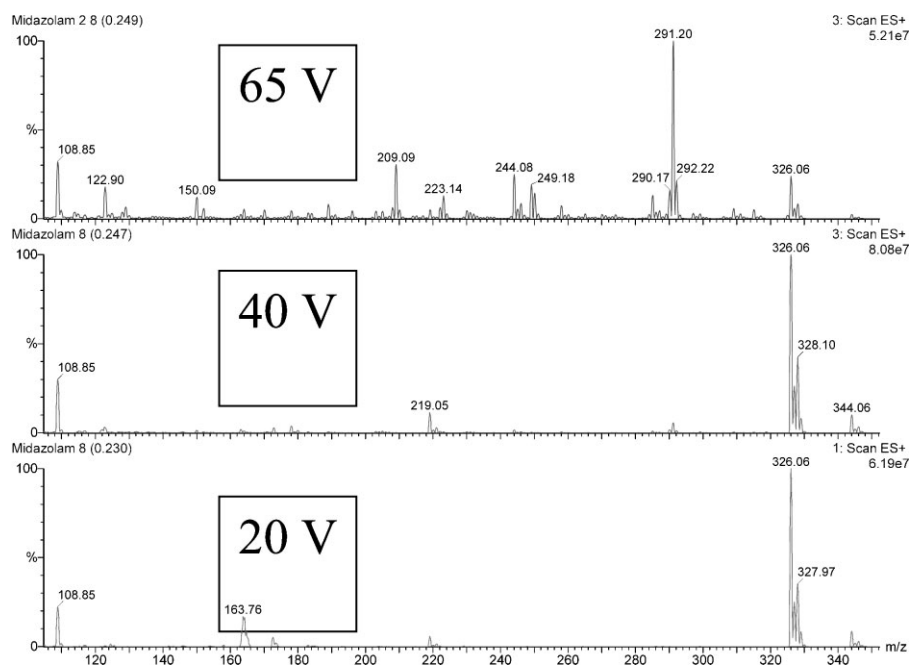
In addition the recovery from the cotton-roll of Salivette[®] was performed in a similar way at 1 and 25 ng/mL of MID in saliva. For each concentration, ten blank saliva samples were fortified with MID and the IS. Five samples of each concentration were absorbed with Salivette[®] devices, centrifuged and then extracted as previously described. The other five, directly extracted, were used as neat standards.

Within-day precision and accuracy were determined at three concentrations, the lower limit of quantitation (LLOQ),

the upper limit of quantitation (ULOQ) and an intermediate level, by preparing and analyzing on the same day six replicates for each level. Between-day precision and accuracy, as well as linearity and the lower limit of quantitation (LLOQ), were assessed by analyzing each day for six days a set of plasma samples spiked at 1, 2, 5, 10, 20, 50, 125 and 250 ng/mL and saliva samples at 0.2, 0.5, 1, 2, 10 and 25 ng/mL. Precision, expressed as the coefficient of variation (CV) of the measured values, was expected to be less than 15% at all concentrations, except for the LLOQ for which 20% was acceptable. In the same way, accuracy was evaluated using the mean relative error (MRE), which had to be less than 15% of theoretical values at each concentration level except for the LLOQ, for which 20% was acceptable. Therefore, LLOQ was defined as the lowest concentration yielding between-day precision CV and MRE each of less than 20%.

The validation of a partial or increased sample volume was carried out by diluting 1/5 additional quality controls (QCs) with a concentration five times above the ULOQ in plasma and saliva (1250 and 250 ng/mL, respectively). Five replicates of each control sample were analyzed together with a calibration curve, after appropriate dilution of the samples, with blank plasma or saliva, to the validated concentration range. The calculated concentrations of diluted QCs, when multiplied by their respective dilution factors, must fall within the defined precision and accuracy criteria for that QC.¹⁸

The specificity of the method was evaluated by analyzing plasma and saliva samples from ten healthy non-drug (BDZs and other drugs) consuming subjects. The matrix effect on the ESI response was evaluated by using a post-column infusion system.^{19–21} Mobile phase was delivered into the ESI interface at a rate of 250 mL/min while analyte was being infused, post-column, through a Valco zero dead volume tee using a Harvard Apparatus model 11 (South Natick, MA, USA) syringe pump. Five plasma and saliva samples without MID or IS were extracted as previously described, reconstituted

**Figure 1.** Full-scan spectra of midazolam.

with mobile phase, and 15 μ L of each plasma extract were injected onto the Xterra column. Effluent from the HPLC column combined with the infused analytes and entered the ESI interface.

The method was applied to real samples from patients undergoing midazolam (MID) treatment as follows: (a) In five mechanically ventilated patients different MID doses were administered by continuous intravenous infusion, and saliva and blood samples were drawn (from an antecubital vein) during the infusion and at different times after the end of it. (b) To the other five patients a single bolus dose of 2 mg of MID was administered and blood and saliva samples were drawn at different time intervals (10, 30 and 50 min or 20, 40 and 60 min).

RESULTS AND DISCUSSION

Internal standards are desirable when an analysis is performed by mass spectrometry. Deuterated analogues are commonly used as internal standards as they are essentially identical in chemical and chromatographic properties to the respective unlabelled compounds while being readily distinguishable by mass spectrometry because of their mass difference. In this case diazepam- d_5 was chosen for this purpose.

A gradient of acetonitrile was used because the method was designed to be used in the future as a BDZ screening method; nevertheless, at the moment, the method has only been validated for midazolam. The full-scan mass spectrum of MID is presented in Fig. 1. The ions selected and their respective optimized fragmentation ('cone') voltages are reported in Table 1.

Owing to the selectivity of MS, a simple, single-step liquid-liquid extraction could be used, which was revealed to be efficient in terms of purification. Plasma or saliva extracts did not show interfering peaks from endogenous substances and extraction recovery for MID was adequate (Figs. 2(a) and 2(b) and Tables 2 and 3).

The limit of detection (LOD), defined as the lowest tested concentration yielding a signal-to-noise ratio higher than 3, was 0.5 ng/mL in plasma and 0.1 ng/mL in saliva, using a 0.5-mL sample volume.

The within-day precision, as well as the between-day precision and accuracy, were satisfactory under all the concentrations tested (Tables 2 and 3). The LOQ for midazolam deduced from between-day precision and accuracy was 1 ng/mL in plasma and 0.2 ng/mL in saliva. The linearity of the compound-to-IS peak area ratio versus the theoretical concentration was verified from this LOQ up to 250 and 25 ng/mL in plasma and saliva, respectively, using a $1/x$ weighted linear regression. The correlation coefficients were typically better than 0.99 and the curvature, tested by analysis of variance on a set of six calibration curves, was not significant. Previously published GC/MS or LC/MS procedures have yielded lower LODs and LOQs than the present technique,²² but our method uses a smaller volume of sample (only 0.5 mL) and is more sensitive than most of the HPLC or GC techniques published so far, the LODs of which are generally higher than 1 ng/mL,^{7-9,11,12} and even more sensitive than some LC/ES-MS/MS techniques previously described.²³ In addition, the procedure is also adequate and

very sensitive to saliva samples with a LOQ of only 0.2 ng/mL, by also using 0.5 mL of sample.

As an alternative to the extension of the calibration curve for the measurement of concentrations which are above the highest calibration standard, the sample can be re-analyzed after dilution with blank matrix.^{18,24} The validation of this procedure showed the following results: the 1/5 dilution of a plasma concentration of 1250 ng/mL yielded a result of 240.38 ng/mL (CV = 10.88%), while a 1/5 dilution of a saliva concentration of 250 ng/mL yielded a result of 25.95 ng/mL (CV = 1.02%). These fall within the defined precision and accuracy criteria.

Ion suppression is caused when a chemical present in the sample or in the chromatography run prevents the analyte of interest from being ionized, and therefore reduces or eliminates its signal.²⁵⁻²⁷ The evaluation of this matrix effect by the post-column infusion system has the advantage of locating the region in the chromatogram influenced by matrix

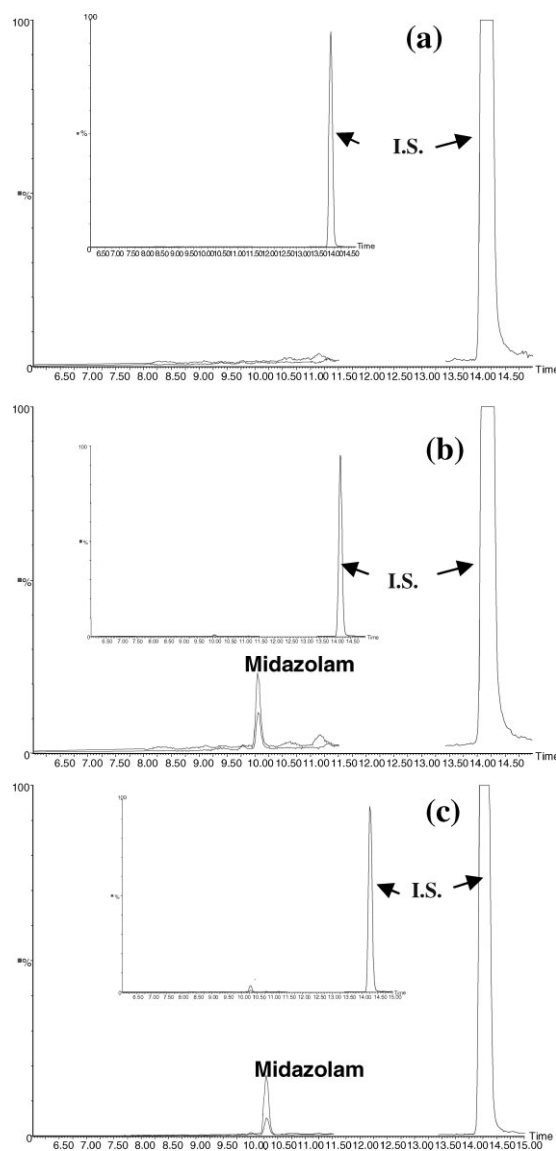


Figure 2. Selected ion chromatograms of (a) an extract of a blank saliva sample, (b) an extract of a saliva sample spiked at 0.5 ng/mL with midazolam, and (c) an extract of a real saliva sample (measured concentration, 2.6 ng/mL).

Table 2. Validation results of the LC/MS determination of midazolam in plasma

Concentration (ng/mL)	Recovery (%) (n = 5)	Within-day study (n = 6)			Between-day study (n = 6)	
		Precision CV (%)	Mean relative error (%)	Mean conc. found (ng/mL)	Precision CV (%)	Mean relative error (%)
1	72.37	2.34	−0.83	0.95	13.72	−5.00
2				1.87	8.85	−6.33
5				4.85	11.04	−3.00
10				10.2	5.87	0.18
25				26.82	6.05	7.29
50	73.58	3.43	8.23	53.45	3.26	6.89
125				130.14	3.82	4.11
250				239.91	2.79	−4.04
Calibration curve						
Slope	0.0049 ± 0.001					
Intercept	0.0017 ± 0.001					
Correlation	0.995 ± 0.003					

Table 3. Validation results of the LC/MS determination of midazolam in saliva

Concentration (ng/mL)	Recovery (%) (n = 5)	Within-day study (n = 6)			Between-day study (n = 6)	
		Precision CV (%)	Mean relative error (%)	Mean conc. found (ng/mL)	Precision CV (%)	Mean relative error (%)
0.2	68.30	13.36	3.33	0.19	12.53	3.33
0.5				0.49	7.19	1.43
1				1.06	9.68	6.14
2				2.06	5.43	3.21
10	69.94	5.23	6.62	9.91	7.02	0.86
25				25.01	2.93	0.03
Calibration curve						
Slope		0.0143 ± 0.002				
Intercept		0.0021 ± 0.001				
Correlation		0.998 ± 0.001				

effects on the analyte. In this case no suppressive effect was detected in the region of interest.

The use of oral fluid as a non-invasive specimen alternative to blood as an indicator of recent drug use is particularly indicated in countries where the legislation restricts blood collection, like Spain. Nevertheless, a major problem of this type of sample collection is the difficulty in obtaining constant, or even enough volume of sample, especially in non-collaborating patients. In our study, using the Salivette[®] device, it was only possible to draw the adequate volume of saliva (≥0.5 mL) in less than 50% of cases (Tables 4 and 5); in 27% of cases no saliva sample was available and in 24% of cases the sample volume was not enough, so dilution with blank saliva was required. Blood samples are easier to obtain in unconscious or non-collaborating patients, and the volume can be easily checked while the sample is drawn. Another problem with saliva is the way used to obtain the sample. Basically, saliva can be collected by spitting, which is disagreeable for the subject, or by using a commercial device like the Salivette[®] used in this study. This latter technique is well accepted by patients but can decisively affect the results. In our study the recovery of midazolam from the cotton-roll of Salivette[®] was only 52.2 and 54.9% at 1 and 25 ng/mL, respectively. This means that more than 50% of the drug present in saliva remained in the cotton, which represents

another difficulty in the interpretation of saliva results: It is very risky to establish a relationship between plasma/saliva concentrations, and the real LOQ of the analytical method does not actually correspond with the LOQ in real saliva

Table 4. Concentrations of midazolam found in plasma and saliva after continuous infusion of the drug

Case number	Perfusion dose rate (mg/h)	Time after suspensión (h)	Plasma conc. (ng/mL)	Saliva conc. (ng/mL)
1	10		712.0	*
		48	70.94	*
		54	49.84	*
2	15		638.2	29.09
		50	25.81	<0.2
		74	18.45	0
		98	0	0
3	20	6	500.04	39.14
4	25		471.4	31.06
			154.0	19.87
5	20	24	10.82	0.35
			856.8	32.0
			618.8	7.45
		24	0	0
		48	0	0

* No sample available.

Table 5. Concentrations of midazolam found in plasma and saliva after the administration of a single 2 mg bolus of the drug

Case number	Bolus dose (mg)	Concentration (ng/mL)	Sample extraction time (min)		
			10	30	50
6	2	Plasma	197.87	54.29	43.36
		Saliva	13.98 [#]	2.56 [#]	1.04
7	2	Plasma	282.9	140.6	51.8
		Saliva	*	*	*
			Sample extraction time (min)		
			20	40	60
8	2	Plasma	1101.74	156.7	28.19
		Saliva	1.98 [#]	0.57	0.57
9	2	Plasma	50.64	25.48	30.2
		Saliva	0.79 [#]	1.42 [#]	0.22 [#]
10	2	Plasma	308.87	26.29	15.04
		Saliva	1.73 [#]	2.16 [#]	*

* No sample available.

[#] Not enough volume of sample (<0.5 mL).

samples. Further studies to evaluate the usefulness of such specimens should involve pharmacological research to determine the expected concentrations, because, at the moment, the results are still controversial. In any case the proposed analytical procedure is sensitive enough as to detect very low saliva concentrations, which permit the diagnosis of recent consumption of midazolam. Figures 2(a) and 2(b) show the chromatograms of a blank saliva and a 0.5 ng/mL of midazolam saliva sample.

The procedure described herein was applied to 57 real samples, 33 plasma samples and 24 saliva samples, from patients undergoing midazolam for sedation purposes. To one series of patients (cases 1–5) the drug was administered at high doses by continuous infusion, and blood and saliva samples were drawn at different times (Table 4). To the other series of patients (cases 6–10) a single dose of 2 mg of midazolam was administered, and saliva and blood samples were taken at shorter periods of time (Table 5). The times of sampling were variable because of the difficulty of obtaining biological samples in critical patients. As can be seen, in an important number of cases the saliva sample was inadequate. Finally, the concentrations in saliva are very variable, and in our study it was impossible to obtain a fixed relationship with plasma concentrations. Figure 2(c) shows the chromatograms of a real case of saliva extract corresponding to a concentration of 2.6 ng/mL.

CONCLUSIONS

In summary, we have developed a simple and rapid method for midazolam (MID) quantitation in plasma and oral fluid by using LC/MS. The procedure, which involves a very simple one-step liquid–liquid extraction method, is sensitive and specific enough as to detect 0.1 and 0.5 ng/mL of MID in saliva and plasma, respectively, using only 0.5 mL of sample. It has been completely validated, including the dilution and the ion suppression effects, showing excellent results for all the parameters studied. The method was applied to real samples from patients receiving MID for sedation purposes, in order to obtain some pharmacokinetic data. Finally, it has

been validated to other common BDZs, such as diazepam, lorazepam, alprazolam, etc., by using the same chromatographic conditions. This will allow the use of this method as a screening method for BDZs. At the moment it is also being used to confirm results in the oral fluid samples originating from drivers who tested positive for BDZs in the ROSITA European Project, in which our laboratory is involved.

Acknowledgements

This work was sponsored by the Secretaria Xeral de Investigación e Desenvolvemento, Xunta de Galicia, Galicia, Spain (grant number PGIDT04PXIB20801PR) and by the EU ROSITA project. The authors are grateful to Dr. Santiago Nogue from the Hospital Clinic of Barcelona (Spain) and Dr. Taboada from the Hospital Clínico of Santiago de Compostela (Spain) for collecting blood and saliva samples.

REFERENCES

- Nordt SP, Clark RF. *J. Emerg. Med.* 1997; **15**: 357.
- Malinovsky JM, Populaire C, Cozian A, Lepage J-Y, Lejus C. *Anaesthesia* 1995; **50**: 351.
- Marshall J, Rodarte A, Blumer J, Khoo KC, Akbari B, Kearns G. *J. Clin. Pharmacol.* 2000; **40**: 578.
- Kintz P, Samyn N. *Ther. Drug Monit.* 2002; **24**: 239.
- Kaufman E, Lämster IB. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2002; **13**: 197.
- Cone EJ. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1993; **694**: 91.
- Lehmann B, Boulieu R. *J. Chromatogr. B* 1995; **674**: 138.
- Lee TC, Charles B. *Biomed. Chromatogr.* 1996; **10**: 65.
- Carrillo JA, Ramos SI, Agundez JAG, Martinez C, Benitez J. *Ther. Drug Monit.* 1998; **20**: 319.
- Eeckhoudt SL, Desager JP, Horsmans Y, De Winne AJ, Verbeeck RK. *J. Chromatogr. B* 1998; **710**: 165.
- De Kroon IFI, Langendijk PNJ, De Goede PNFC. *J. Chromatogr.* 1989; **491**: 107.
- Fisher LE, Perch S, Bonfiglio MF, Geers SM. *J. Chromatogr. B* 1995; **665**: 217.
- Vasiliades J, Sahawneh T. *J. Chromatogr.* 1982; **228**: 195.
- Vasiliades J. *J. Chromatogr.* 1981; **225**: 266.
- Martens J, Banditt P. *J. Chromatogr. B* 1997; **692**: 95.
- Niessen WM. *J. Chromatogr. A* 2003; **1000**: 413.
- US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services: Beltsville, MD, 2001.

18. Dadgar D, Burnett PE, Choc MG, Gallicano K, Hooper JW. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1995; **13**: 89.
19. Bonfiglio R, King RC, Olah TV, Merkle K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999; **13**: 1175.
20. Muller C, Schafer P, Stortzel M, Vogt S, Weinmann W. *J. Chromatogr. B* 2002; **773**: 47.
21. Hsieh Y, Chintala M, Mei H, Agans J, Brisson J-M, Ng K, *et al.* *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001; **15**: 2481.
22. Marquet P, Baudin O, Gaulier JM, Lacassie E, Dupuy JL, François B, Lachâtre G. *J. Chromatogr. B* 1999; **734**: 137.
23. Lausecker B, Hopfgartner G, Hesse M. *J. Chromatogr. B* 1998; **718**: 1.
24. Buick AR, Doig MV, Jeal SC, Land GS, McDowall RD. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1990; **8**: 629.
25. Hsieh Y, Chintala M, Mei H, Agans J, Brisson JM, Ng K, Korfmacher WA. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001; **15**: 2481.
26. Shou WZ, Naidong W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; **17**: 589.
27. Schuhmacher J, Zimmer D, Tesche F, Pickard V. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; **17**: 1950.

Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología

Quintela O., Cruz A., Concheiro M., De Castro A. y López-Rivadulla M.

Instituto de Medicina Legal de Santiago de Compostela. Servicio de Toxicología Forense.
Facultad de Medicina. C/ San Francisco, s/n. C.P. 15873, Santiago de Compostela (A Coruña)

Recibido 16 de Agosto de 2004 / Aceptado 15 de Septiembre de 2004

Resumen: En los últimos años el aumento de publicaciones de aplicaciones de la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) en numerosos campos analíticos, incluyendo la toxicología y las ciencias forenses, ha sido verdaderamente espectacular. Este hecho, que no deja de aumentar, se debe probablemente tanto a los avances tecnológicos de la técnica como al descenso real de los precios en torno a esta “novedosa tecnología”. Es por ello que numerosos laboratorios están en disposición de adquirir una herramienta, que si bien en sus partes por separado no es desconocida (la cromatografía de líquidos, y la espectrometría de masas), unidas poseen unas características que la hacen especial, tanto en el modo de trabajar como en las aplicaciones a las que puede estar destinada.

El presente trabajo trata de abordar someramente los principios físico-químicos sobre los que se basa la particular forma de compatibilizar el líquido procedente del cromatograma de líquidos con un espectrómetro de masas que únicamente puede trabajar con muestras en estado gaseoso. En una segunda parte se describe las interfases de Ionización a Presión Atmosférica (API), con sus dos fuentes de ionización más representativas: Electrospray (ES), e Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI).

Ya por último se realiza una revisión de las aplicaciones de la técnica en un laboratorio de toxicología forense, en donde aparecen reflejadas las más recientes aplicaciones de la técnica, como es el caso del screening general de xenobióticos.

Palabras clave: Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas, ionización a presión atmosférica, drogas de abuso.

Abstract: LC-MS Methodology. General overview and toxicological applications. In the last few years, the increased use of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) in various analytical fields, including forensic and clinical toxicology, has been spectacular. At the moment, there is not doubt that LC-MS is competing with Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) for the status of the number one analytical technique in Toxicology. This fact is due not only to its technological advantages but also to its lower cost. This work discusses the principles of LC-MS systems, discussing new applications regarding quantitative analysis applied to drugs in different biological matrices. LC-MS, as a useful tool for screening in drug analysis, is presented as one of the best applications.

Key words: Liquid chromatography-mass spectrometry, atmospheric pressure ionization, drugs of abuse.

Introducción

El acoplamiento de un detector de espectrometría de masas a un sistema de separación cromatográfica constituye una herramienta que permite que se resuelvan con las suficientes garantías los problemas de identificación y cuantificación de sustancias que habitualmente les son planteados a los toxicólogos. En efecto, cuando los detectores de masas por impacto electrónico operan en modo *scan* proporcionan una información espectral muy precisa sobre la identidad del producto, y cuando operan en modo *SIM* (modo de selección de ión) proporcionan una excelente sensibilidad con una alta especificidad, lo que posibilita el análisis cuantitativo.

Dicho acoplamiento realizado mediante una interfase comporta ciertas dificultades, que en el caso de la cromatografía de gases (GC) se resolvieron hace bastante tiempo y actualmente aparatos de GC-MS de gran fiabilidad forman parte de la instrumentación básica de los laboratorios de toxicología. Sin embargo, en el caso del acoplamiento de la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas la situación es muy diferente [1].

Los últimos diez años han supuesto un cambio importante en la investigación en el campo de la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS). Teniendo en cuenta que la investigación sobre el acoplamiento de la LC y la MS comienza a principios de los años 70, los siguientes veinte años estuvieron centrados en la resolución de problemas de este difícil acoplamiento y en la innovación tecnológica de diferentes interfases [2].

Cada interfase aplica una tecnología diferente para resolver los dos problemas principales que plantea este tipo de conexión: *a)* eliminar la gran cantidad de gas, y vapor procedente de la fase móvil antes de entrar a la región de alto vacío del MS; y *b)* transformar las moléculas en solución de la fase móvil en iones en fase gaseosa, sin que se produzca degradación térmica.

La sensibilidad del análisis por LC-MS va a depender tanto del analito de que se trate como de la interfase empleada. En este sentido, la LC-MS es una técnica adecuada para el análisis de sustancias polares, de peso molecular elevado y de sustancias termolábiles, sin tener que recurrir al proceso de derivatización

previo al análisis de las mismas que habitualmente se lleva a cabo en GC-MS [1].

No es el objeto de este trabajo analizar pormenorizadamente los diferentes tipos de interfase y sus particulares métodos de ionización, sobre todo cuando existen excelentes textos de referencia sobre esta materia [3]. El primer intento de acoplamiento de LC con MS fue descrito por Arpino y cols. en 1974 [4]. Desde entonces se han descritos en la literatura al menos 25 acoplamientos diferentes (interfases o interfases/fuentes de iones) [5] de los que al menos siete han tenido algún éxito. Dentro de las interfases “históricas”, de acuerdo con la denominación de Marquet y Lachâtre [6], estarían las siguientes cinco: Direct Liquid Inlet (DLI) [4, 7], Moving belt [8, 9], Fast Atom Bombardment (FAB) [10, 11], Particle Beam (PB) [12, 13] y Thermospray (TSP) [14, 15]. Actualmente, los fabricantes de instrumentación LC-MS han optado por configurar sus equipos con dos interfases que se incluyen dentro de la denominada ionización a presión atmosférica (API), denominadas electrospray (ES) e ionización química a presión atmosférica (APCI). Estas dos últimas constituyen sin lugar a dudas las interfases que han logrado un mayor éxito analítico, lo que se ve reflejado en el gran aumento de publicaciones científicas de estos últimos años. Hoja y cols. en 1997 [1]; Marquet y Lachâtre en 1999 [6]; y Van Bocxlaer y cols. en 2000 [16], publicaron interesantes revisiones de las aplicaciones de LC-MS en el campo de la toxicología y ciencias forenses, en donde además se recoge una breve descripción también de la evolución de la tecnología hasta ese momento.

Técnicas de ionización a presión atmosférica (API)

Las primeras técnicas comercializadas de LC-MS (DLI, TSP, moving belt, PB), presentaban ciertas dificultades de uso debido fundamentalmente a su baja sensibilidad y su falta de robustez. Aún así han resultado adecuadas para ciertas aplicaciones específicas, y en algunos casos concretos todavía lo siguen siendo. Sin embargo el imparable aumento de las aplicaciones de la técnica de LC-MS se debe a la introducción de una nueva interfase entre el HPLC y el MS, diferente a las mencionadas hasta el momento. Se trata de la interfase denominada API (siglas de la denominación inglesa *Atmospheric Pressure Ionization*), y que engloba a todas las técnicas en la que los iones se forman a presión atmosférica [17]

Una fuente API consta de cuatro componentes básicos [18]:

1. Dispositivo de introducción de muestra
2. Cámara de ionización, en donde se generan los iones mediante ionización por electrospray, APCI u otro mecanismo (interfase).
3. Cono de muestreo (orificio de entrada de los iones).
4. Sistema de transferencia de iones, en el que éstos son transportados hacia la región de alto vacío del MS.

Cuando una mezcla de gas y de iones es transferida desde una región a presión atmosférica hacia la región a baja presión dentro del MS experimenta un intenso enfriamiento (enfriamiento adiabático) debido a la rápida expansión de la mezcla en el vacío [19, 20]. Si al mismo tiempo se encuentran presentes en la mezcla sustancias polares y neutras (por ejemplo, agua y solventes) tiene lugar la condensación de este solvente sobre el analito, ori-

ginando lo que se conoce como *clusters*. El tamaño de los *clusters* así formados puede exceder el del rango de masas del analizador y disminuir, por tanto, la señal del analito. En todos los aparatos modernos de MS diseñados para trabajar con API, el problema de *clustering* se trata de minimizar, bien previniendo su formación, bien eliminándolos por diferentes métodos.

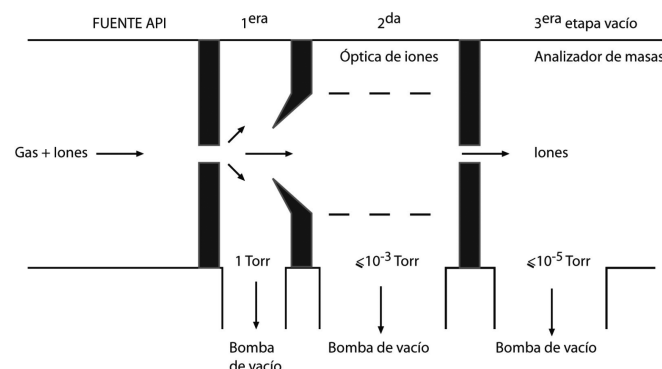


Fig. 1. Esquema general de una interfase de Ionización química a Presión Atmosférica (API) acoplada a un espectrómetro de masas. Pueden observarse las diferentes etapas de vacío que deben emplearse para pasar de presión atmosférica a un vacío aceptable para la detección por MS (adaptación de [17]).

La transmisión desde la región a presión atmosférica hasta la de alto vacío es la etapa en donde se produce la pérdida de la mayor parte del analito en los aparatos de MS actuales, por eso los fabricantes intentan mejorar la instrumentación en este aspecto, para así aumentar la sensibilidad de los equipos [21, 22]. Por tanto, el diseño tecnológico del sistema de transferencia de iones posee una importancia crucial para conseguir buenos niveles de sensibilidad. Este ha sido el objetivo de la última modificación llevada a cabo en la fuente de iones de los instrumentos de Micromass (entre los que se incluye el ZMD con el que se realizó este trabajo) y que ha consistido en el desarrollo de un sistema de transferencia de iones en forma de Z, denominado Z-spray (ver Figura 2). En este sistema los iones son extraídos, mediante un recorrido ortogonal, desde la fuente API hacia una cámara de vacío y de ésta a la región de alto vacío para su análisis de masas. Esta disposición física de la interfase proporciona una mayor sensibilidad, posibilita la eliminación de parte de los aductos formados en la cámara de ionización, y permite el uso de fosfatos en la elaboración de la fase móvil. Además facilita la eliminación de las moléculas neutras que hayan podido pasar desde el spray, para que no pasen al interior del MS, disminuyendo así el ruido de fondo.

En las técnicas API los iones formados a presión atmosférica son transportados desde la fuente a las regiones de alto vacío del analizador a través de diferentes etapas de vacío separada por diferentes lentes (ver Figura 1). En la siguiente etapa, los iones son enfocados y guiados a través de los orificios de las lentes hacia el interior del MS gracias a la aplicación de campos eléctricos adecuados.

Las principales ventajas de API propuestas por Voyksner son cuatro [23]:

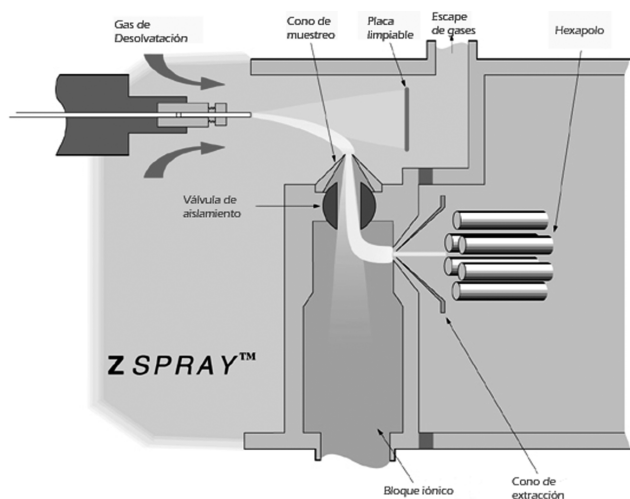


Fig. 2. Dibujo representativo de la sonda de electrospray, con diseño ortogonal que impide la entrada de gran parte de los compuestos neutros y gotas no evaporadas (modificado de Micromass).

1. El volumen de fase móvil utilizado en API se acerca más a los valores típicamente usados en LC (esto no ocurría con el resto de interfases en donde el flujo se debía reducir considerablemente).
2. Las técnicas API son adecuadas para el análisis de compuestos no volátiles, polares y termolábiles, que son los típicamente analizados por LC.
3. El acoplamiento API-MS proporciona una alta sensibilidad, ofreciendo límites de detección comparables e incluso mejores que los alcanzados con la técnica GC-MS.
4. Los sistemas API son muy estables y relativamente fáciles de manejar.

Dentro de las más recientes técnicas de API se diferencian dos modalidades básicas de interfase: ESI (*Electrospray ionization*), y APCI (*Atmospheric, Pressure Chemical Ionization*). A su vez el electrospray (ES) puede subdividirse en ES asistido neumáticamente, ES de multispray, etc., en que la principal diferencia radica en la distinta formación del spray a partir del flujo procedente del HPLC. Veamos un poco más en detalle en qué consisten estos dos tipos de interfase comúnmente usados en LC-API-MS y que se encuentran disponibles en las configuraciones de los aparatos de los diferentes fabricantes:

Interfases de ionización química a presión atmosférica (APCI)

La primera interfase APCI para LC-MS fue desarrollada por Horning y cols. en los años 70 [24]. A partir de entonces se han sucedido diferentes diseños, algunos de los cuales han llegado a comercializarse. Utilizando la sonda de APCI el líquido que procede del LC es nebulizado y rápidamente evaporado por la acción de una temperatura elevada (300-500 °C). A pesar de que a esta temperatura teóricamente ciertos analitos pueden ser degradados, los altos flujos de gas de nebulización y de N₂ coaxial (también denominado gas de *make-up*), previenen la ruptura de las moléculas (pensemos además que el tiempo que per-

manecen las moléculas a una temperatura elevada es muy pequeño, sobre todo si lo comparamos con el tiempo que permanecerían en la columna cromatográfica de un CG-MS a esa misma temperatura). De esta forma los iones que están presentes en la disolución pueden pasar a fase vapor.

Para incrementar el proceso de ionización se suele aplicar una descarga en corona, del orden de 2-6 kV, justo a la salida de la sonda de APCI en el spray. Esta descarga eléctrica no sólo ioniza las moléculas de analito, sino también las del disolvente de la fase móvil. Éstas a su vez pueden transferir su carga a las de los analitos en la fase gaseosa, de lo que resulta la ionización química de los mismos.

En modo iónico positivo, se forman moléculas protonadas y aductos con cationes. En modo negativo, se forma la especie desprotonada y la combinación con aniones o la captura electrónica. En todo caso la eficacia de la ionización, si la comparamos con la CI "típica" de GC-MS, es mucho mayor al producirse a presión atmosférica, lo que incrementa enormemente la probabilidad de choques entre los iones del solvente y las moléculas de analito.

Una importante ventaja que presenta la sonda de APCI es que su flujo óptimo de trabajo es muy similar al alcanzado en la cromatografía de líquidos acoplada a los detectores tradicionales (0,7-1,2 mL/min).

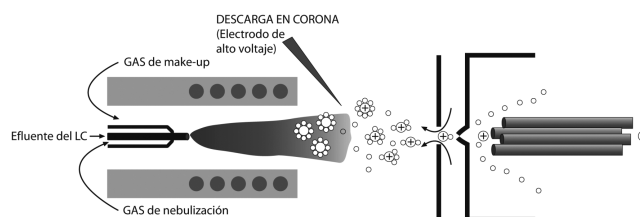


Fig. 3. Fuente de API-ionización química a presión atmosférica. La mezcla de líquido y vapor calientes se expande en la interfase a presión atmosférica, donde se produce una primera ionización mediante la descarga en corona. Los iones formados a partir de las moléculas del solvente transfieren su carga a los analitos, produciéndose así su ionización química.

Generalmente la sonda de APCI se utiliza para el análisis de moléculas de menos de 1000 Da, con baja o moderada polaridad. Estos analitos deben poseer además cierta volatilidad y no ser excesivamente termolábiles. Ejemplos de aplicaciones son los pesticidas, numerosos medicamentos y drogas de abuso, esteroides, PAHs...

Interfase de tipo Electrospray (ES)

El nacimiento del acoplamiento de LC-ES-MS fue descrito en 1984 casi simultáneamente por Yamashita y Fenn [25, 26]. A partir de este momento el incremento de aplicaciones mediante el uso de esta técnica ha sido espectacular. En efecto, se trata de la técnica más extendida actualmente y la que cuenta con un mayor número de aplicaciones.

El proceso físico del electrospray se conoce desde hace bastante tiempo y es el mismo utilizado para procesos tan comunes como la producción de aerosoles para pintar, en la ciencia nuclear, en la liberación de fármacos para inhalación, etc....

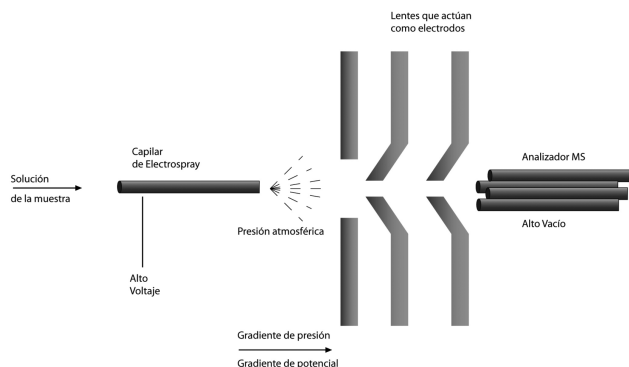


Fig. 4. Elementos básicos que constituyen una configuración representativa de una fuente de API-electrospray.

En 1917 Zeleny [27] descubre que un alto potencial eléctrico aplicado a un capilar produce la ruptura del solvente en finos hilos que posteriormente se desintegran en pequeñas gotas, y esta es todavía la base del diseño de todas las fuentes comerciales de ESI existentes. Una modificación introducida en la mayoría de los instrumentos actuales es la aplicación de una corriente coaxial de nitrógeno para mejorar la producción del spray en situaciones de elevados caudales de fase móvil. Esta mejora, denominada “ionspray”, fue introducida por Bruins y col., [28] y permite aumentar el flujo de la fase móvil por encima de los 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ sin pérdida de sensibilidad. Se han introducido posteriormente más adaptaciones con el mismo objetivo por parte de los diferentes fabricantes.

En la fuente de ESI se distinguen dos electrodos: uno es el capilar de ES y el opuesto lo constituye la entrada de la cámara de presión intermedia del MS. Los valores normales de tensión en el capilar se sitúan entre 2,5 y 3,5 kV. Es necesario mantener una diferencia de potencial en todo el recorrido que deben establecer los iones hasta el detector. La polaridad seleccionada dependerá de la carga (negativa o positiva) que posean los iones que interese analizar.

Nebulización por electrospray:

Bajo la influencia del campo eléctrico aplicado los iones de la misma polaridad migran hacia el líquido en el extremo del capilar, cuya superficie se alarga formando el denominado “cono de Taylor”.

Cuando la acumulación de un exceso de iones de la misma polaridad en la superficie del líquido hace que la fuerza de repulsión columbimétrica supere a la tensión superficial del líquido, se emiten desde el capilar multitud de minúsculas gotas ($\pm 1 \mu\text{m}$) cargadas de iones de la misma polaridad. Estas gotas van reduciendo su tamaño debido a fenómenos de evaporación del solvente (por efecto del gas y de la temperatura) y a la desintegración de las mismas gotas en otras de menor tamaño (3-10 nm)

capaces de producir iones en fase gaseosa. Se consigue de esa manera una ionización muy suave de los analitos que se encontraban en la fase móvil [29].

Mecanismo de producción de iones en fase gaseosa:

Existen tres modelos que describen la formación de los iones en fase gaseosa a partir de las minúsculas gotas cargadas:

- El modelo de residuo cargado, de Dole y col. [30, 31].
- El modelo de evaporación de iones, de Iribarne y Thomson [32, 33].
- Un modelo alternativo, descrito por Siu y col. [34, 35], que propone que los iones en fase gaseosa no se forman a partir de las gotitas cargadas sino que se emiten directamente desde el extremo del cono de Taylor [33, 36].

El modelo más aceptado por la comunidad científica es el de la evaporación iónica, si bien la mayoría de las observaciones se pueden explicar aceptablemente mediante los dos primeros modelos.

Kebarle y Tangref [37] observaron que la separación iónica en la punta del capilar de electrospray es electroforética y que la interfase puede ser considerada como una celda electrolítica en la que parte del transporte de la carga tiene lugar en la fase gaseosa. El proceso electroquímico esperado en la interfase líquido/metal del capilar de ES posee implicaciones analíticas, pues pueden generarse cationes a partir de moléculas neutras, permitiendo así, en ocasiones muy concretas, el uso del ES como un método verdadero de ionización, más que un procedimiento para la transferencia de fase de los iones pre-formados [38, 39, 40].

Los iones formados se “extraen” del spray gracias a la diferencia de potencial existente entre el capilar y el cono de entrada. Al entrar en la cámara de presión intermedia las moléculas neutras y los aductos iónicos del solvente son eliminados gracias a una corriente de gas en sentido contrario que impide la entrada de dichas sustancias y a la aceleración de los iones hacia la zona de baja presión del MS. Si se aumenta la aceleración de los iones (aumentando la diferencia de potencial entre los dos electrodos), se puede producir su ruptura por fenómenos de colisión con moléculas de gas residual procedente de la fase móvil y del N_2 utilizado como gas de nebulización. Los fragmentos producidos mediante este fenómeno, denominado *disociación colisión-inducida* (CID, en inglés) pueden ser usados como iones de confirmación en métodos cuantitativos, o para la elucidación estructural de moléculas [41]. De hecho, la CID en la fuente de ionización proporciona los mismos fragmentos que los producidos por la CID convencional generada por la cámara de colisión de los instrumentos MS/MS [41, 6].

Una característica que diferencia a la interfase ESI de otras utilizadas en LC-MS, es que parece comportarse como un dispositivo concentración-dependiente, pues la respuesta es directamente proporcional a la concentración del analito que entra en la fuente, sin importar el flujo de fase móvil que se esté suministrando. Esta característica permite miniaturizar la técnica sin perder sensibilidad y así incrementar sus aplicaciones, lo que supone una importante ventaja. Buenos ejemplos de ello son la combinación de la espectrometría de masas a la (Figura 5) electroforesis capilar [42]; el desarrollo de técnicas de análisis de péptidos y proteínas con nano-ES...[43].

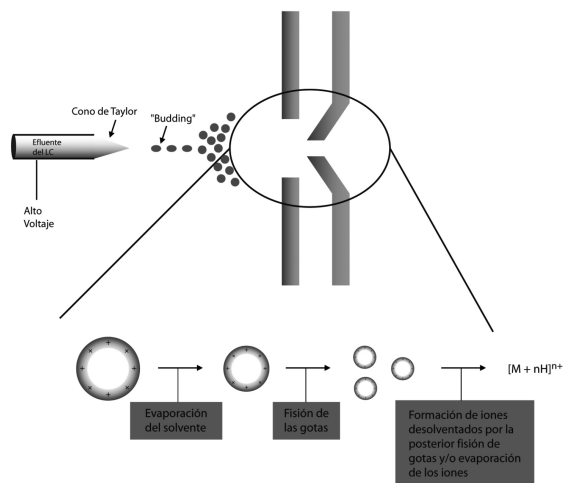


Fig. 5. Mecanismo de producción de iones en fase gaseosa cuando trabajamos mediante una fuente de electrospray (modificado de [17]).

Aplicaciones de la técnica de ES

El análisis por ESI puede ser utilizado para un amplio rango de moléculas. Es posible el análisis de moléculas pequeñas y compuestos de baja polaridad capaces de ser (de)protonados o que se combinen con un anión o catión. Sin embargo, su aplicación más interesante es el análisis de moléculas de elevado peso molecular, compuestos termolábiles y biomoléculas polares como péptidos, proteínas, oligonucleótidos, etc. cuyos pesos moleculares pueden llegar a cientos de miles de amu. A diferencia de otras técnicas de ionización, en las que sólo se consiguen iones monocargados, mediante el empleo de ESI es posible obtener especies iónicas de biopolímeros multicargadas. Gracias a que los MS evalúan la relación entre la masa y la carga molecular, es posible la detección de masas moleculares muy elevadas a pesar de contar con analizadores con un rango de masas relativamente pequeño (Cuadrupolo 4000 amu; TOF 20 000 amu).

Figura 6

Otra de las características poco comunes de la ESI es su ionización "suave", que hace posible el análisis por impacto electrónico de estructuras poco estables por el efecto de la temperatura. La capacidad de mantener intacta la estructura molecular sin fragmentaciones posee como contrapartida un escaso valor para la elucidación estructural. Como ya se comentó anteriormente, en el caso de necesitar más información que la molecular, se debería emplear la técnica CID.

LC-MS en el laboratorio de toxicología: aplicaciones

Una vez planteados los aspectos relacionados con la evolución de la tecnología en LC-MS es el momento de concretar sus aplicaciones y usos en un Laboratorio de Toxicología dedicado a las aplicaciones clínicas y forenses, haciendo especial énfasis en aquellos aspectos que hacen de esta una técnica imprescindible en nuestros días. Aunque el término imprescindible pueda parecer excesivo, es a todas luces, exacto, pues esta técnica proporciona unos resultados con una gran sensibilidad, especificidad,

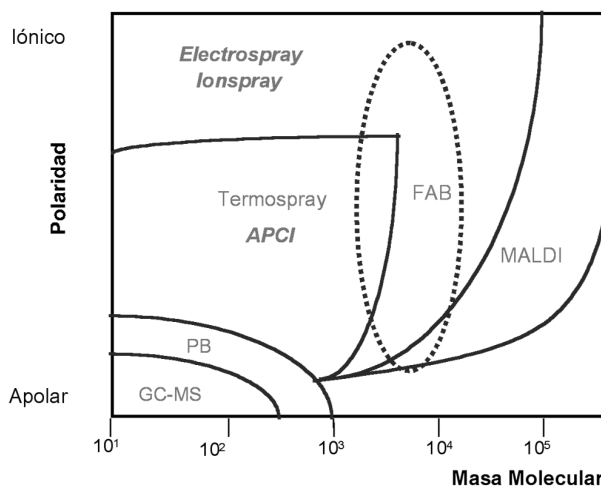


Fig. 6. Diagrama que representa la idoneidad de diferentes técnicas de análisis en función de la polaridad y de la masa molecular de los analitos. Destaca la gran versatilidad que porta la interfase de electrospray.

precisión y exactitud, difíciles de lograr con otras técnicas, cualidades todas ellas que son las que habitualmente se exigen en las distintas técnicas analíticas con aplicaciones clínicas y forenses.

Hasta el momento existen publicadas diferentes revisiones en donde se pone de manifiesto las capacidades de esta técnica en los campos de la toxicología analítica y forense [1, 44, 45, 46] y [47, 6].

Si bien la LC-MS no se puede considerar una técnica imprescindible en la determinación de los niveles de un fármaco o droga ya identificado, sí lo es cuando se requiere determinar pequeñas concentraciones de sustancias obviando los complicados y laboriosos procesos de derivatización.

Como es bien sabido, en el momento actual la identificación de un agente exógeno de naturaleza orgánica en un fluido biológico se puede realizar mediante la aplicación de un ensayo inmunológico multitest en una muestra de orina. No obstante la confirmación de un resultado positivo, necesita de la aplicación de técnicas cromatográficas como son la CG-MS o la HPLC-DAD [45]. La determinación de los niveles en sangre, permitirá en último término, efectuar la interpretación de los resultados e informar de la situación del agente en un caso concreto.

Sin embargo hay que tener en cuenta que este planteamiento tan simple presenta ciertas limitaciones, y así sólo las sustancias térmicamente estables, apolares y de bajo peso molecular podrán ser identificadas por cromatografía gaseosa; aquellas que presenten un buen coeficiente de absorptividad molar podrán ser analizadas por espectrofotometría UV o por array de diodos; y las que presenten fluorescencia natural con detectores de fluorescencia, etc. Para aquellos compuestos que no presentan ninguna de estas propiedades, se hace necesario obtener agentes derivados térmicamente estables o derivados fluorescentes que faciliten su identificación, lo que supone tediosas tareas que aumentan el tiempo de preparación de la muestra.

En la década de los 90 la GC-MS ha sido la técnica por excelencia usada en la confirmación de numerosos agentes orgáni-

cos, debido a la disponibilidad de una ingente cantidad de librerías estandarizadas y especializadas en diferentes agentes tóxicos, drogas y metabolitos [48]. Se trata, además, de una técnica reproducible en todos los laboratorios de manera que es posible la obtención de un espectro de masas reproducible en cualquier equipo que aplique unas condiciones similares (normalmente ionización mediante impacto electrónico a 70 eV). Es por eso que todavía se considera el “gold Standard” para la especificidad de la detección por MS [47]. Sin embargo existen una serie de factores limitantes en su aplicación, a los que ya nos hemos referido y que han permitido incrementar las posibles aplicaciones de la LC-MS con fines confirmativos.

No obstante esta última técnica presenta, a su vez, ciertos problemas en su aplicación que es necesario analizar. Debido a que la ionización mediante impacto electrónico produce espectros de masas reproducibles, este modo de ionización es considerado el elemento clave de la especificidad en la identificación de un agente químico. Siendo la fase móvil un líquido, el primer reto para el acoplamiento LC-MS fue la transformación de los iones en fase líquida a la fase vapor, para su posterior análisis por espectrometría de masas. De las primeras interfases desarrolladas, únicamente las de haz de partículas (PB) eran compatibles con fuentes de ionización electrónica, pero presentaban el mismo factor limitante para las moléculas termolábiles. Por tanto no presentaban ninguna ventaja adicional frente a la GC. Aún así algunos grupos de investigación elaboraron sus propias librerías de masas para centenares de compuestos [49], e incluso llegaron a comercializarlas.

En la actualidad casi ninguna empresa comercializa equipos con PB y por tanto este procedimiento ha caído en franco desuso. Los nuevos sistemas de ES y APCI han reemplazado al PB y se han impuesto como sistemas de interfase en los equipos de nuevo diseño, aunque estos sistemas son incompatibles con la ionización electrónica. Tanto ES como APCI provocan la ionización “suave” de los analitos, produciendo de forma mayoritaria los iones pseudomoleculares ($M+1$ o $M-1$). Si bien esto presenta una ventaja en cuanto a los niveles de detección alcanzados con la técnica LC-MS, no lo es tanto si pretendemos tener una selectividad importante que nos asegure que la molécula detectada como un pico cromatográfico es realmente la que sospechamos. Tal y como propone Marquet [47] esta limitación ha sido resuelta mediante el empleo del proceso denominado *Collision Ionization Dissociation* (CID). Los iones son acelerados y se produce un alto número de choques con las moléculas de gas y del solvente, que provocará la ruptura de los analitos. Los fragmentos producidos por CID nos permiten básicamente confirmar la identidad del compuesto e incluso poder diseñar y elaborar una librería para cada equipo de MS, una vez conseguida una energía de fragmentación homogénea. En efecto, mediante este proceso se origina un ión $M+$ y otros iones (fragmentos) de confirmación, que sólo aparecerán cuando está presente la molécula en cuestión.

Recientemente el grupo de Weinmann [50, 51, 52] y el grupo de Marquet [53, 54] han usado este proceso para elaborar sus propias librerías e identificar así tanto agentes terapéuticos como drogas de abuso. Todo este proceso incrementa notablemente las posibilidades de la LC-MS (y LC-MS/MS) y permite su aplicación al *screening* general. Actualmente existen en el mercado equipos con el diseño adecuado para obtener fragmentaciones homogéneas y casi reproducibles de unos equipos a otros. Es

aquí donde radican las mayores posibilidades de futuro desarrollo de esta técnica en sustitución de la GC-MS. Aunque se trata de un lento y laborioso proceso, las recientes y valiosas aportaciones realizadas por el grupo de Marquet, en Limoges, incluyen la elaboración de librerías para unos 1500 compuestos [53], con buenas perspectivas de reproducibilidad entre laboratorios, aunque todavía se requiere un mayor grado de coordinación entre ellos. Son varios los grupos que están trabajando en este proyecto y que a buen seguro contribuirán con su esfuerzo, y el de las propias empresas comerciales, a que las desventajas que en este momento presenta la LC-MS sean minimizadas, y harán del uso de esta técnica una necesidad en la resolución de los problemas que se plantean en el ámbito de la Toxicología. En este sentido, un reciente artículo publicado por Gergov y cols. en 2004 [55], nos muestra los satisfactorios resultados tras comparar durante un período de tres años los espectros producidos por instrumentos LC-MS/MS de tres fabricantes diferentes en laboratorios diferentes. El grado de concordancia en los resultados (medido como porcentaje de pureza del espectro de masas) se sitúa entre un 79% y 85%. Si la comparación se realiza sobre el mismo instrumento medido durante un período de cuatro años, la reproducibilidad de los iones producidos sobre una molécula aumenta hasta el 94%.

La detección de drogas y fármacos es solo una de las múltiples aplicaciones de esta técnica, pero las expectativas en el campo de la toxicología molecular para dilucidar la estructura de las dianas moleculares y de su cambios ante la presencia de un xenobiotico, son prometedoras para explicar parte d helos mecanismos de toxicidad y sus causas.,

Dentro de la técnica de LC-MS el empleo de la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) ofrece una sensibilidad y especificidad superior en el análisis de las sustancias de interés, si se compara con el empleo de un solo cuadrupolo. En este tipo de aparatos, cuando se opera en modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) es posible detectar niveles de analitos muy bajos en las matrices biológicas complejas, a menudo reduciendo la preparación de la muestra y el tiempo de análisis. Además, en la actualidad existen disponibles en el mercado una gran variedad de productos análogos de drogas y medicamentos isotópicamente marcados. Esto nos permite tener los mejores compuestos para llevar a cabo nuestros procesos de estandarización y de cuantificación. La similitud en las propiedades fisico-químicas de estos compuestos deuterados con respecto a sus análogos sin deuterar, parece aportar otra gran ventaja: compensa los efectos que pueda causar una menor preparación de la muestra o el efecto de supresión iónica producido por la matriz, típicas desventajas cuando trabajamos con LC-MS(MS).

Hasta la fecha, se han descrito métodos de análisis por LC-MS (y MS/MS) para la mayor parte de los grupos de drogas, incluyendo a los opiáceos y opioides sintéticos, anfetaminas, cocaína y metabolitos, cannabinoides, alucinógenos y derivados benzodiazepínicos [1, 6, 16, 56-58].

Bogusz [46] presenta una propuesta de aplicación de LC-MS en la rutina de su laboratorio de toxicología forense en Aachen. Hace una revisión de tres años de trabajo con casos reales, sobre un modo operatorio consistente en tres puntos principales: un solo procedimiento de extracción en fase sólida usado para todos los compuestos básicos; fase móvil para los métodos de LC consistente en dos únicos líquidos, para facilitar el análisis

consecutivo de diferentes sustancias por diferentes métodos; y el uso de un aparato dotado de un analizador de cuadrupolo al que se acopla una interfase de tipo APCI, en modo de ionización positivo trabajando además mediante CID en la fuente.

Teniendo en cuenta las limitaciones comentadas de la LC-MS, y que no resulta todavía una técnica económica si la comparamos con la CG-MS, hoy en día un laboratorio de Toxicología Aplicada en el que se hace necesario "afinar" los resultados para establecer con el mínimo error la implicación de un agente tóxico en una muerte de significación médico-legal, en la influencia de drogas y/o fármacos en la conducción, en el medio laboral, debe de contar con un equipamiento de estas características. Esto no significa en ningún caso la sustitución de esta técnica por la de GC-MS, sino como un complemento de toda una serie de técnicas instrumentales que hacen que el Laboratorio de Toxicología sea preciso, exacto y en definitiva riguroso con los datos que proceso y con los informes que maneja, cuya repercusión es la mayoría de las veces de gran trascendencia social.

Bibliografía

1. Hoja H, Marquet P, Verneuil B, Lotfi H, Penicaut B, Lachatre G (1997) Applications of liquid chromatography-mass spectrometry in analytical toxicology: a review. *J Anal Toxicol* 21(2): 116-126.
2. Niessen WMA (2003) Progress in Liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. *J Chromatogr A* 1000: 413-436.
3. Niessen WMA (1999) Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, 2nd ed., Chromatographic Science Series, Vol. 79, Marcel Dekker, New York.
4. Arpino P, Baldwin MA, McLafferty FW (1974) Liquid chromatography-mass spectrometry II. Continuous monitoring. *Biomed Mass Spectrom* 1(1): 80-82.
5. Burlingame AL, Boyd RK, Gaskell, SJ (1994) Mass Spectrometry *Anal Chem*. 66(12): 634R-683R.
6. Marquet P, Lachâtre G (1999) Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B* 733: 93-118.
7. Esmans EL, Geboes P, Luyten Y, Alderweireldt FC (1985) Direct liquid introduction LC/MS microbore experiments for the analysis of nucleoside material present in human urine. *Biomed Mass Spectrom* 12(5): 241-5.
8. Hayes MJ, Lankmayer EP, Vouros P, Karger BL, and McGuire JM (1983) Moving belt interface with spray deposition for liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*. 55: 1745-1752.
9. Games DE, Hirter P, Kuhn W, Lewis E, Weerasinghe NCA, Westwood SA (1981) Studies of combined liquid chromatography-mass spectrometry with a moving-belt interface. *J Chromatogr* 203: 131-138.
10. Ito Y, Takeuchi T, Ishii D, Goto M (1985) Direct coupling of micro high-performance liquid chromatography with fast atom bombardment mass spectrometry. *J Chromatogr* 346: 161-166.
11. Shih M, Wang TC, Markey SP (1989) Evaporation device for continuous flow liquid secondary ion mass spectrometry. *Anal. Chem*. 61(22) 2582-2583.
12. Winkler PC, Perkins DD, Williams WK, Browner RF (1988) Performance of an improved monodisperse aerosol generation interface for liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem*. 60(5): 489-493.
13. Willoughby RC, Browner RF (1984) Monodisperse aerosol generation interface for combining liquid chromatography with mass spectroscopy. *Anal. Chem*. 56(14): 2625-2631.
14. Vestal ML, Fergusson GJ (1985) Thermospray liquid chromatograph/mass spectrometer interface with direct electrical heating of the capillary. *Anal. Chem*. 57(12): 2373-2378.
15. Blakley CR, Vestal ML (1983) Thermospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem*. 55(4): 750-754.
16. Van Bocxlaer JF, Clauwaert KM, Lambert WE, Deforce DL, Van den Eeckhout EG, De Leenheer AP (2000) Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic toxicology. *Mass Spectrom Rev* 19: 165-214.
17. Lemièrre F (2001) Interfaces for LC-MS. LC•GC Europe. Guide to LC-MS, 2-8 (<http://www.lcgeurope.com/lcgeurope/article/articleDetail.jsp?id=8134>).
18. Niessen WMA (1999) Electrospray Interfacing, en: Niessen WMA, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, 2nd ed, Chromatographic Science Series, Vol. 79, Marcel Dekker, New York. pp. 288.
19. Bruins AP (1997) ESI source design and dynamic range considerations, en: Cole RB, Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Fundamentals, Instrumentation & Applications. Wiley-Interscience, New York. pp. 107-136.
20. Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn, JB (1985) Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. *Anal. Chem*. 57(3): 675-679.
21. Bökmán, CF (2002) Analytical Aspects of Atmospheric Pressure Ionisation in Mass Spectrometry. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology. 748.
22. Jennings, KR, Dolnikowski, GG (1990) Mass analyzers. *Meth. Enzymol*. 193: 37-61.
23. Voyksner RD (1997) Combining Liquid Chromatography with Electrospray Mass Spectrometry, en: Cole RB, Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications. Wiley- Interscience, New York. pp. 223-242.
24. Horning EC, Carroll DI, Dzidic I, Haegele KD, Horning MG, Stillwell RN (1974) Liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical systems. Continuous flow system based on atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *J Chromatogr* 99: 13-21.
25. Yamashita M, Fenn JB (1984) Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem*. 88: 4451-4459.
26. Yamashita M and Fenn JB (1984) Negative ion production with the electrospray ion source. *J. Phys. Chem*. 88: 4671-4675
27. Zeleny J (1917) Instability of Electrified Liquid Surfaces. *Phys Rev* 10: 1-6.
28. Bruins AP, Covey TR, Henion JD (1987) Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal. Chem*. 59: 2642-2646.
29. Niessen WMA (1999) Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, 2nd Ed, Marcel Dekker, New York. pp. 314.
30. Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB (1968) Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys*. 49(5): 2240-2249.
31. Gieniec J, Mack LL, Nakamae K, Gupta C, Kumar V, Dole M (1984) Electrospray mass spectroscopy of macromolecules: application of an ion-drift spectrometer. *Biomed Mass Spectrom* 11(6): 259-268.
32. Iribarne JV, Thomson BA (1976) On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys*. 64(6): 2287-2294.
33. Iribarne JV, Dziedzic PJ, Thomson BA (1983) Atmospheric pressure ion evaporation-mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom Ion Process Phys*. 50(3): 331-347.

34. Guevremont R, Siu KWM, Le Blanc JCY, Berman SS (1992) Are the electrospray mass spectra of proteins related to their aqueous solution chemistry?. *J Am Soc Mass Spectrom* 3(3): 216-224.
35. Siu KWM, Guevremont R, Le Blanc JCY, O'Brien RT, Berman SS (1993) Is droplet evaporation crucial in the mechanism of electrospray mass spectrometry?. *Org Mass Spectrom* 28(5): 579-584.
36. Thomson BA, Iribarne JV (1979) Field-induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *J. Chem. Phys.* 71(11): 4451-4463.
37. Kobarle P, Tang L (1993) From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 65(22): 972A-986A.
38. Xu X, Nolan SP, Cole RB (1994) Electrochemical oxidation and nucleophilic addition reactions of metallocenes in electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 66: 119.
39. Van Berkel GJ, Zhou F (1994) Chemical Electron-Transfer Reactions in Electrospray Mass Spectrometry: Effective Oxidation Potentials of Electron-Transfer Reagents in Methylene Chloride. *Anal. Chem.* 66: 3408.
40. Van Berkel GJ, Zhou FM (1995) Characterization of an Electrospray Ion Source as a Controlled-Current Electrolytic Cell. *Anal. Chem.* 67: 2916.
41. Niessen WMA. (1999) Electrospray Interfacing, en: Niessen WMA., *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 2nd ed, Marcel Dekker, New York. pp. 297-298.
42. Edmonds CG, Loo JA, Barinaga CJ, Udseth, HR; Smith RD (1989) Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *J Chromatogr* 474: 21-37.
43. Larsen, McEwen CN (1998) *Mass Spectrometry of Biological Materials*. B.S, Marcel Dekker Inc, New York, USA.
44. Maurer HH (1998) Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B Biomed Sci. Appl.* 713(1): 3-25.
45. Thieme D, Sachs H (2003) Improved screening capabilities in forensic toxicology application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim. Acta* 492: 171-186.
46. Bogusz MJ (2000) Liquid chromatography-mass spectrometry as a routine method in forensic sciences: a proof of maturity. *J Chromatogr B Biomed Sci. Appl.* 748(1): 3-19.
47. Marquet P (2002) Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Ther. Drug Monit.* 24(2): 255-276.
48. Pfieger K, Maurer HH, Weber A eds. (2000) *Mass Spectral Library of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites*. 3d ed. Agilent. Technologies, Palo Alto, USA.
49. Spratt E, Vallaro GM (1998 Dec) LC/MS with a particle beam interface in forensic toxicology. *Clin. Lab Med* 18(4): 651-663 viii.
50. Weinmann W, Wiedemann A, Eppinger B, Renz M, Svoboda M (1999) Screening for drugs in serum by electrospray ionization/collision-induced dissociation and library searching. *J Am Soc Mass Spectrom* 10(10): 1028-1037.
51. Weinmann W, Lehmann N, Muller C, Wiedemann A, Svoboda M (2000) Identification of lorazepam and sildenafil as examples for the application of LC/ion-spray-MS and MS-MS with mass spectra library searching in forensic toxicology. *Forensic Sci. Int.* 113(1-3): 339-344.
52. Weinmann W, Stoertzel M, Vogt S, Wendt J (2001) Tune compounds for electrospray ionisation/in-source collision-induced dissociation with mass spectral library searching. *J Chromatogr A* 926(1): 199-209.
53. Saint-Marcoux F, Lachatre G, Marquet P (2003) Evaluation of an improved general unknown screening procedure using liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry by comparison with gas chromatography and high-performance liquid-chromatography-diode array detection. *J Am Soc Mass Spectrom* 14(1): 14-22.
54. Venisse N, Marquet P, Duchoslav E, Dupuy JL, Lachatre G (2003) A general unknown screening procedure for drugs and toxic compounds in serum using liquid chromatography-electrospray-single quadrupole mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 27(1):7-14.
55. Gergov M, Weinmann W, Meriluoto J, Uusitalo J, Ojanpera I (2004) Comparison of product ion spectra obtained by liquid chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry for library search. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18(10): 1039-1046.
56. Concheiro, M., De Castro, A., Quintela, O., Cruz, A., López-Rivadulla, M. (2004) Development and validation of a method for the quantitation of $^9\Delta$ Tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography electrospray-mass-spectrometry. *Journal of Chromatography B* 810: 319-324.
57. Quintela, O. Cruz, A, Concheiro, M. De Castro, A y López-Rivadulla, M. (2004). A sensitive, rapid and specific determination of midazdam in human plasma and saliva by liquid chromatography electrospray-mass-spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18: 2976-2982.
58. Quintela, O. Cruz, A, De Castro, A, Concheiro, M. y López-Rivadulla, M. (2004). Liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry for the determination of nine selected benzodiazepines in human plasma and oral fluid. *J Chromatogr B Biomed Sci. Appl.* (en prensa).

Windows of Detection of Tetrazepam in Urine, Oral Fluid, Beard, and Hair, With a Special Focus on Drug-Facilitated Crimes

Marta Concheiro,* Marion Villain,† Stéphane Bouchet,‡ Bertrand Ludes,‡
Manuel López-Rivadulla,* and Pascal Kintz‡

Abstract: Reducing the capacity of a victim to react against sexual assault, coupled with a possible abrupt unconsciousness-inducing effect and ease of administration in spiked drinks, have resulted in the use of sedative agents in cases of drug-facilitated offence. Among these compounds, tetrazepam may impair an individual rapidly. The chances of detecting this substance increase if the most sensitive methods are used and if the biologic matrix that allows the longest possible detection time is available. To document the window of detection of tetrazepam, 50 mg of the drug was administered orally to 2 volunteers, and the following samples were collected: oral fluid ($n = 1$) over 515 minutes, urine ($n = 2$) over 236–240 hours, hair ($n = 2$) 4 weeks after exposure, and beard ($n = 1$) over 34 days. Tetrazepam was analyzed by LC-MS/MS (Micromass Quattro Micro) after alkalization and extraction by dichloromethane/diethyl ether in the presence of diazepam- d_5 , used as internal standard. Reversed-phase separation on an XTerra MS C_{18} column was achieved in 12 minutes, under gradient conditions. Pseudo-molecular ions selected were m/z 289.2 and 290.2 for tetrazepam and the internal standard (IS), respectively, and the corresponding daughter ions selected were m/z 225.2 and 253.2 for tetrazepam and m/z 154.1 and 198.3 for the IS. Urine tested positive for tetrazepam over 236–240 hours (14–13 ng/mL). Oral fluid tested positive for tetrazepam over 515 minutes (2.5 ng/mL). Tetrazepam was detected in beard over 27 days (6.5 pg/mg). A single tetrazepam dose was detected in hair 4 weeks after intake (123–175 pg/mg). Tetrazepam tested positive over the studied time intervals but would be expected to be detectable for a considerably longer time. Therefore, in cases of drug-facilitated crimes in which tetrazepam is involved, hair and beard analyses can be an important complement to urine analyses to document exposure, particularly if LC-MS/MS is used.

Key Words: tetrazepam, urine, oral fluid, hair, beard, drug-facilitated sexual assault

(*Ther Drug Monit* 2005;27:565–570)

Received for publication August 25, 2004; accepted March 7, 2005.

From the *Instituto de Medicina Legal, C/ San Francisco s/n, Facultad de Medicina, 15782 Santiago de Compostela, Spain; †Laboratoire ChemTox, Rue Geiler de Kayserberg, Parc d'Innovation, 67400 Illkirch, Graffenstaden, France; and ‡Institut de Médecine Légale, 11 rue Humann, F-67000 Strasbourg, France.

Reprints: Marta Concheiro, Instituto de Medicina Legal C/ San Francisco s/n, Facultad de Medicina, 15782 Santiago de Compostela, Spain (e-mail: macongui@usc.es).

Copyright © 2005 by Lippincott Williams & Wilkins

Toxicologists are frequently asked for how long a drug can be detected after it was administered. Although data is available for most drugs of abuse, very few studies have been performed with benzodiazepines, the most frequently abused pharmaceuticals in the world. The window of detection is influenced by many factors, including the dose that was taken, the route of administration, the acute or chronic use, the choice of the matrix used to perform the analysis, the sensitivity of the technique, the pharmacokinetic parameters of the drug, and also the interindividual variation in metabolism.¹

Tetrazepam is a 1,4-benzodiazepine derivative used as a muscle relaxant and tranquilizer. The drug is rapidly absorbed after oral administration. Peak serum concentrations, 570 ± 60 ng/mL, of free tetrazepam are reached at 1.92 ± 0.19 hours. The serum half-life is approximately 14.9 ± 4.4 hours; this mean half-life is the result of a high hepatic clearance in spite of its large distribution volume, 225 ± 40 L.^{2–4} The values given represent mean $\pm$ standard deviation.

Benzodiazepines act nonselectively at 2 central receptor sites, named ω -1 and ω -2. The sedative action is related to ω -1 receptors, whereas ω -2 receptors are responsible for effects on memory and cognitive functioning. Tetrazepam does not distinguish between ω -1 and ω -2 central benzodiazepine receptors.⁵ Several side effects, including somnolence, have been described after tetrazepam use. As can be expected from its pharmacological effects, tetrazepam can be used in cases of drug-facilitated crimes (DFC), including robbery and sexual assault, as other benzodiazepines have been used.^{6,7} Because the onset of the effect of the drug is rapid, it can impair an individual swiftly. Moreover, because of its amnesic properties, the victims are less able to recall accurately the circumstances under which the offence occurred.

Urine is the conventional specimen to document DFC,⁸ and there have been a few reports in the literature and in practice for the use of oral fluid or hair, but none for the use of hair from beards. Oral fluid is often recommended for workplace drug testing or for roadside testing of intoxicated drivers.⁹ The advantages of oral fluid over traditional specimens, such as blood or urine, are the noninvasive, easy collection protocol and the fact that sampling can be achieved under close supervision. Hair has been suggested as a valuable specimen in situations in which, as a result of a delay in reporting the crime, natural processes have eliminated the drug from typical biologic specimens. Although many papers focus on the identification of drugs in hair following chronic drug use, those

dealing with a single dose in the case of drug-facilitated crimes are very scarce.^{10–13} Beard appears to be an interesting alternative matrix in some cases, like head hair, when there is a delay in reporting the crime. No references were found by the authors about the analysis of beard hair in drug-facilitated sexual assault (DFSA) cases. To establish the window of detection of tetrazepam in urine, oral fluid, beard, and hair, an original procedure using LC-MS/MS, which appears today as the most suitable tool to test for low concentrations of benzodiazepines, has been developed.

MATERIALS AND METHODS

Specimens

Two subjects (male, 28 years old, 82 kg, 1.82 m; female, 28 years old, 58 kg, 1.70 m) received a single oral dose of 50 mg of tetrazepam (Myolastan, Sanofi-Synthelabo, France) along with 100 mL of water. Urine from the 2 volunteers was collected over 236 hours (female) or over 240 hours (male) in plastic tubes, without any preservative. Urine specimens were frozen at -20°C until analysis (performed within 15 days). Oral fluid from 1 volunteer (female) was collected over 515 minutes by spitting at fixed intervals into plastic tubes without any stimulation, to obtain approximately 0.5 mL of sample. Specimens were stored at 4°C until analysis (performed within 3 days). Beard from 1 volunteer (male) was collected over 34 days using an electric shaver, and approximately 20 mg of shaved beard hair was used. Specimens were stored at room temperature. Hair from 2 subjects (male and female) was collected 4 weeks after drug exposure. A strand of about 100 hairs was oriented (tied up at the root), cut in vertex posterior as close as possible from the scalp, and stored at room temperature. Subjects participated in the experimental part of the study through written informed consent. The study was subjected to institutional review. The subjects were not paid for participation. Drug-free urine, oral fluid, beard, and hair samples were obtained from laboratory personnel.

Chemicals and Reagents

Tetrazepam was obtained from Euromedex (Souffelweyersheim, France), and diazepam- d_5 was obtained from Promochem (Molsheim, France) as a solution at a concentration of 1 mg/mL in 1 mL methanol. Formic acid was from Prolabo (Paris, France). Acetonitrile and dichloromethane of HPLC grade were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Diethylether was from SDS (Peypin, France). Chemicals for the saturated phosphate buffer (NH_4) $_2$ HPO $_4$ adjusted to pH 8.4 with hydrochloric acid 1 N were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). β -glucuronidase, from bovine liver, was purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). PTFE filters (0.45 μm) were obtained from Millipore (Bedford, UK). The evaporation system SpeedVac[®] was purchased from Savant Instruments, Inc. (Holbrook, NY).

Immunoassays

The immunoassays used were EMIT II Plus Benzodiazepine Assay (Dade Behring, Deerfield, IL) and FPIA (Abbott,

Irving, TX). The EMIT II Plus Benzodiazepine Assay is a homogeneous enzyme immunoassay with a 200 ng/mL cutoff. The FPIA is a fluorescence polarization immunoassay with a 200 ng/mL cutoff. The immunoassays were performed using neat urine samples.

Tetrazepam Extraction

A 0.5-mL sample of urine (previously hydrolyzed overnight with 20,000 IU of β -glucuronidase at pH 5.5), alkalized with 1 mL of phosphate buffer pH 8.4, was extracted into 5 mL dichloromethane/diethyl ether (50/50, vol/vol) in the presence of 5 ng of diazepam- d_5 (50 μL of 0.1 mg/L solution of diazepam- d_5 in methanol) used as internal standard (IS). After agitation and centrifugation (10,000 g for 15 minutes), the supernatant was collected and evaporated to dryness using a SpeedVac[®]. The residue was reconstituted by adding 50 μL of methanol.

A 0.5-mL sample of oral fluid, treated with 0.5 mL of phosphate buffer pH 8.4, was extracted into 3 mL dichloromethane/diethyl ether (50/50, vol/vol) in the presence of 5 ng of diazepam- d_5 (50 μL of 0.1 mg/L solution of diazepam- d_5 in methanol) used as IS. After agitation and centrifugation (10,000 g for 15 minutes), the supernatant was collected and evaporated to dryness using a SpeedVac[®]. The residue was reconstituted by adding 50 μL of methanol.

After decontamination of the hair strands with dichloromethane and segmentation (3 segments of 2 cm), each segment was cut into small pieces (<1 mm). About 20 mg (small pieces of hair or beard) were incubated overnight in 1 mL of phosphate buffer pH 8.4, in the presence of 1 ng of diazepam- d_5 (20 μL of 0.05 mg/L solution of diazepam- d_5 in methanol) used as internal standard and extracted into 5 mL of dichloromethane/diethyl ether (90/10, vol/vol). After agitation and centrifugation (10,000 g for 15 minutes), the organic phase was collected, filtered with PTFE filters (0.45 μm), and evaporated to dryness using a SpeedVac[®]. The residue was reconstituted by adding 50 μL of methanol.

LC-MS/MS Procedure

A 10- μL aliquot of the extract was injected onto the column (XTerra MS C $_{18}$ 3.5- μm , 100×2.1 mm ID, Waters, Milford, MA) protected by a 1-mm C $_{18}$ frit (Optimize Technologies, Oregon City, OR). Each 20-minute chromatographic run was carried out with a gradient (5% acetonitrile–95% formic acid 0.1% to a ratio 80%–20% at 10 minutes), at a flow rate of 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. The HPLC system was a Waters Alliance 2695 (Waters, Watford, UK).

Detection was carried out by a Micromass Quattro Micro tandem mass spectrometer equipped with an ion spray atmospheric pressure interface (Micromass, Manchester, UK). The instrument was operated in the positive ionization mode. Best results were obtained with a capillary voltage of 1 kV, source block temperature of 120°C , and desolvation gas (nitrogen) heated to 350°C and delivered at 550 L/h. Collision cell pressure was 0.3 Pa of argon. Data were recorded in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. Pseudo-molecular ions for tetrazepam and the IS, the corresponding daughter ions, and cone voltage and collision energy optimized are presented in Table 1.

TABLE 1. MRM Transitions for Detection of Tetrazepam and Diazepam-d₅ by LC-MS/MS

Compound	Parent Ion (<i>m/z</i>)	Daughter Ions (<i>m/z</i>)	Cone (Volts)	Collision Energy (eV)
Tetrazepam	289.2	225.2	40	26
		<u>253.2</u>	40	22
Diazepam-d ₅	290.2	<u>154.1</u>	40	30
		198.3	40	30

The transition of quantification is underlined.

Validation

The analytic validation was performed according to the guiding principles of the FDA.¹⁴ Extraction efficiency was determined in quintuplicate at concentrations of 50 ng/mL in urine, 2 ng/mL in oral fluid, and 50 pg/mg in hair. For each concentration, 5 blank samples were fortified with tetrazepam and the IS, and 5 others with the IS only. They were extracted as previously described. The dry extracts of the fortified samples were redissolved in 50 μ L of methanol, whereas the extracts of the blank samples were redissolved in 50 μ L of methanol containing the respective nominal amounts of tetrazepam. The latter were used as 100% controls. To estimate extraction efficiencies, area ratios (analyte versus IS) were used.

Intraassay precision and accuracy were determined at concentrations of 50 ng/mL in urine, 2 ng/mL in oral fluid, and 50 pg/mg in hair by preparing and analyzing on the same day 6 replicates for each concentration. Precision, expressed as the coefficient of variation (CV) of the measured values, was expected to be less than 15%. In the same way, accuracy was evaluated using the mean relative error (MRE), which had to be less than 15% of theoretical values at each concentration. The limit of detection (LOD) was defined as 3 times the ratio of signal to noise.

The specificity of the method was evaluated by analyzing urine, oral fluid, beard, and hair from 6 healthy non-drug-consuming subjects. The matrix effect on the ESI response concerning tetrazepam was evaluated via one of the experimental protocols described by Annesley.¹⁵ This experimental protocol compares the instrumental response for calibrator injected directly in methanol (a) and the same amount of compound added to preextracted samples (b). The data for the calibrator in methanol provided a relative 100% response value. The matrix effect was defined as $100 \times (a - b)/a$. Six

different sources of each blank matrix (urine, oral fluid, and hair) were used in the ion-suppression studies. The observed matrix effect was reported as mean $\pm$ SD for each matrix.

All concentrations above the corresponding linearity ranges should be considered as “semiquantitative” because the possibility to determine such high concentrations is not covered by the validation experiments. In the case of urine samples above the ULOQ (Upper Limit of Quantitation) were diluted with drug-free urine. In the case of hair samples above the ULOQ, smaller amounts of hair (10 mg) was analyzed.

RESULTS

Validation of the Procedures

Under the chromatographic conditions used, there was no interference with the analytes by any extractable endogenous materials present in urine, oral fluid, beard, or hair. Retention times of tetrazepam and the deuterated internal standard were 11.03 and 12.01 minutes, respectively. The method was linear in urine (1–100 ng/mL), oral fluid (0.1–20 ng/mL), and hair (5–200 pg/mg). Precision and inaccuracy were <11% in all cases. The use of tandem mass spectrometry allowed us to have suitable limits of detection, as follows: 0.3 ng/mL, 0.03 ng/mL, and 1.5 pg/mg (with a 20-mg specimen) for urine, oral fluid, and hair, respectively. There was no matrix effect in oral fluid, a value of $26.6 \pm 0.6\%$ in urine and $61 \pm 5\%$ in hair. Validation data are presented in Table 2.

Application

After oral administration of 50 mg tetrazepam to 2 subjects (female and male), 11 consecutive specimens of urine were collected over 236 hours (female) and 240 hours (male). Analyses were performed within 15 days. The excretion pattern of tetrazepam in urine is shown in Figure 1. Peak concentration of tetrazepam was obtained after 8 hours (female) or 12 hours (male), with concentrations of 2586 ng/mL and 924 ng/mL, respectively. Urine tested positive for tetrazepam over 236 hours or 240 hours (14 ng/mL and 13 ng/mL, respectively). It could be assumed that, with a limit of detection of 0.3 ng/mL, tetrazepam is detectable in urine at least for 10 days after a single exposure. The specimens collected after 3 days of the single exposure were negative when they were tested by immunoassays (cutoff at 200 ng/mL), for both technologies, EMIT and FPIA.

TABLE 2. Validation Results of the LC-MS/MS Determination of Tetrazepam in Urine, Oral Fluid, and Hair

Specimen	Linearity	Concentration	Extraction Efficiency, % (n = 5)	Intraassay Precision, CV % (n = 6)	Intraassay Accuracy: Mean Relative Error % (n = 6)
Urine	1–100 ng/mL $r^2 = 0.9908$	50 ng/mL	75.7	2.2	–10.4
Oral fluid	0.1–20 ng/mL $r^2 = 0.9988$	2 ng/mL	104.2	3.9	–0.6
Hair	5–200 pg/mg $r^2 = 0.9999$	50 pg/mg	41.7	7.3	–3.0

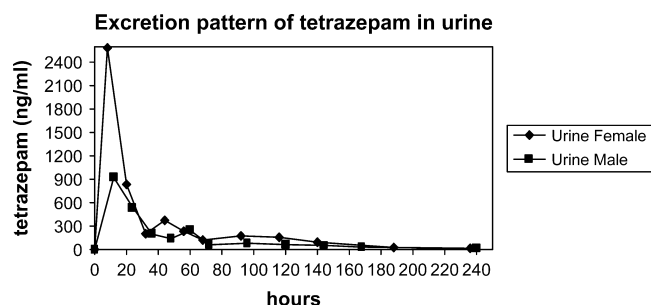


FIGURE 1. Excretion pattern of tetrazepam in urine after ingestion of 50 mg tetrazepam by 2 subjects (male and female).

After oral administration of 50 mg tetrazepam to 1 volunteer (female), 15 specimens of oral fluid were collected over 515 minutes. Analyses were performed within 3 days. The excretion pattern of tetrazepam in oral fluid is shown in Figure 2. Tetrazepam was detectable (0.5 ng/mL) 15 minutes after intake. Peak concentration of tetrazepam was obtained after 150 minutes (6.6 ng/mL), which is approximately the time of peak plasma concentration. Oral fluid tested positive for tetrazepam over 515 min (2.5 ng/mL, Fig. 3).

Tetrazepam was administered to 2 subjects (female and male), and hair strands were collected after 4 weeks of delay, in order that the spot where the drug is incorporated has grown above the scalp. It is, in the opinion of the authors, that after segmentation of the hair strand (3 segments of 2 cm each), the administered drug should be present in the proximal segment (root) but should not be detected in the following 2 segments. The authors were able to detect a single 50-mg tetrazepam administration. The concentrations found in the first segment were 123 pg/mg (female) and 176 pg/mg (male), and no tetrazepam was found in the other 2 segments.

Tetrazepam was administered to a volunteer (male), and beard samples were collected over 34 days. The excretion

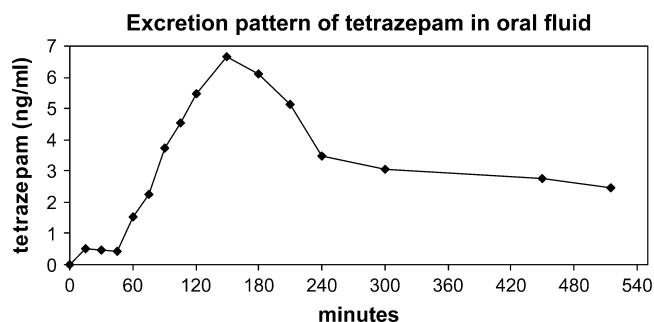


FIGURE 2. Excretion pattern of tetrazepam in oral fluid after ingestion of 50 mg tetrazepam by a female subject.

pattern of tetrazepam in beard is shown in Figure 4. Tetrazepam was detected (15 pg/mg, Fig. 5) 6 days after intake. Beard hairs tested positive (6.5 pg/mg) over 27 days.

DISCUSSION

In this preliminary study, performed with 2 subjects (male and female), the excretion pattern of tetrazepam was similar in both cases, and a single exposure in hair was detected. Tetrazepam was detected over the studied time intervals but would be expected to be detectable for a considerably longer time. The studied time intervals were chosen in accordance with the sample collection protocols used in cases of DFSA.

Although tetrazepam is not excreted in the glucuronidated form, the urine samples were hydrolyzed because this method is used in our laboratory in the screening of other benzodiazepines and their metabolites excreted in the glucuronidated form. The specimens were negative for benzodiazepines 3 days after ingestion of tetrazepam when they were tested by the 2 immunoassays (cutoff at 200 ng/mL). Assay sensitivity is an important issue in the detection of DFC because, usually, there

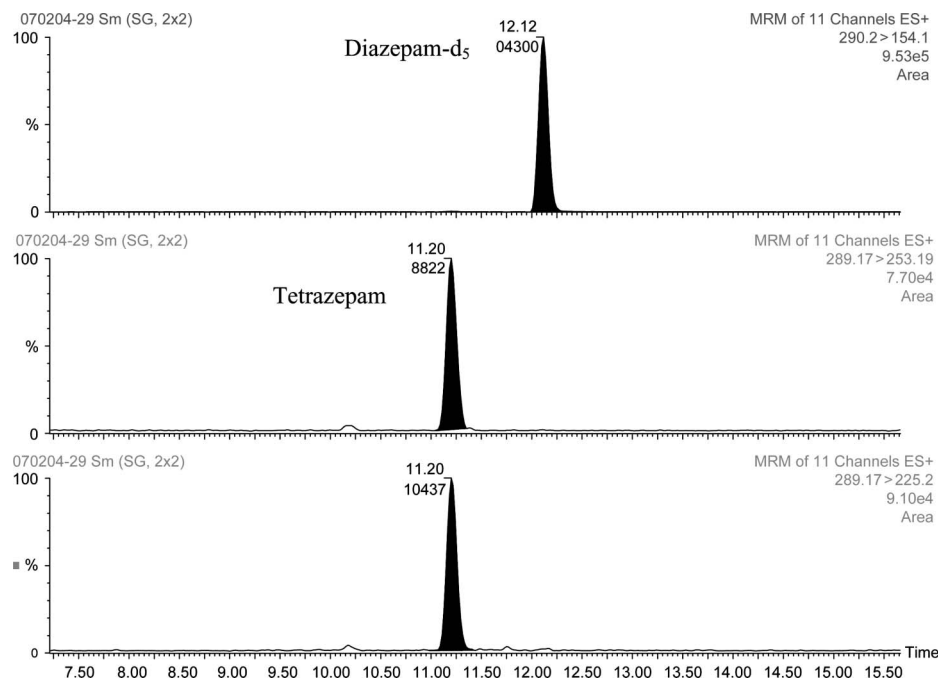


FIGURE 3. Chromatogram of oral fluid sample extracts at a concentration of 2.5 ng/mL of tetrazepam after 515 minutes of single exposure.

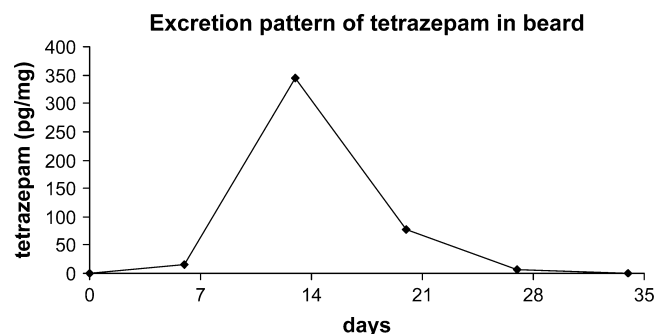


FIGURE 4. Excretion pattern of tetrazepam in beard after ingestion of 50 mg tetrazepam by male subject.

is a delay of 1 week or more between the drug administration and the sample collection.

The chromatographic run of 20 minutes is rather long for a single compound assay, but this method is applied to the screening of other benzodiazepines and their metabolites, as was indicated previously. The ion-suppression studies concerning only tetrazepam were performed. The results obtained relating to matrix effect should be highlighted. No relevant differences of matrix effect were found in the 6 different sources of each blank matrix (oral fluid, urine, and hair) tested. As expected, hair, the most complex matrix, showed the highest matrix effect. In these studies hydrolyzed urine samples were used, but, perhaps, neat urine samples would show less matrix effect. The problems caused by ionization suppression are related to a lack of accuracy, precision, limit of detection, and limit of quantification, but in this study good results in validation parameters were obtained in hair and in urine despite its

high matrix effect, especially in the case of hair, so no further sample preparation was needed.

In comparison with serum,² it appears that the oral fluid/blood ratio is lower than 1. These results demonstrate that oral fluid will not enhance the window of detection of tetrazepam in comparison with blood or urine. This was also observed for zolpidem¹⁶ and flunitrazepam.¹⁷

The concentrations of tetrazepam in different biologic matrices, such as hair (123–176 pg/mg), are higher than those for other benzodiazepines after a single exposure, and this is possibly related to the dose (50 mg). For example, after a single exposure of 2.5 mg of lorazepam, Kintz et al¹⁸ were unable to detect the drug in hair despite a limit of quantification of 1 pg/mg. A single exposure to other benzodiazepines or hypnotics at therapeutic doses (<50 mg), such as bromazepam, flunitrazepam, clonazepam, zolpidem, or zopiclone, typically resulted in hair concentrations in the range 2–15 pg/mg.^{13,19–22}

CONCLUSION

To address some data on the detection time of tetrazepam following single oral doses, we have developed a sensitive, specific, and reproducible method for the detection and quantification of tetrazepam in human urine, oral fluid, beard, and hair. It was possible to detect a single dose of tetrazepam in all these matrices. Urine tested positive for tetrazepam over 236–240 hours (14–13 ng/mL), with a peak detected after 8–12 hours of exposure (2586–924 ng/mL). Oral fluid tested positive for tetrazepam over 515 minutes (2.5 ng/mL). Tetrazepam was detected in beard over 27 days (6.5 pg/mg). We were able to detect a single tetrazepam dose in hair from the head 4 weeks after intake (123–175 pg/mg). Tetrazepam was detected over the study time intervals, but it is probable that it could be

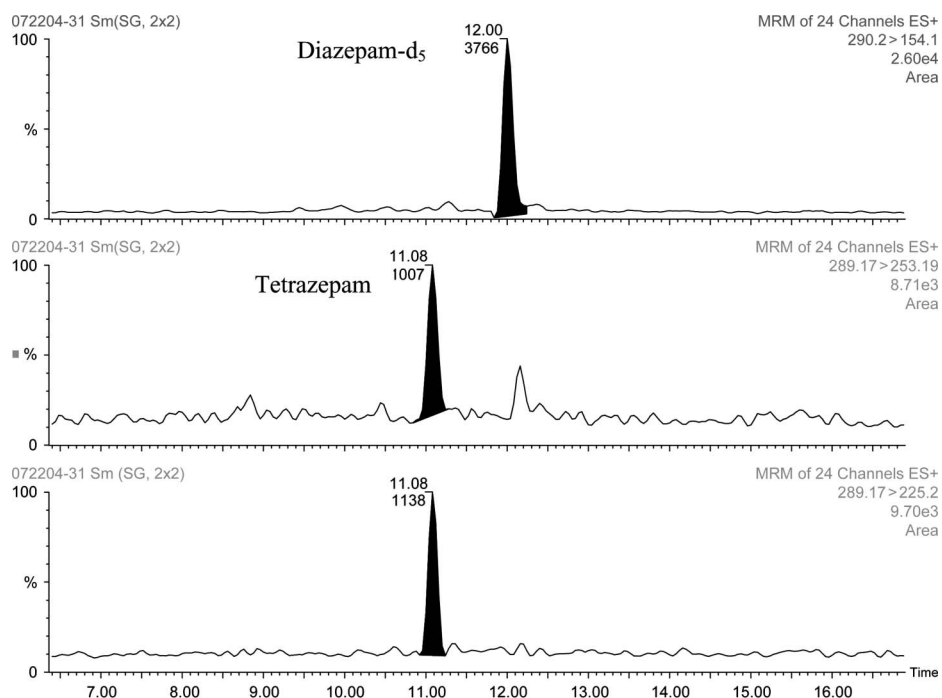


FIGURE 5. Chromatogram of beard hair sample extracts at a concentration of 15.3 ng/mL of tetrazepam after 6 days of single exposure.

detectable for a considerably longer time. With these results we will be able to document any drug-facilitated crime involving tetrazepam.

REFERENCES

1. Verstraete A. Detection times of drugs in blood, urine and oral fluid. *Ther Drug Monit.* 2004;26:200–205.
2. Baumgartner MG, Cautreels M, Langenbahn H. Biotransformation and pharmacokinetics of tetrazepam in man. *Arzneimittelforschung.* 1984;34:724–729.
3. Bun H, Philip F, Berger Y, et al. Plasma levels and pharmacokinetics of single and multiple dose of tetrazepam in healthy volunteers. *Arzneimittelforschung.* 1987;37:199–202.
4. Geister U, Gaupp M, Arnold P, et al. Bioavailability investigation of two different oral formulations of tetrazepam. *Arzneimittelforschung.* 2000;50:328–332.
5. Keane PE, Bachy A, Morre M, et al. Tetrazepam: a benzodiazepine which dissociates sedation from other benzodiazepine activities. II. In vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988;245:699–705.
6. Poyen B, Rodor F, Jouve-Bestagne MH, et al. Amnesia and behavior disorders of criminal appearance after ingestion of benzodiazepines. *Therapie.* 1982;37:675–678.
7. Bratzke H, Klug E. Drug-induced unconsciousness with subsequent criminal acts. *Arch Kriminol.* 1988;181:33–40.
8. LeBeau M, Hearn WL, Baselt R, et al. Recommendations for toxicological investigations of drug-facilitated sexual assaults. *J Forensic Sci.* 1999;44:227–230.
9. Samyn N, Verstraete A, van Haeren C, et al. Analysis of drugs of abuse in saliva. *Forensic Sci Rev.* 1999;11:1–19.
10. Kintz P, Cirimele V, Jamey C, et al. Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure. Application to document sexual assault. *J Forensic Sci.* 2003;48:195–200.
11. Goullé JP, Chèze M, Pépin G. Determination of endogenous levels of GHB in human hair. Are there possibilities for the identification of GHB administration through hair analysis in cases of drug-facilitated sexual assault? *J Anal Toxicol.* 2003;27:574–580.
12. Frison G, Favretto D, Tedschi L, et al. Detection of thiopental and pentobarbital in head and pubic hair in a case of drug-facilitated sexual assault. *Forensic Sci Int.* 2003;133:171–174.
13. Pépin G, Chèze M, Dufort G, et al. De l'intérêt des cheveux et de la spectrométrie de masse en tandem pour la soumission chimique: à propos de 9 cas. *Ann Toxicol Anal.* 2002;14:395–406.
14. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.* Beltsville, MD: US Department of Health and Human Services, 2001. Available at: <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm>. Accessed May 10, 2003.
15. Annesley T. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem.* 2003;49:1041–1044.
16. Kintz P, Villain M, Ludes B. Testing for zolpidem in oral fluid by LC-MS/MS. *J Chromatogr B.* 2004;811:59–63.
17. Samyn N, De Boeck G, Cirimele V, et al. Detection of flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam in oral fluid after controlled administration of Rohypnol. *J Anal Toxicol.* 2002;26:211–215.
18. Kintz P, Villain M, Cirimele V, et al. Windows of detection of lorazepam in urine, oral fluid and hair special focus on drug-facilitated crimes. *Forensic Sci Int.* 2004;145:131–135.
19. Chèze M, Villain M, Pépin G. Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC-MS/MS. Application to forensic cases of drug facilitated crimes. *Forensic Sci Int.* 2004;145:123–130.
20. Kintz P, Villain M, Ludes B. Testing for the undetectable in drug-facilitated sexual assault using hair—analyzed by tandem mass spectrometry—as an evidence. *Ther Drug Monit.* 2004;26:211–214.
21. Villain M, Chèze M, Tracqui A, et al. Testing for zolpidem in hair by LC-MS/MS. Application to DFSA cases. *Forensic Sci Int.* 2004;143:157–161.
22. Negrusz A, Moore CM, Hinkel KB, et al. Deposition of 7-aminoflunitrazepam and flunitrazepam in hair after a single dose of Rohypnol®. *J Forensic Sci.* 2001;46:1143–1145.

**FAST LC-MS/MS METHOD FOR THE DETERMINATION OF
AMPHETAMINE, METHAMPHETAMINE, MDA, MDMA, MDEA,
MBDB AND PMA IN URINE**

Marta Concheiro¹, Susana Maria dos Santos Sadler Simões², Óscar Quintela¹,
Ana de Castro¹, Mário João Rodrigues Dias², Angelines Cruz¹, Manuel López-
Rivadulla^{1*}

¹ Forensic Toxicology Service. Institute of Legal Medicine.

University of Santiago de Compostela. Spain.

C/ San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain.

² Forensic Toxicology Service, National Institute of Legal Medicine, Lisbon
department

Rúa Manuel Bento de Sousa, nº3, 1169-201 Lisbon, Portugal

*Corresponding author. Tel.: +34 981582327

Fax: +34 981580336

E-mail address: apimlrv@usc.es

Abstract

A fast method was designed for the simultaneous determination of amphetamine (A), methamphetamine (MA), PMA, MDA, MDMA, MDEA and MBDB in urine. The drugs were analyzed by LC(ESI)-MS/MS, after a simple liquid-liquid extraction in the presence of the deuterated analogues. Reverse phase separation on an Atlantis dC18 Intelligent Speed column was achieved in less than 4 minutes under gradient conditions, and the total run time was 8 minutes. The method was fully validated, including linearity (1-1000 mg/mL for A, MDMA, MDEA and MBDB; 2-1000 ng/mL for MDA and PMA; 1-200 ng/mL for MA; $r^2 > 0.99$ for all compounds), recovery ($>80\%$), within-day and between-day precision and accuracy (CV and MRE $< 12.7\%$ for intermediate level and ULOQ, and $<17.2\%$ for LLOQ), limit of detection (0.2 ng/mL for MDMA, MDEA and MBDB; 0.5 ng/mL for A, MA and PMA; 1 ng/mL for MDA) and quantitation (1 ng/mL for A, MA, MDMA, MDEA and MBDB; 2 ng/mL for MDA and PMA) and relative ion intensities. No matrix effect was observed. The procedure showed to be sensitive, specific and rapid, and was applied to real forensic cases.

Keywords: amphetamine, MDMA, PMA, LC-MS/MS, urine

1. Introduction

Amphetamine (A), a stimulant drug known for many decades, has been used as a nasal decongestant, an appetite suppressant or to combat fatigue. Nevertheless, its medical uses are now limited. Methamphetamine (MA), one of the most common amphetamines, is better known as “speed”, “crank”, “crystal”, “ice”, “go”, “meth” and “oxblood”. Designer amphetamines are chemically related to amphetamine, include methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methylenedioxyethylamphetamine (MDEA), N-methyl-benzodioxazolylbutanamine (MBDB) and 4-methoxyamphetamine (PMA). The street names for these drugs are “ecstasy”, “adam”, “eve” or “love pill” [1]. These designer amphetamines have also been classified as entactogens, drugs that enhance communication, understanding and empathy [2]. All of them are considered stimulants with a high potential for abuse [1].

According to the Annual report 2005 of the European monitoring center for drugs and drug addiction (EMCDDA), the surveys conducted in the population of the European countries showed an increase in amphetamine and ecstasy consumption. In Spain and Portugal, the lifetime prevalence use of amphetamine and ecstasy among young adults (15 to 34 years) was 2.5% and 0.3% for amphetamine, and 8% and 1.6% for ecstasy, respectively [3].

The excretion of amphetamine and related stimulants mainly occurs in urine, where substantial amounts of unchanged drug are present, especially in acidic urine [1]. Methamphetamine is metabolized to the demethylated active metabolite amphetamine, and MDMA and MDEA to MDA [4].

In a laboratory of forensic toxicology, the typical analysis for these drugs involves an immunoassay screening method, and the confirmation and quantitation of the positive cases by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) or high performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The amphetamine immunoassays can not differentiate between the amphetamine analogues (e.g. MDMA, MDA, MDEA), and some false-positive results occur because of anorectics, other stimulants, other drugs [5] or even degradation amines presents in urine from corpses.

As a confirmatory method, GC-MS has been the most widely used [6-20], but in this technique a derivatization step is required, which is time consuming. LC-MS is an interesting alternative, offering highest sample throughput and less sample manipulation. In the literature, several LC-MS methods for the determination of amphetamine and some of its analogues (MA, MDA, MDMA, MDEA or PMA) in urine were found [21-28]. In plasma, another very important biological matrix, different LC-MS methods for the determination of amphetamines and designer drugs have been published [24,27,29-32]. Nevertheless these modern techniques, traditionally the most widely used technique for the determination of designer drugs by high performance liquid chromatography (HPLC), was HPLC with fluorescence detection [33-40].

We have developed and full validated a simple and rapid LC-MS/MS method, for the simultaneous determination of the seven most common abuse amphetamines (amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB and PMA) in urine, after liquid-liquid extraction, with a chromatographic separation achieved in less than 4 minutes, and total run time of 8 minutes. This

method was applied to all amphetamine positive cases in the National Institute of Legal Medicine of Portugal, Lisbon department, between 2003 and 2005.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Amphetamine, methamphetamine, PMA, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, MDMA-d₅ and MBDB-d₅, were obtained in the solid form from Lipomed (Arlesheim, Switzerland). Amphetamine-d₆ and MDA-d₅ in methanol at 1 g/L were obtained from Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Formic acid (98-100%), acetonitrile, water, methanol, hydrochloric acid 25%, diethylether and sodium hydroxide were from Merck (Darmstadt, Germany). Ammonium formate was from Fluka (Steinheim, Switzerland). All chemicals and solvents were at least of analytical grade.

A pH 3.0 ammonium formate buffer was prepared by mixing 1mL of ammonium formate 1M (dissolving ammonium formate 3,153 g in 50 mL of water) and 0.5 mL of formic acid, and adding water until 500 mL. Drug-free urine was obtained from healthy volunteers.

A mixture methanol:hydrochloric acid (MeOH:HCl, 99:1, v/v), was prepared by mixing 9.9 mL of methanol and 0.1 mL of hydrochloric acid 25%.

2.2. Preparation of stock solutions and standards

Stock solutions of amphetamine, methamphetamine, PMA, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, MDMA-d₅ and MBDB-d₅ were prepared at 1 g/L in methanol and were kept at -20°C in the dark for a maximum of 6 months. Each day, working solutions containing amphetamine, methamphetamine, PMA, MDA, MDMA, MDEA and MBDB at 0.01 mg/L, 0.1 mg/L, 1 mg/L and 10 mg/L were prepared

by appropriate dilution with methanol. The working solutions of the internal standards (IS), mixture of amphetamine-d₆, MDA-d₅, MDMA-d₅ and MBDB-d₅ at 1 mg/L, were prepared by appropriate dilution with methanol.

2.3. Specimens

Urine samples were frozen at -20°C until analysis.

2.4. Sample preparation

To 0.5 mL of urine were added 50 µL of a 1 mg/L IS solution, 0.5 mL of NaOH 1N and 3 mL of diethyl ether, in a 10 mL borosilicate tube. The tubes were rolled during 15 minutes, and centrifuged at 3500 rcf for 10 minutes. The organic phase was transferred to a 10 mL borosilicate tube. Before evaporating to dryness at 35°C under a stream of nitrogen, 100 µL of MeOH:HCl (99:1, v/v), were added to the sample, in order to prevent amphetamines evaporation. The dry extract was reconstituted in 100 µL of a pH 3.0 ammonium formate buffer, and 10 µL were injected into the chromatographic system.

2.5. Liquid chromatography/mass spectrometry

The HPLC system was a Waters Alliance 2795 separation module with a Waters Alliance series column heater (Waters, Milford, MA, USA). Chromatographic separation was performed with an Atlantis dC18, 3 µm 2.1x20 mm Intelligent SpeedTM column. The mobile phase, delivered at a flow rate of 0.5 mL/min at 22°C, was a gradient of acetonitrile and a pH 3.0 ammonium formate buffer, programmed as follows: 0% acetonitrile was increased to 10% in 2 minutes, isocratic for 1.5 minutes, increase of acetonitrile to 100% in 1 minute, followed by a decrease to 0% in 0.5 minutes. Equilibration time was 3 minutes prior to the next injection. Total run time was 8 minutes.

The detection was performed by using a Quattro microTM API ESI triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) fitted with a Z-spray ion interface. The instrument was operated in electrospray in positive ionization mode (ESI+). Best results were obtained with a capillary voltage of 3 kV, source block temperature of 130°C, and desolvation gas (nitrogen) heated to 400°C and delivered at 800 L/h. No cone gas was used. Collision cell pressure was 3×10^{-6} Bar of argon. Data were recorded in the selected reaction monitoring (SRM) mode. A post-column infusion system was used to optimize ionization for all target compounds and internal standards. The mobile phase (pH 3.0 ammonium formate buffer/Acetonitrile, 50/50) was delivered into the electrospray interface at a rate of 0.2 mL/min, while analyte at 10 mg/L was being infused post-column through a dead volume tee, by using a syringe pump at 10 μ L/min. The precursor ions, product ions, cone voltage and collision energy obtained are presented in table 1. The MS method was divided in three SRM functions to obtain at least 18 acquisition points per peak.

Data acquisition, peak integration and calculation were interfaced to a computer workstation running MassLynx NT 4.0 and QuanLynx 4.0 software.

2.6. Validation

The analytical validation was performed according to the recommendations of Shah et al. [41], Peters and Maurer [42] and the Commission of the European Communities [43].

The specificity of the method was evaluated by analysing urine from 10 healthy non-drug-consuming subjects.

Linearity was obtained with an average determination coefficient (r^2) > 0.99 over a range from the lower limit of quantitation (LLOQ) up to the upper limit of quantitation (ULOQ). A weighting factor $1/x$ was used.

Within-day precision and accuracy were determined at three concentration levels (the LLOQ, the ULOQ and an intermediate level) by preparing and analysing on the same day six replicates for each level. Between-day precision and accuracy were assessed by analysing on six different days a set of urine samples spiked at 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 and 1000 ng/mL. Precision, expressed as the coefficient of variation (CV) of the measured values, was expected to be less than 15% for all concentration levels, except for the LLOQ, for which 20% was acceptable. In the same way, accuracy was evaluated by using the mean relative error (MRE), measured as a percentage deviation from the accepted reference value, which had to be less than 15% for all concentration levels, except for the LLOQ, for which 20% was acceptable.

The limit of detection (LOD) was defined as the lowest concentration of the drug resulting in a signal-to-noise ratio of 3:1, for the ion of quantitation and for the ion of confirmation. LLOQ was defined as the lowest concentration yielding within-day and between-day CV and MRE less than 20%.

Recoveries were determined in triplicate at an intermediate level (50 ng/mL) for each compound in urine. Three blank samples were fortified with the appropriate amount of each compound. These fortified samples and three blank samples were extracted as previously described. The dry extracts of the fortified samples were re-dissolved in 100 μ L of the reconstitution solvent containing the IS, and the blank samples were re-dissolved in 100 μ L of the reconstitution solvent containing the nominal amounts of the compounds and the IS. The latter

were used as neat standards, so that any ion suppression effect caused by that matrix would not be included in the recovery calculation.

The ion suppression effect on the ESI response was evaluated according to the next procedure [44]: nine drug-free urine samples from different sources were extracted as described previously. The extracts were then fortified with all drugs at a concentration of 50 ng/mL. Three reference solutions in pH 3.0 ammonium formate buffer were also fortified with all drugs to the same nominal concentration. The reconstituted extracts and the reference solutions were injected into the LC-MS/MS system. Peak areas obtained from the extracts were compared with the corresponding peak areas produced by the reference solutions. The ion suppression percentage was calculated as follows: (mean peak area "reconstituted extract in urine" – mean peak area "reference solution") x 100 / mean peak area "reference solution".

Relative intensities of the detected ions were expressed as a percentage of the intensity of the quantitation trace (relative ion intensities = intensity of secondary trace x 100 / intensity of quantitation trace). The maximum permitted tolerance for relative ion intensities is: $\pm 20\%$ (relative ion intensities $> 50\%$), $\pm 25\%$ (relative ion intensities $>20\%-50\%$), $\pm 30\%$ (relative ion intensities $> 10\%-20\%$), $\pm 50\%$ (relative ion intensities $\leq 10\%$).

The urine samples above the upper limit of quantitation (ULOQ) were diluted with drug-free urine.

Carry-over effect was assayed by analyzing blank samples after a high positive sample (60000 ng/mL of each compound) and checking that in the blank samples the compounds were not detected.

The method was applied to nine real forensic cases which tested positive for amphetamines in urine by immunoassay (Syva ® RapidTest d.a.u. ® AMP and mAMP, Dade Behring, Cupertino, CA, USA) and confirmed in blood by GC-MS.

3. Results

The ion chromatograms of the 7 amphetamines are shown in Figure 1. The retention times and the selected precursor and product ions are reported in Table 1. Likewise, their respective optimised cone voltages and collision energies are shown in the same table.

Under the chromatographic conditions used, there was no interference with any extractable endogenous compound of urine samples.

The linearity of the compound-to-IS peak ratio versus the theoretical concentration was verified in urine by using a 1/x weighted linear regression. The determination coefficients were above 0.99 and the curvature was tested on a set of six calibration curves. The within-day precision and accuracy, as well as the between-day precision and accuracy were satisfactory for all tested concentrations. Recovery at 50 ng/mL was > 80% for all compounds. These results and the relative ion intensities obtained are summarized in Table 2.

The limit of detection (LOD) was 0.2 ng/mL for MDMA, MDEA and MBDB, 0.5 ng/mL for amphetamine, methamphetamine and PMA, and 1 ng/mL for MDA. The LLOQ and ULOQ, which correspond to the lowest and the highest concentration level of the calibration range were 1 and 1000 ng/mL for amphetamine, MDMA, MDEA and MBDB, 2 and 1000 ng/mL for MDA and PMA, and 1 and 200 ng/mL for methamphetamine.

No relevant ion suppression effect was observed, because it was < 15% in all the cases (Table 3).

Needle wash between injections was carried out with methanol and carry-over effect was not detected.

This method was applied to all amphetamine positive cases in the National Institute of Legal Medicine of Portugal, Lisbon department, between 2003 and 2005. The results obtained are in Table 4. Figure 2 shows a chromatogram of a real case which tested positive to MDA, MDMA and MDEA.

4. Discussion

The ionization technique used was ESI in positive mode. Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) assays were done, but the signal obtained was very low compared to ESI. In the literature, APCI [24-26] has been used successfully, but in some cases a derivatization step was used [24]. Other ionization techniques applied were sonic spray ionization [27] and surface-activated chemical ionization [28]. The LC-ESI-MS methods published [21-23] used as mass spectrometer a simple quadrupole [21,22], or an ion trap [23]. In this method a triple quadrupole was used.

In the development of this method, a simple LLE was chosen since it provides relatively clean extracts, especially if a pH adjustment is applied [45,46]. LLE has been used in the case of amphetamines [24,26,27], but these methods used a different extraction solvent [27], or larger amounts of extraction solvent and of urine (10 mL of diethyl ether and 1 mL of urine [24], 5 mL of diethyl ether and 2 mL of urine [26]).

This method achieves a short chromatography for these molecules. Up to date, in the methods reviewed, the chromatography separation was achieved in more than 10 minutes, and the methods with less time of separation (<7 minutes) only determine MDMA and MDA [25], or A, MA, MDA, MDMA and MDEA [21]. MBDB detection has not been done in any reviewed urine method [21-28].

Real amphetamine positive urines were analysed using this method. MDMA is the most common designer amphetamine, found in all the cases. No positive cases to MBDB and PMA were found. MDA is considered as metabolite of MDMA if its concentration is a 10-15% of MDMA concentration [47]. MDA is also a metabolite of MDEA.

5. Conclusion

A fast method was developed and full validated for the determination of amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB and PMA in urine, by LC(ESI)-MS/MS after a simple liquid-liquid extraction. The chromatographic separation was achieved in less than 4 minutes, with a total run time of 8 minutes. The method was successfully applied to real forensic cases.

6. Acknowledgements

This work was done thanks to the financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (F.P.U. Grant number AP-2002-2935 and AP-2002-2878).

7. References

- [1] O.H. Drummer, M. Odell, The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse, Arnold, London, 2001.
- [2] D.E. Nichols, Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB, and the classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogens, J Psychoactive Drugs 18 (1986) 305-313.
- [3] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Annual report 2005, <http://www.emcdda.eu.int/>.
- [4] R. de la Torre, M. Farré, M. Navarro, R. Pacifici, P. Zuccaro, S. Pichini, Clinical Pharmacokinetics of Amphetamine and related substances: Monitoring in Conventional and Non-Conventional Matrices Clin. Pharmacokinet. 43 (2004) 157-185.
- [5] A.G. Verstraete, F.V. Heyden, Comparision of the Sensivity and Specificity of Six Immunoassays for the Detection of Amphetamines in Urine, J. Anal. Toxicol. 29 (2005) 359-364.
- [6] B.K. Gan, D. Baugh, R.H. Liu, A.S. Walia, Simultaneous analysis of amphetamine, methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in urine samples by solid-phase extraction, derivatization, and gas chromatography/mass spectrometry, J. Forensic Sci. 36 (1991) 1331-1341.
- [7] E.M. Thurman, M.J. Pedersen, R.L. Stout, T. Martin, Distinguishing sympathomimetic amines from amphetamine and methamphetamine in urine by gas chromatography/mass spectrometry, J. Anal. Toxicol. 16 (1992) 19-27.
- [8] P. Dallakian, H. Budzikiewicz, H. Brzezinka, Detection and quantitation of amphetamine and methamphetamine: electron impact and chemical ionization

with ammonia-comparative investigation on Shimadzu QP 5000 GC-MS system, J. Anal. Toxicol. 20 (1996) 255-261.

[9] H.K. Ensslin, K.A. Kovar, H.H. Maurer, Toxicological detection of the designer drug 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDE, 'Eve') and its metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay, J. Chromatogr. B 683 (1996) 189-197.

[10] R. Kronstrand, Identification of N-methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamine (MBDB) in urine from drug users, J. Anal. Toxicol. 20 (1996) 512-516.

[11] F. Centini, A. Masti, I. Barni Comparini, Quantitative and qualitative analysis of MDMA, MDEA, methamphetamine and amphetamine in urine by headspace/solid phase microextraction (SPME) and GC/MS, Forensic Sci. Int. 83 (1996) 161-166.

[12] P. Kintz, Excretion of MBDB and BDB in urine, saliva, and sweat following single oral administration, J. Anal. Toxicol. 21 (1997) 570-575.

[13] D. Hensley, J.T. Cody, Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxymethamphetamine (MDMA), and methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) enantiomers by GC-MS, J. Anal. Toxicol. 23 (1999) 518-523.

[14] H.G. Ugland, M. Krogh, K.E. Rasmussen, Automated determination of 'Ecstasy' and amphetamines in urine by SPME and capillary gas chromatography after propylchloroformate derivatization, J. Pharm. Biomed. Anal. 19 (1999) 463-475.

- [15] C. Jurado, M.P. Giménez, T. Soriano, M. Menéndez, M. Repetto, Rapid analysis of amphetamine, methamphetamine, MDA and MDMA in urine using solid-phase microextraction, direct on-fiber derivatization, and analysis by GC-MS, *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 11-16.
- [16] N. Pizarro, J. Ortuño, M. Farré, C. Hernández-López, M. Pujadas, A. Llebaría, J. Juglar, P.N. Roset, M. Mas, J. Segura, J. Camí, R. de la Torre, Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry and análisis of enantiomers by capillary electrophoresis, *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 157-165.
- [17] M. Pellegrini, F. Rosati, R. Pacifici, R. Zuccaro, F.S. Romolo, A. López, Rapid screening method for determination of Ecstasy and amphetamines in urine samples using gas chromatography-chemical ionisation mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 769 (2002) 243-251.
- [18] P.R. Stout, C.K. Horn, K.L. Klette, Rapid simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine in urine by solid-phase extraction and GC-MS: a method optimized for high-volume laboratories, *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 253-261.
- [19] Z. Huang, S. Zhang, Confirmation of amphetamine, methamphetamine, MDA and MDMA in urine samples using disk solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry after immunoassay screening, *J. Chromatogr. B* 792 (2003) 241-7.
- [20] K.L. Klette, M.H. Jamerson, C.L. Morris-Kukoski, A.R. Kettle, J.J. Snyder, Rapid simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-

methylenedioxyamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, *J. Anal. Toxicol.* 29 (2005) 669-674.

[21] H. Kataoka, H.L. Lor, J. Pawliszyn, Simple and Rapid Determination of Amphetamine, Methamphetamine, and Their Methylenedioxy Derivatives in Urine by Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled with Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 257-265.

[22] K.M. Jenkins, M.S. Young, C.R. Mallet, A.A. Elan, Mixed-Mode Solid Phase Extraction Procedures for the Determination of MDMA and Metabolites in Urine Using LC-MS, LC-UV, or GC-NPD, *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 50-58.

[23] TY Wu, MR Fuh, Determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in urine by online solid-phase extraction and ion-pairing liquid chromatography with detection by electrospray tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 775-780.

[24] M.J. Bogusz, M. Kala, R.D. Maier, Determination of phenylisothiocyanate Derivatives of Amphetamine and its Analogues in Biological Fluids by HPLC-APCI-MS or DAD, *J. Anal. Toxicol.* 21 (1997) 59-69.

[25] H.K. Nordgren, O. Beck, Direct Screening in Urine for MDMA and MDA by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 1-5.

[26] K. Deventer, P. Van Eenoo, F.T. Delbeke, Screening for amphetamine and amphetamine-type drugs in doping analysis by liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 877-882.

- [27] K.A. Mortier, R. Dams, W.E. Lambert, E.A. De Letter, S. Van Calenbergh, A.P. De Leenheer, Determination of paramethoxyamphetamine and other amphetamine-related designer drugs by liquid chromatography/sonic spray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 865-870.
- [28] S. Cristoni, L.R. Bernardi, P. Gerthoux, E. Gonella, P. Mocarelli, Surface-activated chemical ionization ion trap mass spectrometry in the analysis of amphetamines in diluted urine samples, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 1847-1855.
- [29] M.J. Bogusz, K.D. Krüger, R.D. Maier, Analysis of underivatized amphetamines and related phenethylamines with high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 77-84.
- [30] M. Wood, G. De Boeck, N. Samyn, M. Morris, D.P. Cooper, R.A. Maes, E.A. De Bruijn, Development of a Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Amphetamines in Human Plasma and Oral Fluid by LC-MS/MS, *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 78-87.
- [31] H.P. Hendrickson, A. Milesi-Hallé, E.M. Laurenzana, S.M. Owens, Development of a liquid chromatography-mass spectrometric method for the determination of methamphetamine and amphetamine using small volumes of rat serum, *J. Chromatogr. B* 806 (2004) 81-87.
- [32] M. Concheiro, A. de Castro, O. Quintela, M. López-Rivadulla, A. Cruz, 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* 832 (2006) 81-89.

- [33] F. Sadeghipour, J.-L. Veuthey, Sensitive and selective determination of methylenedioxyated amphetamines by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatogr. A* 787 (1997) 137-143.
- [34] R. Herráez-Hernández, P. Campís-Falcó, J. Verdú-Andrés, Sensitive determination of methylenedioxyated amphetamines by liquid chromatography. *Analyst* 126 (2001) 581-586.
- [35] K. Clauwaert, J. Van Bocxlaer, E. De Letter, S. Van Calenbergh, W. Lambert, A. De Leenheer, Determination of the designer drugs 3,4-methylenedioxymethamphetamine, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, and 3,4-methylenedioxyamphetamine with HPLC and fluorescence detection in whole blood, serum, vitreous humor, and urine. *Clin. Chem.* 46 (2000) 1968-77.
- [36] J. da Costa, A. da Matta Chasin, Determination of MDMA, MDEA and MDA in urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* 811 (2004) 41-45.
- [37] F. Tagliaro, Z. De Battisti, A. Groppi, Y. Nakahara, D. Scarcella, R. Valentín, M. Marigo. High sensitivity simultaneous determination in hair of the major constituents of ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine) by high-performance liquid chromatography with direct fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* 723 (1999) 195-202.
- [38] A. Kaddoumi, R. Kikura-Hanajiri, K. Nakashima, High-performance liquid chromatography determination of 3,4-methylenedioxymetamphetamine, methamphetamine and their metabolites in human hair using DIB-Cl as a label. *Biomed. Chromatogr.* 18 (2004) 202-4.

- [39] R. Mancinelli, S. Gentili, M. Guiducci, T. Macchia, Simple and reliable high-performance liquid chromatography fluorimetric procedure for the determination of amphetamine-derived designer drugs. *J. Chromatogr. B* 735 (1999) 243-53.
- [40] M. Concheiro, A. de Castro, O. Quintela, M. López-Rivadulla, A. Cruz, Determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in oral fluid using high performance liquid chromatography with native fluorescence detection, *Forensic Sci. Int.* 150 (2005) 221-226.
- [41] V.P. Shah, K.K. Mida, J.W.A. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, J.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonnelli, C.T. Viswanattan, A. Jacobi, Bioanalytical Method Validation-A Revisit with a Decade of Progress, *Pharm. Res.* 17 (2002) 1551-1557.
- [42] F.T. Peters, H.H. Maurer, Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology-A review, *Accred. Qual. Assur.* 7 (2002) 441-449.
- [43] European Union Decision 2002/657/EC 17.8.2002, *Off. J. Eur. Commun.* 221 (2002) 8-36.
- [44] T. Annesley, Ion Suppression in Mass Spectrometry, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1041-1044.
- [45] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Matrix effect in quantitative LC/MS/MS Analyses of biological fluids: A Method for Determination of Finasteride in Human Plasma at Picogram Per Milliliter Concentrations, *Anal. Chem.* 70 (1998) 882-889.
- [46] R. Bonfiglio, R.C. King, T.V. Olah, K. Merkle, The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response

for model drug compounds, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1175-1185.

[47] G.W. Kunsman, B. Levine, J.J. Kuhlman, R.L. Jones, R.O. Hughes, C.I. Fujiyama, M.L. Smith; MDA-MDMA concentrations in urine specimens, *J. Anal. Toxicol.* 20 (1996) 517-521.

Table 1. LC(ESI)-MS/MS parameters, retention time and corresponding IS.

Compound	SRM Function (time window)	Precurs or ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone (V)	Collision energy (eV)	Retention time (min)	IS
Amphetamine	Function 1: 3 transitions	135.9	90.6 118.9	15 15	15 10	2.27	A-d ₆
Amphetamine-d ₆	(0-2.6min)	142.2	92.7	15	15	2.24	
Methamphetamine	Function 2: 10 transitions	150.1	90.6 119.1	20 20	15 10	2.62	MDMA-d ₅
PMA	(2.4-3.3min)	166.1	120.9 149	15 15	20 10	2.92	A-d ₆
MDA		180.1	104.7 163.1	15 15	22 10	2.77	MDA-d ₅
MDA-d ₅		185.2	168.1	15	10	2.75	
MDMA		194.2	104.5 163	20 20	22 12	2.97	MDMA-d ₅
MDMA-d ₅		199.2	165.1	20	12	2.97	
MDEA	Function 3: 5 transitions	208.2	104.7 162.9	20 20	25 12	3.34	MBDB-d ₅
MBDB	(3.1-8min)	208.2	134.8 176.9	20 20	20 10	3.72	MBDB-d ₅
MBDB-d ₅		213.3	136	20	20	3.70	

*Quantitation product ions are in bold characters.

Table 2. Validation results for the 7 amphetamines.

Compound	Concentration (ng/mL)	Recovery (%)	Within-day precision and accuracy (n=6)			Between-day precision and accuracy (n=6)			Relative ion intensities (n=6)	
			Mean value	CV	MRE	Mean value	CV	MRE	Mean value	CV
Amphetamine	1		0.9	14.3	-5.8	0.8	3.8	-16.5	43.5	14.4
	2					2	10.1	0.3	41.7	16.3
	5					4.9	3.4	-2.9	40	17.7
	10					10.5	5.3	5.2	43.5	8
	20					21.8	3.6	9	43.5	8.8
	50	86.9	49.2	2.3	-1.7	49.8	4	-0.5	43.5	4.7
	100					102.9	2.6	2.9	45.5	4.5
	200					211.7	4.6	5.8	45.5	7.3
	500					481.8	3.4	-3.7	45.5	4.8
	1000		992.7	2	-0.7	1002	2	0.2	47.6	3.6
Slope = 1.0057 ± 0.0444 ; Intercept = 0.4344 ± 0.2918 ; $r^2 = 0.9984 \pm 0.0009$										
Methamphetamine	1		0.9	11.1	-8	0.9	7.7	-13.2	19.6	34
	2					2	7.9	1.3	19.6	31.4
	5					4.8	7.3	-3.3	20.4	33.5
	10					10.3	6.8	3	21.3	23.9
	20					22.6	4.6	12.7	22.7	25.6
	50	92.1	47.9	2.3	-4.2	50.3	3	0.6	23.3	18.6
	100					100	2	0	26.3	17
	200		183.3	6.1	-8.4	197.1	1.1	-1.5	28.6	12.9
Slope = 1.4912 ± 0.1179 ; Intercept = 0.4383 ± 0.321 ; $r^2 = 0.9983 \pm 0.001$										
MDA	2		1.8	9.2	-9.3	1.8	7.3	-9.8	38.5	14.4
	5					4.6	4.9	-8.3	34.5	4
	10					10.2	4.1	2.2	33.3	5.1
	20					21.8	2.4	9.2	33.3	4.9
	50	85.9	48.9	3.2	-2.2	49.1	5.7	-1.8	32.3	3.4
	100					105.4	3.4	5.4	32.3	1.3
	200					212.5	4.8	6.2	33.3	4
	500					487.9	3.1	-2.4	32.3	2
	1000		1001.8	1.5	0.2	993.7	2.4	-0.6	32.3	1.6
Slope = 0.7493 ± 0.0307 ; Intercept = 0.3690 ± 0.35 ; $r^2 = 0.9982 \pm 0.0008$										

(Continues)

Compound	Concentration (ng/mL)	Recovery (%)	Within-day precision and accuracy (n=6)			Between-day precision and accuracy (n=6)			Relative ion intensities (n=6)	
			Mean value	CV	MRE	Mean value	CV	MRE	Mean value	CV
PMA	2		1.9	5.2	-6.7	1.8	9.5	-10	200	32.3
	5					4.6	5.2	-8.3	166.6	18.3
	10					10.4	6.5	4.1	142.9	12.2
	20					21.2	5.4	6	142.9	14.4
	50	81.1	48.5	4.8	-2.9	50.6	4.8	1.1	142.9	0
	100					106.4	2.6	6.4	142.9	5.7
	200					212.2	4.9	6.1	142.9	9
	500					467.1	4.3	-6.6	142.9	0
	1000		954.3	3.51	-4.6	1012.8	2.5	1.3	142.9	5.7
Slope = 0.3132 ± 0.0335 ; Intercept = 0.1821 ± 0.1463 ; $r^2 = 0.9969 \pm 0.0018$										
MDMA	1		0.8	8.1	-16.8	1	11.9	-3.3	29.4	12.6
	2					2	7.2	-0.1	28.6	10.5
	5					4.7	4.5	-5.2	28.6	9.1
	10					9.9	3.4	-0.6	29.4	4.2
	20					21.4	4.1	6.8	29.4	7.6
	50	88.8	45.7	2.6	-8.6	48.6	4.3	-2.8	28.5	4
	100					102.5	4.9	2.5	29.4	2.6
	200					212.9	2.9	6.4	30.3	3.5
	500					479.9	2.5	-4	29.4	2.2
	1000		991.6	1.8	-0.8	1005.2	2.1	0.5	29.4	1.2
Slope = 0.9496 ± 0.0439 ; Intercept = 0.0504 ± 0.2129 ; $r^2 = 0.9984 \pm 0.0007$										
MDEA	1		0.9	5	-5.8	0.9	7.4	-13.3	41.7	13.2
	2					2.1	10.5	2.8	40	13.5
	5					4.8	6.6	-3.7	40	7.3
	10					10.6	3.4	6.2	38.5	8.6
	20					21.4	4	6.9	38.5	4.9
	50	88.3	48.1	3.2	-3.8	47.7	7.4	-4.6	38.5	4.5
	100					103.2	5.6	3.2	37	3.1
	200					213.2	5.2	6.6	37	3
	500					475	5.1	-5	35.7	3.8
	1000		1004.8	7.5	0.5	1009.2	3.3	0.9	35.7	4.2
Slope = 1.3052 ± 0.0415 ; Intercept = 0.2675 ± 0.2621 ; $r^2 = 0.9970 \pm 0.0013$										

(Continues)

MBDB	1		0.8	4.5	-17.2	0.9	9.2	-6.3	50	2
	2					2.1	4.2	6.8	50	2.5
	5					4.7	3.8	-6.7	50	2.1
	10					10.1	2.7	0.8	52.6	2.1
	20					21.4	3.5	6.7	50	2.8
	50	88.5	46.6	2.1	-6.9	47.9	4.6	-4.2	50	2.1
	100					101.2	3.6	1.2	52.6	2.7
	200					212.9	3.2	6.5	52.6	2.1
	500					464.9	4.6	-7	52.6	2.2
	1000		1004.3	2.9	0.4	1021.7	1.9	2.2	52.6	4

Slope = 1.2179 ± 0.0286 ; Intercept = 0.1254 ± 0.1312 ; $r^2 = 0.997 \pm 0.0021$

Table 3. Results of ion suppression studies.

Compound	Reference solution (n=3)		Reconstitutes urine extract (n=9)		Ion suppression (%)
	Mean peak area	CV	Mean peak area	CV	
Amphetamine	82845.3	4.5	71341	5.6	-13.9
Methamphetamine	163348.3	2.1	145707.9	6.6	-10.8
MDA	26589	6.1	29191.7	10.3	9.8
PMA	19490	3.8	21577.2	8.4	10.7
MDMA	83572	4.2	90077.4	8	7.8
MDEA	178239.7	2.6	170137.9	6.7	-4.6
MBDB	163972.7	3.4	148943.2	6.3	-9.2

Table 4. Analytical results of the positive cases, indicating sex, age, quantitative results of the corresponding amphetamine in urine and additional analytical results and information of the case.

Case	Sex / Age	Amphetamines in urine samples (ng/mL)	Analytical results in blood samples (ng/mL)	Additional information
1/2003	Male, 25 years	MDA = 3050 MDMA = 59990 MDEA = 10210	MDA = 66 MDMA = 122 MDEA = 82 Ethanol = 0.69 g/L	Alive Traffic accident (pedestrian)
2/2003	Male, 20 years	MA = 19.6 MDA = 255.3 MDMA = 24860	MDA = 60 MDMA = 60 Benzoylecgonine = 100	Dead by precipitation
3/2003	Male, 29 years	A = 258 MA = 7 MDA = 878 MDMA = 9223	No sample available	Alive Traffic accident (driver)
4/2003	Male, 27 years	MDA = 417 MDMA = 4783	MDMA = 87	Alive Traffic accident (driver)
5/2003	Male, 29 years	A = 2.1 MDA = 1490 MDMA = 33480 MDEA = 60.5	MDA = 22 MDMA = 673	Alive Traffic accident (driver)
1/2004	Male, 26 years	MDA = 3030 MDMA = 151480	MDA = 12 MDMA = 549 Benzoylecgonine = 64	Alive Traffic accident (driver)

(Continues)

2/2004	Female, 17 years	MDA = 2330 MDMA = 60910	No sample available	Alive Sexual assault
1/2005	Female, 39 years	MA < LOQ MDA = 236.4 MDMA = 455.9	MDA = 9 MDMA = 14 Ethanol = 1.69 g/L	Alive Traffic accident (driver)
2/2005	Male, 28 years	A = 31.9 MA = 40.5 MDA = 3680 MDMA = 51960 MDEA = 246.4	MDA = 22 MDMA = 277	Alive Traffic accident (driver)

Legends

Figure 1. LC-MS/MS quantitative transition chromatograms of a urine spiked at 2 ng/mL for all studied compounds.

Figure 2. LC-MS/MS chromatogram of a real case (1/2003). The figure shows the total ion current (a), and the two selected transitions for MDA, MDMA and MDEA (b). The urine was diluted 1:100.

Figure 1

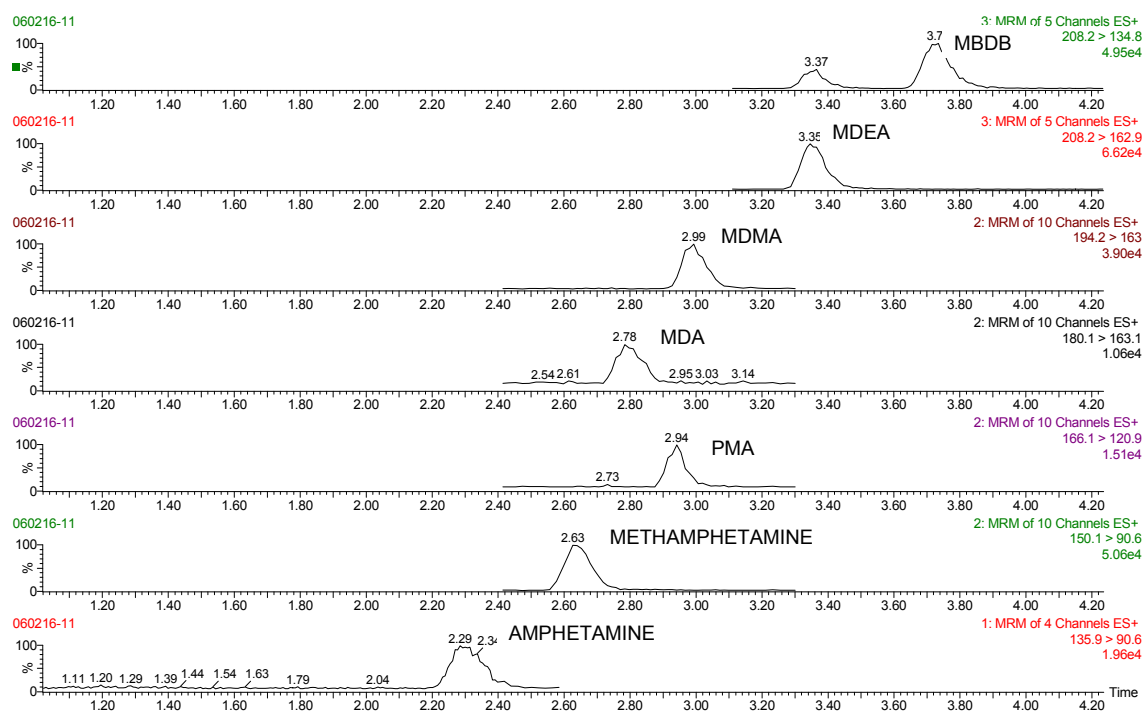
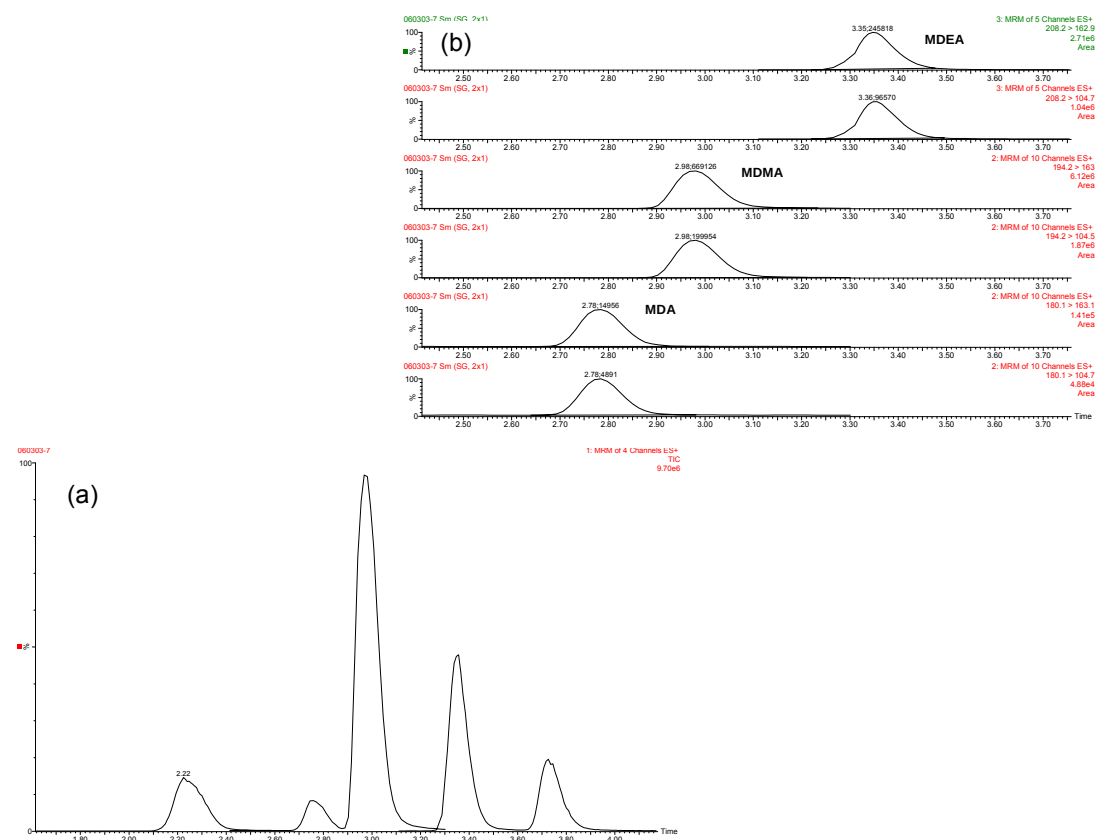


Figure 2



**CONFIRMATION BY LC-MS OF DRUGS IN ORAL FLUID
OBTAINED FROM ROAD SIDE TESTING**

Marta Concheiro, Ana de Castro, Óscar Quintela, Angelines Cruz, Manuel
López-Rivadulla*

Forensic Toxicology Service. Institute of Legal Medicine.

University of Santiago de Compostela. Spain.

C/ San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain.

*Corresponding author. Tel.: +34 981582327

Fax: +34 981580336

E-mail address: apimlriv@usc.es

Abstract

The aim of this study was to assess the effectiveness of two current onsite oral fluid drug detection devices (OraLab and Dräger), as part of the Spanish participation in the Roadside Testing Assessment Project (ROSITA Project). The study was done in collaboration with the Spanish Traffic Police, in Galicia (NW Spain), during 2004 and 2005. A total of 468 drivers selected at the police controls agreed to participate through informed consent. In addition, saliva samples were collected and sent to the Laboratory to confirm the onsite results. For this purpose, two different analytical LC-MS methods were used to detect 11 drugs or metabolites in a 300 μ L sample. Simultaneous analysis of morphine, 6-monoacetylmorphine, amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, cocaine and Benzoylecgonine was carried out using 100 μ L of oral fluid, after an automated solid phase extraction. A different LC-MS method was performed to detect Δ^9 -THC in 200 μ L of oral fluid using liquid-liquid extraction with hexane at pH = 6. Both methods were fully validated, including linearity (1-250ng/mL, 2-250ng/mL) recovery (>55%), within-day and between-day precision (CV<15%), accuracy (MRE<15%), limit of detection (0.5 and 1ng/mL), quantitation (1 and 2ng/mL) and matrix effect. All of the positive cases and 30% of the negative were analyzed for confirmation analysis. Good results (sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value and negative predictive value > 90%) were obtained for cocaine and opiates by OraLab, and for cocaine by Dräger. However, the results for the other compounds could be improved for both detection devices. Differences in the ease of use and in the interpretation mode (visual or instrumental) were observed.

Keywords: LC-MS, oral fluid, drugs of abuse, roadside test.

1. Introduction

Recently, concern about driving under the influence of drugs (DUID) as a risk factor and a cause of road accidents has risen. Illicit drugs can possibly influence driving performance in different ways: opiates induce sedation, indifference to external stimuli and increase reaction time; stimulants such as cocaine, amphetamines and designer drugs (MDMA, MDEA), induce a loss of concentration and attentiveness. Also, dilated pupils increase sensitivity to brightness, and euphoria may lead to increased risk-taking in traffic; cannabis can influence perception, psychomotor performance, cognitive and affective functions [1].

Oral fluid (OF), which contains saliva and other fluids and substances present in the oral cavity, is considered as the main alternative matrix to blood for detecting recent use of medicines or drugs of abuse [2]. Substances tend to be detectable in OF for short periods, typically for 12-24 h after consumption [3]. The main advantages of OF are non invasive sample collection and staff can directly observe patients when they produce the samples, usually by placing a collection tube or device in their mouth; this assures staff that the sample comes from the patient and the procedure respects the patients' dignity. The disadvantage of OF is that people are sometimes unable to produce sufficient amounts of fluid for analysis.

The ROSITA (Roadside Testing Assessment) project was an initiative of the European Commission to evaluate the value of roadside tests of oral fluid. The first part of the ROSITA (ROSITA 1) took place in 1999 and 2000 [4], and the second part (ROSITA 2) from 2003 to 2005. Different devices were assigned to each of the participating countries for testing purposes. In this study for the

ROSITA 2 project, the effectiveness of two on-site drug detection devices (OraLab and Dräger) were assessed, and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) methods for the confirmation analysis were developed using only 300µL of OF. In the literature, methods for the determination of amphetamines, cocaine and opiates [5, 6], and for the determination of THC [7, 8, 9, 10] in oral fluid by LC-MS were found.

2. Materials and methods

2.1. Roadside controls

The study was conducted in Galicia (NW Spain), in places near discotheques or raves, by teams composed of forensic toxicologists working in collaboration with traffic police. The controls were carried out at weekends (Friday and Saturday night, between 2 to 8 a.m.) from November 2004 until July 2005. The selection of drivers was random and always carried out by the traffic police. The control was voluntary, and drivers could refuse to participate. The test was performed by the officers only on those who had agreed by giving their oral and written consent. Additionally, an extra OF sample for confirmation analysis was collected by the research personnel.

2.2. Oral fluid samples

The oral fluid samples for confirmation analysis were collected by spitting into 10mL polypropylene tubes. The samples were centrifuged for 10 min at 12100 x g and stored frozen at -20°C prior to analysis. All the positives cases and 30% of the negative ones were analyzed.

2.3. The on-site devices

All the traffic police officers had received prior instruction on the characteristics and deployment of the devices from the scientific staff of the manufacturers.

2.3.1. The on-site Varian OraLab test

The on-site Varian OraLab test (Lake Forest, CA, USA) is a simple, qualitative assay that detects recent drug use in oral fluid. It consists of two components: the collection device and the test cassette. Its container automatically splits the specimen, using half for immediate drug-of-abuse testing and storing the remaining sample for confirmation testing, if required. In order to collect oral fluid, the collector foam is placed inside the mouth for three minutes, until it is completely saturated with saliva. The OraLab cassette has to be placed on a flat surface. The collector foam is placed vertically into the sample well on top of the device, and the collector is pushed slowly and firmly downward until it comes to a stop. Saliva flows directly into the test cassette. The right band of the cassette allows the detection of methamphetamine and THC, and the left band detects cocaine, morphine and amphetamine. Test validity and results must be interpreted between 10 and 15 minutes after initiating the test, when a rose line appears in the valid test window. If the test is positive a rose line appears next to the drug name, and if it is negative no line is shown. The drugs detected and the cut-offs according to manufacture are: morphine (40ng/mL), cocaine (20ng/mL), d-amphetamine (50ng/mL), d-methamphetamine (50ng/mL) and THC (100ng/mL).

2.3.2. The on-site Dräger Drug test

The on-site Dräger Drug test (Lübeck, Germany) is also an immunoassay for the detection of drugs in oral fluid. The device consists of three pieces (the collection device, the buffer cartridge and the cassette), and the analyzer. The collection device is inserted between the cheek and the gum and swabbed side to side in the mouth until the collector is saturated. After that, it is necessary to

strictly follow the instructions for use of the device: the buffer cartridge is inserted into the lower groove of the test cassette by aligning the lower tabs on the cartridge with notches on the cassette. The buffer cartridge cap is rocked and removed. The sample collection device is inserted into the buffer cartridge and pressed down on the sample collection device. The handle of the sample collection device is removed by means of an anticlockwise quarter turn. The buffer cartridge is closed and it incubates for 4 min. Then, the buffer cartridge is turned clockwise until the upper groove is positioned above the groove of the test cassette. The buffer cartridge is pushed down firmly until the cartridge wings touch the edge of the cassette. The fluid is allowed to develop for 8 min. After that time, the cassette is inserted into the analyzer, which finally reports the results (as positive or negative) on the screen in 4 min. The drugs detected and the cut-offs according to manufacture are: opiates (40ng/mL), cocaine (5ng/mL), amphetamine (50ng/mL), methamphetamine (10ng/mL) and THC (20ng/mL).

2.4. Analysis of oral fluid

All analytical procedures regarding confirmation process of drugs involved in the project were done by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS). Two methods were developed, one for the simultaneous determination of morphine, 6-monoacetylmorphine (6-MAM), amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, cocaine and benzoylecgonine, and another one for the detection of Δ^9 -THC, using a total of 300 μ L of oral fluid.

For both methods, liquid chromatography was performed using a Waters Alliance 2795 separation module with a Waters Alliance series column

heater/cooler (Waters, Milford, MA, USA), and the detection was performed using a Micromass ZMD 2000 mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) fitted with a Z-spray ion interface. Ionisation was achieved using electrospray in the positive ionisation mode (ESI+). Nitrogen was used as nebulisation and desolvation gas. The optimal MS parameters chosen were: drying gas temperature 300°C, source heater temperature 120°C, nebulisation gas flow 500 L/h, cone gas flow 50 L/h, and capillary voltage 3500 V for THC and 3000 V for the other compounds. Data acquisition peak integration and calculation were interfaced to a computer workstation running MassLynx NT 3.5 and QuanLynx 3.5 software.

The detection of Δ^9 -THC in oral fluid samples was performed according to a published validated procedure [7]. The chromatographic separation was carried out using an XTerra MS C₁₈ column (2.1x100mm, 3.5µm) at 26°C, eluted in isocratic mode using 0.1% formic acid in acetonitrile (15:85), and delivered at a flow rate of 0.25mL/min. A liquid-liquid extraction in the presence of its deuterated analogue Δ^9 -THC-d₃ (25µL at 1 µg/mL) was employed. 200µL of oral fluid were mixed with 1mL of pH 6 phosphate buffer, and with 5mL of hexane in a 10mL borosilicate glass tube.

A published validated procedure for the detection of morphine, 6-MAM, amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, cocaine and benzoylecgonine in plasma [11] was used for the detection of these compounds in oral fluid. The chromatographic separation was achieved with an Atlantis dC₁₈ column (2.1x100mm, 3µm) at 26°C. The mobile phase, delivered at a flow rate of 0.2mL/min, was a gradient of acetonitrile and pH 3 ammonium formate buffer, programmed as follows: 5% acetonitrile during 1 min, linearly increased to 50%

in 10min, kept that percentage for 1 min, decreased to 5% in 1 min (original conditions), and equilibrated for 4 min, which resulted in a total run time of 17 min.

The extraction procedure was an automated solid phase extraction, using OASIS ® HLB cartridges (3cc, 60 mg) Waters (Milford, MA, USA) and Gilson AspecXL solid phase extraction (Villiers Le Bel, France). To 100µL of oral fluid, 50µL of a mixed working solution of internal standards, IS (d,l-Methamphetamine-d₅, d,l-MDMA-d₅, d,l-MBDB-d₅, benzoylecgonine-d₃ and cocaine-d₃ at 0.1mg/L) were added, and 1mL of pH 9.0 borate buffer in a 3mL borosilicate tube. After conditioning with 2mL methanol and 2mL water, the samples were loaded onto the SPE cartridges. Clean-up was accomplished with successive 2mL washes of water-5% methanol (95:5, v/v) and a mixture of water-2%NH₄OH in methanol (80:20, v/v). The cartridges were dried for 5 min before elution with 2mL of 2% acetic acid in methanol. The elution solution was evaporated to dryness at 35°C under a stream of nitrogen. The dry extract was re-dissolved in 100µL of a mixture of a pH 3.0 ammonium formate buffer and acetonitrile (95:5, v/v), and 20µL were injected into the LC-MS.

2.5. Validation of the analytical method

The analytical method validation was performed according the recommendations of Shah [12] and Peters [13]. The specificity of the method was evaluated by analysing oral fluid from 10 healthy non-drug-consuming subjects. Linearity was obtained with an average coefficient of determination (r^2) > 0.99 over a range from the lower limit of quantitation (LLOQ) up to the upper limit of quantitation (ULOQ). A weighting factor 1/x was used. Within-day and between-day precision and accuracy were determined at four concentration

levels (the LLOQ, the ULOQ and two intermediate levels) by preparing and analysing for each level six replicates on the same day and on six different days. Precision, expressed as the coefficient of variation (CV) of the measured values, was expected to be less than 15% for all concentration levels, except for the LLOQ, for which 20% was acceptable. Similarly, accuracy was evaluated by using mean relative error (MRE), measured as a percentage deviation from the accepted reference value, which should be less than 15% for all concentration levels, except for the LLOQ, in which case 20% was acceptable.

The limit of detection (LOD) was defined as the lowest concentration of the drug resulting in a signal-to-noise ratio of 3:1. LLOQ was defined as the lowest concentration yielding within-day and between-day CV and MRE less than 20%. Recoveries were determined in quintuplicate at two concentration levels (low and high) for each compound in oral fluid. For each concentration, five blank samples were fortified with the appropriate amount of each compound. These fortified samples and five blank samples were extracted as previously described. The dry extracts of the fortified samples were re-dissolved in 100 μ L of the reconstitution solvent containing the IS, while the extracts of the blank samples were re-dissolved with 100 μ L of the reconstitution solvent containing the respective nominal amounts of the compounds and the IS. The latter were used as neat standards.

The ion suppression effect on the ESI response was evaluated according to the next procedure [14]: nine drug-free oral fluid samples from different sources were extracted as described previously. The extracts were then fortified with all drugs at a concentration of 50ng/mL. Three reference solutions in mobile phase were also fortified with all drugs to the same nominal concentration. The

reconstituted extracts and the reference solutions were injected into the LC-MS. Peak areas obtained from the extracts were compared with the corresponding peak areas produced by the reference solutions. The ion suppression percentage was calculated as follows: $(\text{mean peak area "reconstituted extract in oral fluid"} - \text{mean peak area "reference solution"}) \times 100 / \text{mean peak area "reference solution"}$. The oral fluid samples above the ULOQ (Upper Limit of Quantitation) were diluted with drug-free oral fluid.

2.6. Device results analysis

Comparing the device results and the laboratory results, and bearing in mind the cut-offs given by manufactures, the following parameters were calculated: true negatives (TN; number of confirmed device negative cases/total number of negative cases); true positives (TP; number of confirmed device positive cases/total number of positive cases); false negatives (FN; number of device negative cases confirmed as positives/total number of negative cases) and false positives (FP; number of device positive cases confirmed as negative/total number of positive cases).

From these 4 categories, the following characteristics were calculated: sensitivity, true positives expressed as percent of all positives, $TP/(TP+FN)$; specificity, true negatives expressed as percent of all negatives, $TN/(TN+FP)$; positive predicted value, percent of samples with positive results who are true positives, $TP/(TP+FP)$; negative predicted value, percent of samples with negative results who are true negatives, $TN/(TN+FN)$; and accuracy, percent of all samples correctly classified by the tests, $(TP+TN)/(TP+TN+FP+FN)$. The ROSITA criteria for a good screening test were: sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value $\geq 90\%$, and accuracy $\geq 95\%$ [15].

3. Results and discussion

3.1. Validation of the method for the determination of amphetamines, cocaine and opiates in oral fluid

The application of the plasma method [11] to oral fluid samples required a new validation. The ion chromatograms of the ten compounds are shown in Fig. 1, and the retention times and the selected ions are reported in Table 1. Likewise, their respective optimised fragmentation voltages are shown in the same table. Under the used chromatographic conditions, there were no interferences with the analytes by any extractable endogenous components of the oral fluid.

The linearity of the compound-to-IS peak area ratio versus the theoretical concentration was verified in oral fluid by using a $1/x$ weighted linear regression. Linearity was from 1 to 250ng/mL for amphetamine, methamphetamine, MDEA, MBDB, cocaine and benzoylecgonine, and from 2 to 250ng/mL for morphine, 6-MAM, MDA and MDMA. The coefficients of determination were above 0.99 and the curvature was tested on a set of six calibration curves. The within-day precision and accuracy, as well as the between-day precision and accuracy were satisfactory for all the tested concentrations (LLOQ, ULOQ, 10 and 50ng/mL). The CV for the within and between-day precision were between 0.7-14% and 2.1-14.4%, respectively. The MRE for the within and between day accuracy were between 0.2-16.6% and 0-14.1%, respectively. The LOD obtained was 0.5ng/mL for amphetamine, methamphetamine, MDEA, MBDB, cocaine and benzoylecgonine, and 1ng/mL for morphine, 6-MAM, MDA and MDMA. The LLOQ was 1ng/mL for amphetamine, methamphetamine, MDEA, MBDB, cocaine and benzoylecgonine, and 2ng/mL for morphine, 6-MAM, MDA and MDMA. The ULOQ was 250ng/mL for all compounds. The recoveries

obtained at 5ng/mL and 125ng/mL for all compounds ranged from 55.6 to 87.3%.

No matrix effect was detected for morphine, 6-MAM, cocaine and benzoylecgonine, but surprisingly there was ion suppression in the case of all amphetamines, which was -70% for amphetamine and methamphetamine, and -60% for MDA, MDMA, MDEA and MBDB. The same method applied to plasma samples [11] did not show matrix effect. For this reason, it is important to select the appropriate IS with the same matrix effect (Table 1). In any case, despite the matrix effect, the other validation parameters were satisfactory, and good LOD and LLOQ were achieved.

The amount of sample spent in this method is lower than the amount used in the previous published methods: Mortier et al. [5] needed 200µL of oral fluid and Wood et al. [6] 250µL of preserved oral fluid. The present method was developed using LC-MS, and the other two using LC-MS/MS.

The two confirmatory analytical methods developed in this study, for the determination of opiates, cocaine and amphetamines and for the determination of THC, were successfully applied to the roadside collected OF samples (Fig. 2).

3.2. Evaluation of the on-site Varian OraLab test

A total of 212 OraLab devices were tested of which 25% did not complete the test satisfactorily, and only 160 were valid. The absence of the right or both bands in the test validity window was possibly caused by insufficient oral fluid collected in the collection foam.

Of the 160 valid devices, 39 tested positive, mainly for cocaine (21). Other positive cases were for THC (5), opiates (2), amphetamine (1), a combination of cocaine and THC (7), and a combination of cocaine and opiates (3).

The OraLab results were compared with the lab results for sensitivity, specificity and accuracy. Also, the positive predictive value and negative predictive value were calculated (Table 2). The results obtained were good for cocaine, opiates and THC in terms of sensitivity and specificity (>90%), and accuracy (>95%), but in the case of THC positive predictive value was < 90%. For amphetamine and for methamphetamine, specificity was >90% and accuracy was > 95%, but sensibility did not satisfy the criteria.

3.3. Evaluation of the on-site Dräger Drug test

The total number of Dräger devices tested was 256, of which 26 were invalid and 230 valid, thus approximately 10% of devices did not complete the test properly. The failure detected was that the analyzer did not read the cassette. The possible causes of this failure were that not enough oral fluid was collected or the cassette had been unduly moved.

Of the 230 valid devices, 104 tested positive, principally for cocaine and THC (30 each) or a combination of both (20). The others were positive for amphetamine (6), amphetamine + methamphetamine (8), cocaine + amphetamine (7), THC + amphetamine (4), cocaine + THC + amphetamine (9) and cocaine + THC + opiates (2).

Comparing the Dräger results with the lab results, sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value and negative predictive value were calculated (Table 3). The results obtained were good only for cocaine (sensitivity and specificity > 90%, and accuracy > 95%). For opiates, specificity

and accuracy were good enough, but sensibility was 22.2%. For THC, amphetamine and methamphetamine the test should be improved. Also, special emphasis should be given to the excessive number of amphetamine false positives found (86%).

3.4. Comparison OraLab vs. Dräger

The traffic police officers found the OraLab device much simpler to handle, whereas the Dräger device demanded a more exhaustive control to follow the different steps required to carry out the test. Nevertheless, the subjective interpretation of the OraLab (rose line present or not) was completely rejected in favour of the printed result that appeared in the screen of the Dräger, because sometimes these lines are rather dim and difficult to discern in the conditions of the roadside night controls. Another negative issue to consider is the test failure in its final stage, which caused the police officers certain frustration. With regard to the rapidity of the test, the officers would prefer it to be a little faster.

The OraLab and the Dräger devices performed well in the detection of cocaine and opiates, but encountered some pitfalls in the detection of the other compounds such as THC, which have been reported in the bibliography [16, 17]. Also, OraLab requires more positive cases of amphetamine and methamphetamine in order to evaluate the test correctly.

Another important issue to consider was the cut-off points. The OraLab cut-offs for all compounds were much higher than those proposed by the SAMHSA [18]. Also, in the case of Dräger, the cut-offs for opiates, amphetamine and THC were higher than those proposed. This remains a key concern for this kind of test.

4. Conclusion

The aim of this study was to assess the effectiveness of two current onsite oral fluid drug detection devices (OraLab and Dräger), as part of the Spanish participation in the Roadside Testing Assessment Project (ROSITA). OraLab devices showed a good sensitivity, specificity and accuracy for cocaine and opiates, and Dräger devices for cocaine, but both of them were insufficient for THC, amphetamine and methamphetamine detection. However, the police officers complained of occasional doubt in discerning the presence or not of the rose line in the OraLab device, and found the Dräger to be rather complicated to use. Support from the Dräger team for any problems encountered during the test was excellent, and members of the staff participated directly in the controls. The two confirmation methods in oral fluid by LC-MS were fully validated and successfully applied to the roadside collected samples. A total of 300µL of oral fluid was used in the confirmation analysis.

Acknowledgements

Special contribution of Tte Coronel JL Ulla, Chief of Traffic Section of NW of Spain, and of Dirección General de Tráfico (DGT), Ministerio del Interior.

Special thanks to the laboratory technician Daniel González Aido who worked very hard and long hours to make this work possible, and to all those officers who were involved in the controls.

This work was made possible thanks to financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (F.P.U. Grant number AP-2002-2935 and AP-2002-2878).

References

- [1] V. Maes, C. Charlier, O. Grenez, A. Verstaete, Drugs and medicines that are suspected to have a detrimental impact on road user performance, in: A. Verstraete (Project coordinator), ROSITA: Roadside Testing Assessment. ROSITA Contract No. DGVII PL 98-3032, Ghent University, Ghent, Belgium, 2000, pp. 5-44.
- [2] N. Samyn, G. De Boeck and A. Verstraete, The use of Oral Fluid and Sweat Wipes for the detection of Drugs of Abuse in Drivers, *J Forensic Sci.* 47 (2002) 1-8.
- [3] E.J.Cone, Saliva testing for drugs of abuse, *Ann. N. Y. Sci.* 694 (1993) 91-127.
- [4] A. Verstraete (Project coordinator), ROSITA: Roadside Testing Assessment. ROSITA Contract No. DGVII PL 98-3032, Ghent University, Ghent, Belgium, 2000.
- [5] K.A. Mortier, K.E. Maudens, W.E. Lambert, K.M. Clauwaert, J.F. Van Bocxlaer, D.L. Deforce, C.H. Van Peteghem, A.P. De Leenhaer, Simultaneous, quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and Benzoyllecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 779 (2002) 321-330.
- [6] M. Wood, M. Laloup, M.M. Ramírez Fernández, K.M. Jenkins, M.S. Young, J.G. Ramaekers, G. De Boeck, N. Samyn, Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 150 (2005) 227-238.

- [7] M. Concheiro, A. de Castro, O. Quintela, A. Cruz, M. López-Rivadulla, Development and validation of a method for the quantitation of Δ^9 tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatograph electrospray-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 810 (2004) 319-324.
- [8] M. Laloup, MdelM Ramírez Fernández, M. Wood, G. De Boeck, C. Henquet, V. Maes, N. Samyn, Quantitative analysis of delta9-tetrahydrocannabinol in preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1082(1) (2005) 15-24.
- [9] H. Teixeira, P. Provenca, A. Verstraete, F. Corte-Real, D.N. Vieira, Analysis of Delta9-tetrahydrocannabinol in oral fluid samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 150(2-3) (2005) 205-211.
- [10] H. Teixeira, P. Provenca, A. Castanheira, S. Santos, M. López-Rivadulla, F. Corte-Real, E.P. Marques, D.N. Vieira, Cannabis and driving: the use of LC-MS to detect delta9-tetrahydrocannabinol (delta9-THC) in oral fluid samples. *Forensic Sci. Int.* 146(Suppl.) (2004) S61-S63.
- [11] M. Concheiro, A. de Castro, O. Quintela, M. López-Rivadulla, A. Cruz, 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* 832 (2006) 81-89.
- [12] V.P. Shah, K.K. Mida, J.W.A. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonnelli, C.T. Viswanattan, A. Jacobi, Bioanalytical Method Validation – A Revisit with a Decade of Progress. *Pharm. Res.* 17(12) (2000) 1551-1557.

- [13] F.T. Peters, H.H. Maurer, Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – A review. *Accred. Qual. Assur.* 7 (2002) 441-449.
- [14] T. Annesley, Ion Suppression in Mass Spectrometry, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1041-1044.
- [15] A. Verstraete, M. Puddu, Evaluation of different road side drug test, in: A. Verstraete (Project coordinator), ROSITA: Roadside Testing Assessment. ROSITA Contract No. DGVII PL 98-3032, Ghent University, Ghent, Belgium, 2000, pp. 167-232.
- [16] J.M. Walsh, R. Flegel, D.J. Crouch, L. Cangianelli, J. Baudys, An Evaluation of Rapid Point-of-Collection Oral Fluid Drug-Testing Devices, *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 429-439.
- [17] M. Laloup, M.M. Ramírez Fernández, M. Wood, G. De Boeck, V. Maes, N. Samyn, Correlation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol concentrations determined by LC-MS-MS in oral fluid and plasma from impaired drivers and evaluation of the on-site Dräger DrugTest®, *Forensic Sci. Int.* 161 (2006) 175-179.
- [18] Substance Abuse and Mental Health Administration, Mandatory guidelines for Federal workplace drug testing programs, *Fed. Regist.* 59 (1994) 29908-29931.

Table 1. SIR functions, time windows of SIR functions, selected ions, cone voltages, retention times and corresponding IS, for morphine, amphetamine (A), MDA, methamphetamine (MA), 6-MAM, MDMA, MDEA, benzoylecgonie (BZG), MBDB, cocaine and their deuterated analogues.

Compound	SIR Funtion	Time window SIR Function (min)	Selected m/z ratios ^a	Cone voltage (V)	Retention time (min)	I.S.
Morphine	Function1:	2.0-5.0	286	40	4.3	Cocaine-d ₃
	SIR of 2 m/z		201	55		
A	Function 2:	5.0-7.5	136	15	7.4	MA-d ₅
	SIR of 2 m/z		119	15		
MDA	Function 3:	7.4-8.3	180.2	15	7.6	MDMA-d ₅
	SIR of 9 m/z		163.2	15		
MA			150.1	15	7.7	MA-d ₅
			119	20		
6-MAM			328.1	30	7.7	Cocaine-d ₃
			211	60		
MDMA			194.2	15	7.9	MDMA-d ₅
			163.2	15		
MA-d ₅			155.3	15	7.7	
MDMA-d ₅			199.3	15	7.9	
MDEA	Function4:	8.2-9.5	208.3	20	8.4	MBDB-d ₅
	SIR of 7 m/z		163.2	20		
BZG			290	20	8.6	BZG-d ₃
			168.2	25		
MBDB			208.3	20	8.8	MBDB-d ₅
			177.1	25		
BZG-d ₃			293.2	25	8.6	
MBDB-d ₅			213.3	15	8.8	
Cocaine	Function 5:	9.3-17.0	304.2	20	9.7	Cocaine-d ₃
	SIR of 3 m/z		182.1	30		
Cocaine-d ₃			307.1	25	9.7	

^a Quantifier ions are in bold characters

Table 2. Sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of OraLab devices.

Compound	Sensitivity	Specificity	Accuracy	PPV	NPV
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
THC	93.3	98.6	98.1	87.5	99.3
Cocaine	100	97.9	98.3	91.4	100
MA	-	99.4	99.4	-	100
A	50	99.4	98.8	50	99.4
Opiates	100	100	100	100	100

Table 3. Sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of Dräger devices.

Compound	Sensitivity	Specificity	Accuracy	PPV	NPV
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
THC	58.6	89.8	77.7	78.4	77.4
Cocaine	90.1	98.8	95.7	97.6	94.8
MA	30	99.2	96.5	60	97.2
A	62.5	91.2	86.7	13.9	98.6
Opiates	22.2	100	97.3	100	97.2

Figure legends

Fig. 1. LC-MS quantifier ion chromatograms of an oral fluid sample spiked at 5ng/mL of morphine, amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, 6-MAM, MDEA, MBDB, benzoylecgonine and cocaine.

Fig. 2. Chromatograms corresponding to two real cases, (a) and (b). Figure (a) shows the quantifier and confirmation ion for morphine (446.2ng/mL) and (b) for THC (240.6ng/mL).

Figure 1

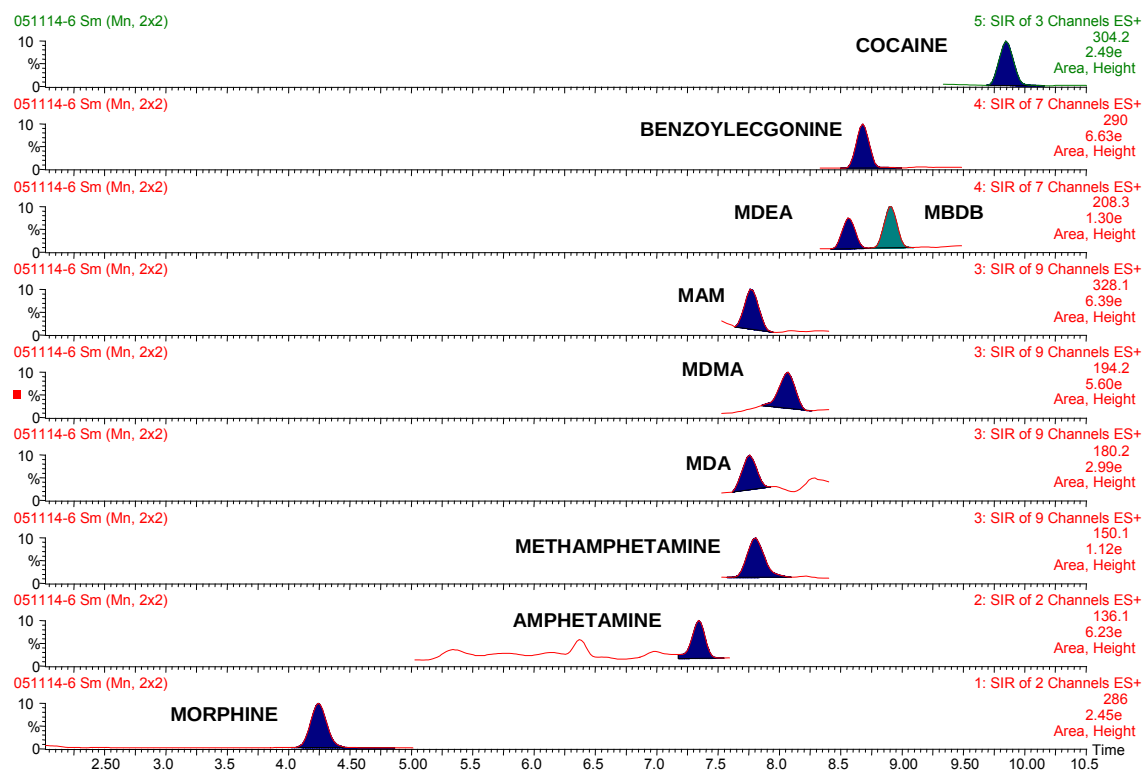


Figure 2

