



UNIVERSITAT POMPEU FABRA
Departament de Ciències Experimentals i de la Salut

**QUALITAT EN
L'ANÀLISI DE DROGUES D'ABÚS
EN CABELL I EN FLUID ORAL**

TESI DOCTORAL

Montserrat Ventura i Alemany

Programa de Recerca en Neurociències
Institut de Recerca Hospital del Mar (IMIM)



Barcelona, Setembre 2011



UNIVERSITAT POMPEU FABRA
Departament de Ciències Experimentals i de la Salut
Programa de Doctorat en Ciències de la Salut i de la Vida

QUALITAT EN L'ANÀLISI DE DROGUES D'ABÚS EN CABELL I EN FLUID ORAL

Memòria presentada per Montserrat Ventura i Alemany per optar al grau de Doctora per la Universitat Pompeu Fabra. Treball realitzat sota la direcció del Dr. Rafael de la Torre i Fornell i de la Dra. Rosa Ventura i Alemany, dins el Programa de Recerca en Neurociències dins del Grup de Bioanàlisi i Serveis Analítics de l'Institut de Recerca Hospital del Mar (IMIM).

Dr. Rafael de la Torre
Director

Dra. Rosa Ventura
Directora

Montserrat Ventura
Doctoranda

Barcelona, Setembre 2011

*Als meus pares,
i als meus germans, la Rosa, la Concepc i el Josep.*

Agraïments

Bé, finalment, ha arribat el moment! Ara que arribo al final d'aquest llarg camí i miro enrere, me n'adono de la quantitat de gent que he conegut en aquests anys i que ha fet possible que aquesta tesi arribés a bon port. Moltes gràcies a tots!

En primer lloc, voldria expressar el meu agraïment als meus directors de tesi, el Dr. Rafael de la Torre i la Dra. Rosa Ventura, per haver-me donat l'oportunitat de realitzar aquesta tesi, per haver-me orientat i ajudat en tot el que han pogut, pels seus consells i correccions i per donar-me ànims quan jo veia difícil la finalització d'aquesta tesi. Rosa i Rafa, moltes gràcies pel vostre recolzament i ajut. Gràcies de tot cor!

Al Dr. Jordi Segura, per permetre que formés part de la Unitat de Farmacologia i per tots els anys treballats al seu costat. Gràcies, Jordi, per haver-me donat l'oportunitat de formar-me professionalment a l'IMIM, per tot el que he pogut aprendre treballant al teu costat i per tot el recolzament al llarg d'aquests anys. Gràcies de tot cor!

A la Dra. Simona Pichini i a tot el personal de l'Istituto Superiore di Sanità de Roma, per la seva imprescindible participació en aquest projecte. Simona, muchísimas gracias por la oportunidad de participar en este proyecto, por tu guía constante y por haberme ayudado en todo lo que has podido y más. Muchas gracias!

A la Sònia Leal, a la Mitona Pujadas i a la Sílvia Fernández, per la seva important col·laboració en la part analítica d'aquest treball. Sònia, gràcies per preocupar-te, per compartir els meus problemes, per ajudar-me en tot el que has pogut i per totes les estones passades treballant juntes. Gràcies!

Al Klaus Langohr i a la Meritxell Ventura, per l'orientació en la part estadística.

Al Grup de Trastorns per Ús de Substàncies del Programa de Recerca en Neurociències de l'Institut de Recerca Hospital del Mar (IMIM) de Barcelona i als pacients, per les mostres de cabell i de fluid oral.

Als voluntaris de la Unitat de Farmacologia, per les mostres de fluid oral.

A tots els laboratoris participants i als laboratoris de referència dels programes HAIRVEQ i ORALVEQ, perquè sense ells aquest projecte no hauria estat possible.

A la Concep, per les correccions ortogràfiques i gramaticals de la tesi.

Al Programa de Recerca en Neurociències de l'Institut de Recerca Hospital del Mar (IMIM) per l'ajut rebut per a l'enquadració d'aquesta tesi.

Al Dr. Magí Farré i a tots els companys de la UAB, per tots els anys compartits a la Facultat de Medicina.

A tots i cadascun dels amics i companys de farmaco amb qui vaig compartir el dia a dia durant gairebé dotze anys. Ostres sou tants! A les meves companyes del PCQ, a la meves companyes de despatx de l'IMIM i del PRBB, als companys de doping i als de recerca... als que encara hi sou i als que esteu treballant en altres llocs... a la Mariola, a la Isaura, a l'Olha, a la Rosa Herrera, a la Cintia, a l'Imma, a la Meritxell Roig i a tants, tants altres. A tots i cadascun de vosaltres, **MOLTES GRÀCIES** pels moments compartits i per haver-me ajudat a tirar endavant aquest projecte. No oblidaré mai els anys treballats al vostre costat!

A totes i cadascuna de les meves companyes i dels meus companys de la SEQC, per tot el suport. **MOLTES GRÀCIES** pels vostres ànims i pel vostre recolzament en l'últim període de realització d'aquesta tesi. Gràcies per preocupar-vos tant per mi i per fer tan fàcil treballar al vostre costat!

A tots els meus amics, pel seu suport incondicional que m'ha acompanyat durant tots aquests anys. Gràcies a tots per preocupar-vos de com anava aquesta tesi i per recordar-me que arribaria un dia que l'acabaria. Especialment gràcies a:

A l'Anna Plens, pel seu suport durant tots aquests anys.

A la Viviana i a la seva família. Gracias, Vivi, por todos los momentos compartidos, por los ánimos y por recordarme en todo momento que yo podía.

A la Meritxell, a la Mar i al Gabi, moltes gràcies per totes les estones compartides i per trobar sempre un moment per estar amb mi. Meritxell, gràcies per preocupar-te tant per mi i per deixar que em senti tan a prop teu.

A l'Àlicia i al Joaquim, gràcies per saber que sempre puc comptar amb vosaltres. Gràcies, Àlicia, per totes les estones que hem passat juntes, cafès, sopars, concerts i més concerts, que tant m'han ajudat a "desconnectar"!

Al Jose i a la Neus, per la vostra ajuda en tots els aspectes de la meua vida. Jo crec que mai us podré agrair tot el suport que m'heu donat durant tots

aquests anys i sobretot en l'última etapa de realització d'aquesta tesi. Gràcies per totes les hores que m'heu dedicat!

A totes i cadascuna de les meves amigues de Sant Joan, als seus companys i a les seves petites princeses i prínceps. Gràcies per tantes bones estones compartides (Festes Majors, costellades...) i per escoltar-me i aguantar-me durant tots aquests anys! Especialment, gràcies a la Laura, per estar sempre al meu costat, per escoltar-me i aconsellar-me en tot moment. Crec que la nostra amistat és una cosa excepcional... suposo que ja saps com m'ha ajudat durant tots aquests anys poder comptar amb tu! Gràcies per tot i més, Laura!

Per últim, vull esmentar la meva família. Als meus pares, a qui agraeixo de tot cor tot el que m'han ajudat durant tots aquests anys. Papa i mama, gràcies pel vostre recolzament incondicional i per ser sempre, aquí, al meu costat, per córrer a Barcelona quan noestic bé i per preocupar-vos per mi molt més del necessari. Moltes gràcies a les meves germanes, al meu germà i als meus cunyats, per tots els moments compartits, per estar sempre pendents de mi i per recordar-me les coses que realment valen la pena a la vida. Gràcies a les meves nebodetes i nebodets, la Clara, la Laura, la Roser, el Marc, l'Ian i l'Edgar, per omplir d'alegria i il·lusió molts moments de la meva vida. Gràcies per totes les estones compartides al Molí! Us estimo, família, i aquesta tesi és en bona part vostra!

I a tots aquells que m'heu ajudat a aconseguir aquesta fita i, per problemes de memòria, no he anomenat.

Moltes gràcies a tots! Heu format part d'una etapa molt important de la meva vida i no ho oblidaré mai!

Índex

Índex	i
Acrònims i abreviatures	v
Resum i Abstract	vii
Prefaci	1
Estructura de la tesi	5
CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ	7
1.1 Matrius biològiques no convencionals utilitzades en l'anàlisi de drogues d'abús	9
1.1.1 Cabell	11
1.1.2 Saliva / Fluid oral	19
1.2 Qualitat als laboratoris d'anàlisi	28
1.2.1 Assegurament de la qualitat dels resultats analítics	28
1.2.2 Control extern de la qualitat	31
1.3 Qualitat en l'anàlisi de drogues d'abús en cabell i en fluid oral	38
CAPÍTOL 2. OBJECTIUS	41
CAPÍTOL 3. ANÀLISI DE DROGUES D'ABÚS EN CABELL	45
3.1 Introducció	47
3.2 Material i mètodes	49
3.2.1 Material d'assaig utilitzat en els exercicis interlaboratori	49
3.2.2 Laboratoris participants en els exercicis interlaboratori	52
3.2.3 Accions específiques realitzades en els exercicis interlaboratori	53
3.2.4 Avaluació dels resultats qualitatiu i quantitatiu dels	

laboratoris participants	54
3.3 Resultats	58
3.3.1 <i>HAIRVEQ: an external quality control scheme for drugs of abuse analysis in hair</i>	59
3.3.2 <i>Four years' experience in external proficiency testing programs for hair testing of drugs of abuse in Italy (HAIRVEQ) and comparison with the Society of Hair Testing program in 2005</i>	69
3.3.3 <i>HAIRVEQ 2006: Evolution of laboratories' performance after different educational actions</i>	81
3.4 Discussió	91

CAPÍTOL 4. ANÀLISI DE DROGUES D'ABÚS EN FLUID

ORAL	105
4.1 Desenvolupament de metodologia analítica	107
4.1.1 Introducció	107
4.1.2 Material i mètodes	108
4.1.2.1 Solucions de referència	108
4.1.2.2 Reactius i materials	109
4.1.2.3 Preparació de les mostres	110
4.1.2.4 Anàlisi instrumental	111
4.1.2.5 Protocol de validació	112
4.1.2.6 Mostres biològiques utilitzades	116
4.1.3 Resultats i discussió	118
4.1.3.1 Procediment analític	118
4.1.3.2 Anàlisi de mostres biològiques reals	126
4.2 Estudis d'estabilitat i exercicis interlaboratori	131
4.2.1 Introducció	131
4.2.2 Material i mètodes	132
4.2.2.1 Estudis d'estabilitat de drogues en fluid oral	132

4.2.2.1.1	Mostres	133
4.2.2.1.2	Condicions de temperatura i temps de conservació	133
4.2.2.1.3	Anàlisi de les mostres i avaluació de resultats	134
4.2.2.2	Exercicis interlaboratori	135
4.2.2.2.1	Mostres	136
4.2.2.2.2	Estudis d'homogeneïtat	138
4.2.2.2.3	Laboratoris de referència	138
4.2.2.2.4	Laboratoris participants	139
4.2.2.2.5	Avaluació dels resultats qualitatius i quantitius dels laboratoris participants	139
4.2.2.2.6	Avaluació de l'estabilitat de les drogues en els dispositius comercials	141
4.2.3	Resultats	141
4.2.3.1	<i>Stability Studies of Principal Illicit Drugs in Oral Fluid:Preparation of reference materials for external quality assessment schemes</i>	143
4.2.3.2	<i>ORALVEQ: External quality assessment scheme of drugs of abuse in oral fluid. Results obtained in the first round performed in 2007.....</i>	149
4.2.3.3	<i>Stability of drugs of abuse in oral fluid collection devices with purpose of external quality assessment schemes</i>	157
4.2.4	Discussió	163
CAPÍTOL 5. CONCLUSIONS		173
CAPÍTOL 6. BIBLIOGRAFIA		179

CAPÍTOL 7. ANNEXOS.....	195
ANNEX 1	197
ANNEX 2	201

Acrònims i Abreviatures

ANOVA	Test d'anàlisi de la variància
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
BZE	Benzoilecgonina
C/D	Cicles de congelació/descongelació
COC	Cocaïna
COD	Codeïna
CV%	Coefficient de variació
DRUID	Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines
EA	European Cooperation for Accreditation
EPTIS	European Information System on Proficiency Testing Schemes
ERR%	Error relatiu
EURACHEM	European Analytical Chemistry
EUROLAB	European Laboratories
HAIRVEQ	Programa de Garantia Externa de la Qualitat en l'Anàlisi de Drogues d'Abús en Cabell
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
IEC	International Electrotechnical Commission
ILAC	International Laboratory Accreditation Cooperation
IMIM	Institut Municipal d'Investigació Mèdica
ISO	International Organization for Standardisation
ISS	Istituto Superiore di Sanità
LDest	Límit de detecció estimat
LQest	Límit de quantificació estimat
6MAM	6-Monoacetil morfina
MDMA	3,4-Metilendioximetamfetamina
MDA	3,4-Metilendioxiamfetamina

MET	Metadona
MOR	Morfina
m/z	Relació massa/càrrega
N₂	Nitrogen
NIST	National Institute of Standards and Technology
ORALVEQ	Programa de Garantia Externa de la Qualitat en l'Anàlisi de Drogues d'Abús en Fluid Oral
POCT	Point of Care Testing
ROSITA	Roadsite Testing Assessment
RSD%	Desviació estàndard relativa
SAMHSA	Substance Abuse and Mental Health Services Administration
SD	Desviació estàndard
SFTA	Société Française de Toxicologie Analytique
SIM	Monitorització selectiva d'ions
SoHT	Society of Hair Testing
THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol
THCCOOH	Àcid 11-Nor- Δ^9 -tetrahidrocannabinol-9-carboxílic
TMCS	Trimetilclorosilà
TMS	Trimetilsilil
UV	Ultraviolat

Resum

La creixent utilització del cabell i del fluid oral per a l'anàlisi de drogues d'abús, ha portat a la necessitat d'assegurar que els resultats obtinguts utilitzant aquestes matrius són fiables i lliures d'error. L'objectiu d'aquesta tesi és desenvolupar eines que permetin avaluar la qualitat dels resultats dels laboratoris que analitzen drogues d'abús en cabell i en fluid oral i avaluar l'efecte de diferents accions sobre la qualitat final dels resultats. Per això s'han organitzat exercicis interlaboratori i s'han realitzat estudis per desenvolupar material d'assaig adequat.

Pel que fa a l'anàlisi de drogues d'abús en cabell, s'han realitzat nou exercicis interlaboratori. A través de l'avaluació dels resultats qualitatis i quantitatis informats pels laboratoris i mitjançant l'estudi de la metodologia emprada, ha estat possible conèixer la qualitat dels resultats obtinguts, detectar les fonts d'error i conèixer quines mesures correctives caldria desenvolupar. Pel que fa al material d'assaig, aquests exercicis han permès conèixer la influència que té, en els resultats, el tipus de cabell (tallat o polvoritzat) del qual es parteix per realitzar l'anàlisi.

Pel que fa a l'anàlisi de drogues d'abús en fluid oral, s'ha desenvolupat i validat un mètode analític que ha permès identificar i quantificar 6-monoacetil morfina, morfina, codeïna, cocaïna i benzoilecgonina en mostres de fluid oral. Per altra banda, s'han realitzat estudis d'estabilitat de les principals drogues en fluid oral que han permès establir les condicions òptimes de preparació, transport i conservació del material d'assaig i, per últim, s'han realitzat dos exercicis interlaboratori que han permès conèixer la qualitat dels resultats analítics obtinguts pels laboratoris i també l'estabilitat de les principals drogues en dos dispositius de recollida comercials, utilitzats per enviar mostres de fluid oral als laboratoris.

Abstract

The use of hair and oral fluid for drugs of abuse testing has increased over the last years. For this reason, the assurance that results provided using these matrices are reliable and error-free is needed. The objective of this thesis is to develop tools to assess the quality of results provided by laboratories analysing drugs of abuse in hair and in oral fluid and to evaluate the effect on the quality of results of different actions carried out. For this reason, intercomparison exercises have been organized and some studies have been performed to develop appropriate quality control materials.

Regarding the analysis of drugs of abuse in hair, nine different intercomparison exercises have been organized. The evaluation of qualitative and quantitative results reported by laboratories together with the study of the methodology used, has led to know the quality of the results, to identify the sources of error and to know the corrective actions that should be developed. Concerning the quality control material, these exercises have enabled to know the influence on the results of the type of hair (cut in short segments or pulverized) used to perform the analysis.

Concerning the analysis of drugs of abuse in oral fluid, a method has been developed to identify and quantify 6-monoacetyl morphine, morphine, codeine, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid samples. On the other hand, stability studies of the main drugs of abuse in oral fluid have been done to establish the optimal preparation, transport and storage conditions, and finally, two intercomparison exercises have been conducted to know the performance of analytical laboratories when analysing drugs of abuse in oral fluid and to know the stability of some drugs of abuse in two commercial collection devices typically used to ship oral fluid samples to testing laboratories.

Prefaci

Una millora en la comprensió dels mecanismes d'incorporació de drogues en cabell i fluid oral i nous avenços en la metodologia analítica utilitzada, han fet possible la utilització d'aquestes dues matrius per a l'anàlisi de drogues d'abús en diferents àmbits com el de la toxicologia clínica i forense, en l'àmbit laboral i en els tests de control en carretera.

La importància d'aquestes aplicacions i la possibilitat de la utilització d'aquestes matrius per detectar la presència de drogues i prendre decisions administratives i legals que podrien tenir un impacte molt greu sobre la vida d'un individu i sobre la societat en general, ha portat a la necessitat de desenvolupar eines que permetin conèixer la qualitat dels resultats analítics i que permetin assegurar que els resultats obtinguts són fiables i lliures d'error. Això és possible aconseguir-ho a través de l'organització d'exercicis interlaboratori i, per això, cal disposar de materials d'assaig que siguin homogenis, estables i representatius en quant al tipus i a la concentració de droga i metabòlits que es poden trobar en mostres reals.

Pel que fa referència a l'anàlisi de drogues d'abús en cabell, no hi havia cap exercici interlaboratori on haguessin participat laboratoris italians. Per tant, hi havia una manca d'informació en quant a la qualitat dels resultats analítics informats per aquests laboratoris. En aquest sentit, l'any 2002, es va crear el Programa de Garantia Externa de la Qualitat en l'Anàlisi de Drogues d'Abús en Cabell (HAIRVEQ) dirigit als laboratoris italians. Des de l'any 2002 fins el 2006, es van realitzar un total de 9 exercicis. A través de l'avaluació dels resultats qualitatius i quantitativs informats pels laboratoris participants en els diferents exercicis, es va conèixer la qualitat dels resultats obtinguts, detectar les fonts d'error i conèixer quines mesures correctives era necessari desenvolupar. Pel que fa al material d'assaig, aquests exercicis van permetre

conèixer que la qualitat dels resultats analítics no depèn del tipus de mostra de cabell de la qual es parteix per realitzar l'anàlisi i que, per tant, tant el cabell tallat en petits fragments com el cabell polvoritzat poden ser utilitzats com a material d'assaig en exercicis interlaboratori.

Pel que fa referència al fluid oral, l'únic programa de garantia externa de la qualitat publicat fins el moment, havia estat portat a terme entre els anys 2002 i 2004, amb mostres recollides i preparades amb un sol dispositiu comercial (Intercept). Per tant, la informació existent sobre la qualitat de les anàlisis de drogues en fluid oral era molt limitada. Calia, doncs, organitzar exercicis interlaboratori per poder conèixer la qualitat de les anàlisis. Però, per poder realitzar aquests exercicis, era necessari preparar material d'assaig adequat (estable, homogeni i representatiu) i, per això, calia realitzar estudis que permetessin establir les condicions òptimes de preparació, transport i conservació del material.

En aquest sentit, es van realitzar estudis d'estabilitat d'amfetamina, metamfetamina, 3,4-metilendioximetamfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxiamfetamina (MDA), cocaïna, benzoilecgonina, 6-monoacetil morfina, morfina i codeïna en fluid oral i en fluid oral estabilitzat, a diferents condicions de temperatures i temps. Aquests estudis van permetre establir les condicions òptimes de preparació, transport i conservació del material d'assaig en exercicis interlaboratori. Per poder realitzar aquests estudis va ser necessari desenvolupar un mètode que permet la identificació i quantificació de 6-monoacetil morfina, morfina, codeïna, cocaïna i benzoilecgonina en fluid oral. La idoneïtat del mètode es va comprovar analitzant mostres de fluid oral procedents d'un estudi d'excreció de codeïna realitzat en voluntaris sans i analitzant mostres de fluid oral procedents de pacients consumidors de drogues d'abús.

Finalment, l'any 2007 es va crear l'ORALVEQ, Programa de Garantia Externa de la Qualitat en l'Anàlisi de Drogues d'Abús en Fluid Oral. Es van portar a terme dos exercicis, un l'any 2007 i un el 2008. Aquests van permetre conèixer la qualitat dels resultats analítics obtinguts pels laboratoris que analitzen drogues d'abús en fluid oral i detectar les fonts d'error. A l'exercici realitzat l'any 2008, com a material d'assaig, es van emprar mostres de fluid oral preparades utilitzant dos dispositius de recollida de fluid oral comercials. Això va permetre estudiar l'estabilitat de les drogues en els dos dispositius comercials.

Estructura de la tesi

Aquesta tesi consta d'una introducció general, objectius i 2 capítols que conformen el cos de la tesi i per últim les conclusions i els annexes.

La introducció consta de tres parts: en la primera, es parla del cabell i del fluid oral com a matrius alternatives utilitzades per a l'anàlisi de drogues d'abús; en la segona, es parla de les eines necessàries per assegurar la qualitat als laboratoris d'anàlisi i, la tercera, parla dels projectes i les normatives desenvolupades per assegurar la qualitat dels resultats fruit de l'anàlisi de drogues d'abús en cabell i fluid oral.

En el capítol 2 es presenten els objectius de la tesi.

Els capítols 3 i 4 conformen el cos de la tesi i cadascun d'ells inclou introducció, material i mètodes, resultats i discussió.

En el capítol 3 es tracta l'anàlisi de drogues d'abús en cabell i es descriuen els nou exercicis interlaboratori realitzats. Com a resultats s'inclouen tres articles científics publicats.

En el capítol 4 es tracta l'anàlisi de drogues d'abús en fluid oral. Es divideix en dues parts. A la primera, es descriu el desenvolupament d'un mètode analític que permet la identificació i quantificació de les principals drogues d'abús en fluid oral. A la segona, es descriuen, per una banda, els estudis d'estabilitat de drogues en fluid oral i fluid oral estabilitzat realitzats a diferents condicions de temperatura i temps i, per l'altra, els resultats obtinguts en els dos exercicis interlaboratori realitzats en l'anàlisi de drogues d'abús en fluid oral, el segon dels quals ha permès estudiar l'estabilitat de les drogues en dos dispositius de recollida de fluid oral comercials. Com a

resultat de la primera part, s'inclou un pòster científic (Annex 1) i com a resultat de la segona part s'inclouen tres articles científics publicats (apartat resultats) i dades addicionals (Annex 2).

Finalment, es presenten les conclusions principals de la tesi.

CAPÍTOL 1

INTRODUCCIÓ

1.1. MATRIUS BIOLÒGIQUES NO CONVENCIONALS UTILITZADES EN L'ANÀLISI DE DROGUES D'ABÚS

Fins a finals dels anys 80, l'anàlisi de drogues estava restringit a la utilització de dues matrius biològiques: orina i plasma. No obstant, en els darrers anys, una millor comprensió dels mecanismes d'incorporació dels fàrmacs i drogues en el que s'anomenen matrius biològiques no convencionals, i els avenços en la metodologia analítica utilitzada (tècniques de recollida, preparació de mostres i instrumentació analítica), han fet possible la utilització d'aquestes matrius en el camp de la toxicologia analítica. El cabell va ser una de les primeres matrius no convencionals utilitzades als anys 60 i 70 per avaluar l'exposició a arsènic, plom i mercuri (Hammer et al., 1971; Kopito et al., 1967). Des de llavors, moltes matrius no convencionals han estat estudiades i utilitzades per a l'anàlisi de drogues i fàrmacs en diferents camps. Algunes de les matrius no convencionals utilitzades són: el líquid amniòtic, la llet materna i el meconi, en toxicologia clínica; les ungles, l'humor vitri i la medulla òssia, en toxicologia postmortem i el fluid oral, el cabell i la suor, en l'àmbit laboral.

Cadascuna de les matrius no convencionals ens permet obtenir informació diferent respecte al període de consum i respecte a la relació entre la detecció i si li el subjecte es troba sota els efectes de la droga o fàrmac en el moment de la recollida de la mostra. Per exemple, relacionat amb la intervenció en un òrgan o lloc concret, és important poder detectar concentracions de les drogues i fàrmacs en matrius com llàgrimes, ungles, líquid cefaloraquidi, secreció bronquial, líquid seminal i líquid intersticial, donat que la detecció de drogues i fàrmacs en aquestes matrius demostra la presència d'una droga o fàrmac a l'òrgan diana o al lloc d'acció amb possibles relacions amb canvis fisiològics i morfològics. Altres matrius com la bilis o els excrements ens

permeten obtenir informació relacionada amb la ruta d'excreció (circulació enterohepàtica) de drogues i metabòlits diferents dels que es poden mesurar a l'orina. En el camp de la toxicologia forense, són matrius interessants l'humor vitri, el líquid pericàrdic i la sang (Drummer, 2004). Matrius com el cabell i les ungles ens permeten obtenir informació d'un consum retrospectiu d'una droga a llarg termini (de setmanes a anys) i aquesta informació és molt útil en casos forenses (quan s'investiga la causa d'una mort) o en casos clínics (quan s'investiga la causa d'una malaltia crònica). El fluid oral i la suor ens permeten obtenir informació d'un consum recent i, l'anàlisi de drogues en aquestes matrius, ens permet associar el consum amb el comportament del subjecte. Altres matrius importants, utilitzades per determinar l'exposició a drogues durant l'etapa de l'embaràs i en el moment del naixement són: sang fetal, sang del cordó umbilical, líquid amniòtic, cabell i meconi (Lozano et al., 2007).

De tots els fluids i matrius mencionats, n'hi ha alguns que tenen importància en àrees específiques, mentre que d'altres ens permeten obtenir informació útil per a diverses aplicacions en toxicologia. El fluid oral i el cabell són les matrius no convencionals més comunament utilitzades per a l'anàlisi de drogues d'abús en el camp de la toxicologia clínica i forense (Gallardo i Queiroz, 2008). Cal remarcar que un dels avantatges més importants que presenten aquestes matrius és que la tecnologia necessària per recollir-les és mínima (no es necessita un entorn mèdic).

El principal avantatge que presenten la utilització de fluid oral i cabell enfront les matrius convencionals és que la seva recollida és senzilla, no invasiva i es pot portar a terme sota estricta vigilància, la qual cosa evita l'adulteració, manipulació o substitució de la mostra. Aquestes matrius permeten obtenir informació relativa a si el subjecte es troba sota els efectes d'una droga en el moment de l'obtenció de la mostra (degut al bon

paral·lelisme entre concentracions plasmàtiques del fàrmac i el fluid oral) o bé conèixer la seva història toxicològica de forma retrospectiva a llarg termini (anàlisi de cabell). Entre els inconvenients destaca que les concentracions a les quals es troben les drogues i els seus metabòlits en aquestes matrius solen ser molt petites. Tot i això, les tècniques analítiques cada cop esdevenen més sensibles i específiques, la qual cosa permet que es puguin detectar i quantificar drogues a més baixes concentracions. Actualment, per a l'anàlisi de drogues en aquestes matrius, s'utilitza, principalment, cromatografia de gasos o cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses o a espectrometria de masses en tàndem.

1.1.1. Cabell

El pèl (anomenat cabell quan és el pèl del cuir cabellut) és una estructura que apareix a la pell dels mamífers vertebrats. En els diferents individus es diferencia només en el color, la quantitat i la textura. Està constituït per proteïnes, principalment queratina (65-95%), aigua (15-35%), lípids (1-9%) i minerals (0.25-0.95%) (Harkey, 1993). Es forma en un fol·licle de la dermis (capa inferior de la pell). Cadascun dels pèls consisteix en una arrel que està ubicada en un fol·licle pilós i en una tija que es projecta per sobre de la superfície de l'epidermis i que està formada de fora cap a dins per tres capes: cutícula, escorça i medul·la. El fol·licle pilós està envoltat per un sistema capil·lar que li proporciona les substàncies necessàries per al seu creixement (Pragst i Balikova, 2006). El nombre total de fol·licles pilosos en adults és aproximadament de 5 milions, 1 milió dels quals es troba al cap.

El pèl creix de 0.6 a 1.4 cm per mes, depenent del tipus i del lloc on es troba. No creix de manera indefinida, sinó que té un creixement cíclic que s'anomena cicle pilós. Cada fol·licle té el seu propi cicle, independent dels

que hi hagi al seu voltant. Les diferents fases del cicle es descriuen a continuació (veure **Figura 1.1**):

- Anagen: fase d'activitat del fol·licle pilós d'una durada aproximada de tres anys. Període en què el pèl creix a raó de 0.2 a 0.5 mm diaris.
- Catagen: és una fase de transició, de regressió de l'activitat del fol·licle pilós d'unes tres setmanes de durada. Període en què les cèl·lules de la matriu s'atrofien i s'atura el creixement del pèl.
- Telogen: fase de repòs i de caiguda del pèl d'uns tres mesos de durada. Després d'aquesta fase comença un nou cicle de creixement del pèl.

Factors com la raça, malalties, deficiències nutritives i edat influeixen tant en la taxa de creixement del pèl com en la durada de la fase telogen.

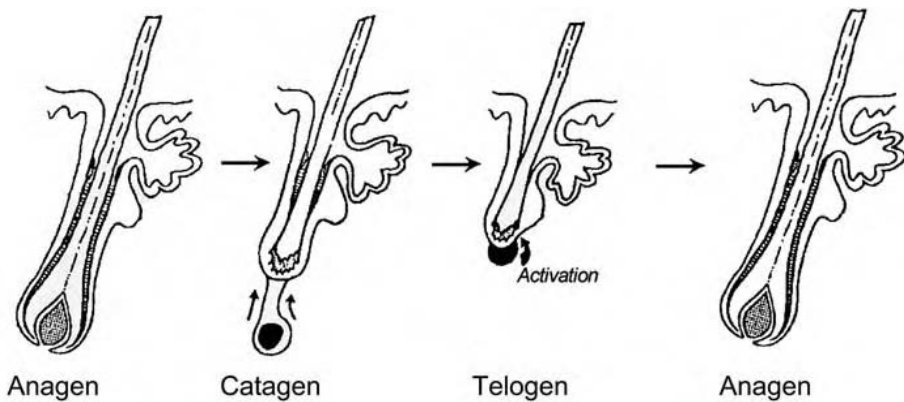


Figura 1.1. Diferents etapes del cicle de creixement del pèl: anagen, catagen i telogen. (Figura de Kronstrand i Scott, 2007)

La proporció de pèl en fase anagen/telogen varia depenent del lloc on estigui situat el pèl i aquesta característica, juntament amb la taxa de creixement diferent, fa que hi hagi diferències en les concentracions de drogues trobades

en pèl recollit de diferents parts del cos. De fet, no només el pèl del cuir cabellut (cabell) és utilitzat per a l'anàlisi de drogues d'abús. També es pot utilitzar pèl púbic, del braç, de la cama, de l'axil·la o bé de la barba, quan no hi ha cabell disponible per realitzar l'anàlisi. No obstant, cal anar en compte quan s'interpreten els resultats en aquestes mostres, perquè hi ha estudis on s'han trobat diferències entre les concentracions trobades al cabell i al pèl púbic o axil·lar (Mangin i Kintz, 1993).

Està acceptat que existeixen tres mecanismes d'incorporació de drogues al cabell:

- per difusió passiva des de la sang durant el creixement del cabell,
- per contaminació fisiològica, a través de la suor i del sèu, que es produeix banyant el cabell quan aquest surt de la pell,
- per contaminació externa, per exposició passiva del cabell a la droga.

L'anàlisi del cabell és útil només si les drogues mesurades provenen d'una ingesta, no d'altres fonts.

La principal incorporació de drogues al cabell es produeix per difusió de la droga des dels capil·lars arterials a les cèl·lules de la matriu, a la base del fol·licle (Huestis i Cone, 1998). Per tant, en cabell, es troben aquelles formes de drogues més liposolubles, que no estan unides a proteïnes i que en sang es troben en forma no ionitzada, perquè són les que millor difonen a través de les membranes. Normalment la droga inalterada és més liposoluble que els seus metabòlits, per tant és la que trobem principalment en cabell (Kintz, 1996).

La incorporació de les drogues es veu afectada pel contingut de melanina del cabell, per la basicitat de les drogues i per si aquestes són o no liposolubles. S'ha estudiat com afecta la quantitat de melanina i s'ha vist que la

concentració de drogues bàsiques en cabell pigmentat pot arribar a ser 10 vegades més gran que en cabell no pigmentat (Pragst i Balikova, 2006). Es creu que melanina i proteïnes són els principals components del cabell involucrats en la unió de les drogues.

La millor zona per recollir mostres de cabell és la part posterior del cap, el que s'anomena vèrtex posterior. En aquesta part és on el cabell creix més homogèniament i és on la relació anagen/telogen és més alta, és a dir, on el nombre de cabells en l'etapa de creixement és més alt. Cal tallar el cabell tant a prop com sigui possible del cuir cabellut amb l'ajut de tisores i cal emmagatzemar la mostra a temperatura ambient, protegida de la llum i de la humitat (SoHT, 2004).

Les drogues i els seus metabòlits s'incorporen al cabell i romanen estables si aquest no es sotmet a tractaments agressius. Diferents estudis han pogut detectar drogues un any després del seu consum (Welch et al., 1993; Kintz, 2004a; Pragst i Balikova, 2006; Kronstrand i Druid, 2007). Factors que poden afectar a l'estabilitat de les drogues en el cabell són els tractaments cosmètics, l'exposició a condicions ambientals extremes, les condicions d'emmagatzematge inadequades o bé el dany sever del cabell (Pötsch i Skopp, 1996; Jurado et al., 1997; Skopp et al., 1997; Jurado, 2007).

Una de les limitacions més importants de l'anàlisi de drogues en cabell és la contaminació externa (ambiental). És molt important solucionar aquest problema perquè hi ha risc d'informar resultats falsament positius. Per minimitzar aquest fet, és bàsic que els procediments d'anàlisi en cabell incloguin una etapa de rentat/descontaminació. A la literatura hi ha descrits diferents processos de rentat que inclouen solvents orgànics, tampons aquosos, aigua, sabons o bé combinacions de diferents productes (Nakahara, 1999; Kintz, 2007a). No hi ha un consens general sobre els procediments de

rentat que cal emprar i s'assumeix que l'eliminació total de les drogues no és possible. Alguns investigadors proposen criteris per diferenciar entre el consum de drogues i la contaminació externa, establint una relació entre la concentració trobada a l'últim rentat i la concentració trobada a la mostra (Schaffer et al., 2005). El rentat del cabell abans de l'anàlisi no és l'únic procediment per solucionar el problema de la contaminació externa. La Society of Hair Testing (SoHT) recomana abordar la contaminació externa utilitzant diferents estratègies, entre les quals hi ha la detecció de metabòlits (que només poden provenir del consum de la droga, no pas de la contaminació externa) i la utilització de relacions entre la droga inalterada i els seus metabòlits per informar resultats positius (SoHT, 2004).

Una altra limitació de l'anàlisi de drogues en cabell és la dificultat d'establir una relació entre la concentració de droga trobada i la dosi i el temps del consum. Mentre que hi ha autors que presenten dades indicant que hi ha una relació lineal entre la dosi i les concentracions trobades en cabell (Welp et al., 2003), n'hi ha d'altres que postulen la manca de relació degut a la variabilitat de la incorporació de drogues al cabell entre subjectes, a la difusió de les drogues al llarg del cabell i a la incorporació de drogues a través de la suor i el seü (Wenig, 2000). No obstant això, el que sí sembla és que l'anàlisi de drogues en cabell permet distingir diferents patrons de consum: baix, moderat o alt (Pepin i Gaillard, 1997).

L'avantatge més important que té la utilització del cabell enfront de l'orina i la sang és que permet obtenir informació sobre el consum retrospectiu d'una substància, de setmanes a mesos depenent de la llargada del cabell, mentre que la sang i l'orina només permeten detectar el consum d'hores o dies. Per això l'anàlisi del cabell es complementa amb les anàlisis en sang i/o orina. L'avaluació del consum retrospectiu es realitza a través de l'anàlisi segmentant el cabell. Donat que el cabell creix aproximadament 1 cm per

mes (SoHT, 2004), es pot associar el consum d'una droga a un període determinat. Cal però tenir en compte la variabilitat en la taxa de creixement del cabell i també les diferències intra i inter-subjectes. Aquest tipus d'anàlisi només es pot portar a terme en cabell, no en pèl púbic o pèl de l'axil·la. Tot i que aquest tipus de pèl ha estat utilitzat igual que el cabell en toxicologia forense, el fet que tingui una taxa de creixement més baixa que el cabell i que es pugui contaminar de la suor, el sèu o l'orina (pèl púbic), no permet relacionar la concentració de la droga trobada en aquests dos tipus de pèl i el període de consum.

En resum, la utilització del cabell per a l'anàlisi de drogues té els següents avantatges:

- les drogues i els seus metabòlits s'incorporen al cabell i romanen estables durant molt de temps, sempre i quan es conservi el cabell protegit de la llum i de la humitat,
- la recollida de cabell és senzilla, no invasiva i és reproduïble, molt útil per si cal agafar mostres idèntiques per confirmar els resultats,
- és una mostra difícil d'adulterar i manipular,
- no hi ha risc de transmissió de malalties a través de la recollida de les mostres,
- els resultats trobats ens permeten distingir entre un consum baix, moderat o alt d'una droga.

La utilització del cabell, però, també té una sèrie de limitacions que cal tenir en compte. Aquestes són:

- possibilitat d'informar resultats falsos positius degut a la contaminació ambiental (externa) del cabell. Com ja s'ha comentat, aquest problema es pot solucionar incloent una etapa de rentat en la seva anàlisi i buscant metabòlits de les drogues. Aquests metabòlits, però, normalment són més polars que les drogues i els trobarem en

cabell a concentracions més baixes, la qual cosa obliga a utilitzar tècniques més sensibles per a l'anàlisi,

- es pot produir migració de les drogues al llarg del cabell que pot donar lloc a resultats falsos positius en subjectes que es troben en programes de desintoxicació,
- biaixos fisiològics i no fisiològics (incorporació de les drogues a través de la suor o del sèu, efectes racials, tractaments cosmètics) que poden afectar al resultat quantitatiu i a la relació entre la dosi i la concentració de la droga trobada en cabell,
- manca de material de referència per controlar la qualitat de les anàlisis, pel que es fa molt difícil controlar tant els rendiments d'extracció com la quantificació.

L'anàlisi de drogues en cabell es compon de quatre etapes: rentat (descontaminació), extracció de les drogues del cabell (digestió del cabell), purificació dels extractes obtinguts (si cal) i anàlisi instrumental. L'anàlisi de drogues en cabell, normalment, es porta a terme realitzant primer una anàlisi de cribratge per tècniques immunològiques, que permet la detecció per grups de substàncies i, després, realitzant una anàlisi de confirmació per tècniques cromatogràfiques acoblades a un detector d'espectrometria de masses o d'espectrometria de masses en tàndem, que permet identificar i quantificar les drogues i metabòlits que puguin estar presents en el cabell.

Abans de l'anàlisi instrumental i un cop s'ha rentat el cabell cal, doncs:

- extreure les drogues i els seus metabòlits de la matriu de cabell on romanen lligats als seus constituents (melanina, proteïnes),
- concentrar les drogues i els seus metabòlits en un solvent que sigui compatible amb les tècniques instrumentals utilitzades.

No hi ha un mètode universal d'extracció de les drogues del cabell, depèn de la naturalesa i estabilitat química del compost a extreure. Es poden

diferenciar els següents mètodes d'extracció: extracció en condicions bàsiques, adequat per compostos estables com amfetamines i cannabinoids (Quintela et al., 2000), extracció en condicions àcides suaus, adequat per opiacis i cocaïna (Girod i Staub, 2000), hidròlisi enzimàtica utilitzant, per exemple, glucuronidasa (Quintela et al., 2000) i extracció utilitzant solvents com metanol o etanol (Scheidweiler i Huestis, 2004). Després de l'etapa d'extracció és necessari purificar els extractes per minimitzar les possibles interferències i concentrar les drogues i els seus metabòlits en un solvent que sigui compatible amb els tècniques instrumentals utilitzades. Quan l'anàlisi es realitza per tècniques cromatogràfiques, aquesta etapa es porta a terme, majoritàriament, mitjançant una extracció líquid-líquid o una extracció en fase sòlida.

En els darrers anys s'han desenvolupat molts mètodes que permeten el cribratge i la confirmació (identificació i quantificació) de drogues i els seus metabòlits en cabell (Segura et al., 1999; Kintz, 2004a; Schaffer i Hill, 2005; Kintz, 2007a; Laloup et al., 2008; Raes et al., 2008). Això ha fet possible la utilització del cabell per a l'anàlisi de drogues, tant en toxicologia clínica com forense. Han estat molts els camps on el cabell s'ha utilitzat. A continuació es detallen algunes de les aplicacions de l'anàlisi de drogues i fàrmacs en cabell:

- S'ha utilitzat per determinar el consum de drogues en l'àmbit laboral (Caplan i Goldberger, 2001), en l'obtenció o retirada del carnet de conduir (Stramesi et al., 2008; Kronstrand et al., 2010) i en el control antidopatge (Kintz i Samyn, 2002).
- Consum de drogues i responsabilitat penal. S'ha utilitzat per determinar si els sospitosos d'homicidis es trobaven sota els efectes de drogues o fàrmacs en el moment del crim (Klein et al., 2000).
- Abús de drogues i intoxicació crònica. S'ha emprat per conèixer la història de consum de drogues d'un individu (Pichini et al., 2006) i per controlar el consum en programes de desintoxicació

(Goldberger et al., 1998; Pichini et al., 2007), per determinar l'exposició i el consum de tabac (Pellegrini et al., 2010; Pichini et al., 2007), per determinar l'exposició a drogues durant l'etapa d'embaràs (Pichini et al., 2003; Lozano et al., 2007) i per detectar intoxicacions per contaminació i adulteració d'aliments (Tsatsakis et al., 2004).

- Toxicologia postmortem. S'ha utilitzat per demostrar l'efecte del consum de drogues en malalties greus, per determinar el consum de drogues en suïcidis i per demostrar la relació entre l'abús de drogues i accidents mortals (de trànsit, laborals, etc) (Kintz, 2004b).
- Actes criminals. S'ha emprat el cabell per determinar si les víctimes havien estat drogades (Kintz, 2007b).
- Monitoratge terapèutic de fàrmacs. S'ha utilitzat per controlar el seguiment del tractament amb fàrmacs (Nakahara, 1999; Pichini et al., 2007).
- Alcohol. El cabell s'ha emprat per diferenciar entre un consum social i un abús (Pragst et al., 2000; Jurado et al., 2004).

1.1.2. Saliva / Fluid oral

La saliva és el fluid recollit directament de les glàndules salivals i el fluid oral és el recollit a la cavitat oral on, a més de saliva, també hi ha quantitats petites de fluid crevicular de les genives (Kintz i Samyn, 2002). S'han utilitzat indistintament tant saliva com fluid oral per anomenar el fluid d'anàlisi, però actualment és més utilitzat el terme fluid oral.

El fluid oral és un fluid complex produït, majoritàriament, per les tres glàndules salivals principals: paròtida, submandibular i sublingual (Huestis i Cone, 1998; Spiebler, 2004). Aquestes tres glàndules formen unitats anatòmiques perfectament distingibles i es situen fora de la cavitat oral (**Figura 1.2**).

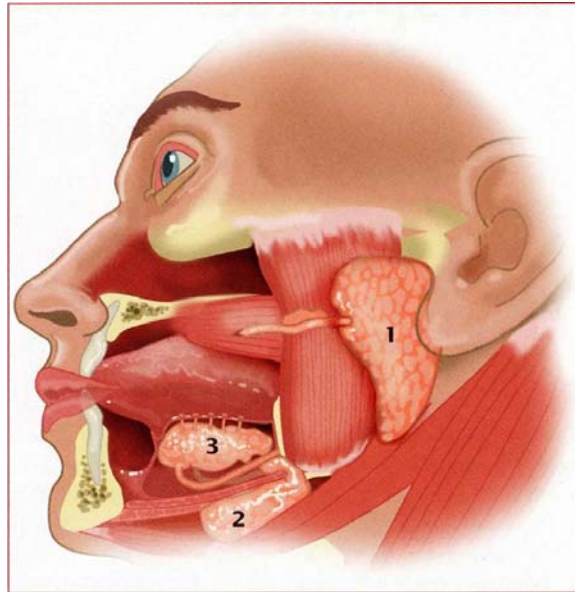


Figura 1.2. Localització de les tres glàndules salivals principals: paròtida (1), submandibular (2) i sublingual (3). (Figura de Aps i Martens, 2005)

La secreció de fluid oral està controlada pel sistema nerviós simpàtic i parasimpàtic. Generalment, l'estimulació del sistema nerviós simpàtic, via noradrenalina, dóna lloc a nivells baixos de fluid, mentre que l'estimulació del sistema nerviós parasimpàtic, via acetilcolina, indueix la secreció de quantitats elevades de fluid (Spiehler, 2004).

El percentatge de fluid oral secretat per cadascuna de les glàndules varia depenent de la situació: repòs o estimulació. En repòs, el 70% del fluid oral és produït per la glàndula submandibular, el 25% per la glàndula paròtida i la resta per la glàndula sublingual i altres glàndules més petites que es troben disperses per tota la mucosa oral. Durant l'estimulació, la producció de fluid oral per part de la glàndula paròtida augmenta i pot arribar a ser del 50%, però els percentatges varien en funció del tipus, la intensitat i la durada de

l'estimulació. L'estímul més important per secretar fluid oral és la presentació i la ingesta de menjar.

La composició del fluid oral varia depenent del flux, però consisteix en, aproximadament, un 90% d'aigua i un 10% d'electròlits, amilasa, glucosa, urea, lípids, proteïnes (enzims) i hormones. En condicions normals, un adult produeix entre 500 i 1500 mL de fluid oral al dia, amb un flux entre 0.1-10 mL/min. Les concentracions dels electròlits i el volum de fluid oral produït estan influenciats pel moment del dia i també pel tipus d'estimulació de la salivació (Aps i Martens, 2005). Aquesta és la principal diferència entre el fluid oral i el plasma, en el qual les concentracions dels diferents components varien dins un rang molt estret.

La concentració d'ió bicarbonat al fluid oral depèn del tipus de glàndula, del tipus d'estimulació i del flux de fluid oral produït. Pot ser més alta o més baixa que la concentració en plasma. Com a resultat de l'augment de la concentració de bicarbonat, el pH del fluid oral augmenta. Quan el fluid oral és recollit de manera no estimulada, té un pH entre 5.6 i 7, però quan és recollit de manera estimulada, la concentració de bicarbonat augmenta i això provoca un increment del valor del pH, que pot arribar a assolir el valor que té al plasma (7.4) o més alt (Kidwell et al., 1998; De la Torre et al., 2004).

Existeixen tres grans rutes d'incorporació de les drogues des del corrent sanguini al fluid oral: per un procés de difusió passiva, per un procés actiu contra gradient de concentració i per ultrafiltració a través dels porus de les membranes. El mecanisme predominant de pas és per difusió passiva des del corrent sanguini al fluid oral i està regulat per les característiques físico-químiques de la droga, com són el pes i el volum molecular, les constants de dissociació, la lipofilitat de la droga i la quantitat de droga lligada a proteïnes (Huestis i Cone, 1998; Laloup et al., 2008; Spiehler i Cooper, 2008).

Per a un compost liposoluble, la relació teòrica entre la concentració total de la droga en fluid oral i en plasma es pot expressar per l'equació de Henderson-Hasselbach modificada:

Per a drogues bàsiques:

$$\frac{C_F}{C_P} = \frac{[1 + 10(pK_b - pH_F)]}{[1 + 10(pK_b - pH_P)]} + \frac{f_P}{f_F}$$

Per a drogues àcides:

$$\frac{C_F}{C_P} = \frac{[1 + 10(pH_F - pK_a)]}{[1 + 10(pH_P - pK_a)]} + \frac{f_P}{f_F}$$

On C_F i C_P són la concentració total de droga en fluid oral i en plasma, respectivament, pK_b és el logaritme negatiu de la constant de dissociació per drogues bàsiques, pK_a és el logaritme negatiu de la constant de dissociació per drogues àcides, pH_F és el pH del fluid oral, pH_P és el pH del plasma, f_P és la fracció de droga lligada a proteïnes en plasma i f_F és la fracció de droga lligada a proteïnes en fluid oral.

D'acord amb aquestes equacions, drogues poc lligades a proteïnes que són bases febles es concentraran en fluids que tenen un pH inferior al del plasma. Aquestes drogues assoliran concentracions similars a les del plasma en fluids que tinguin un pH similar al del plasma. La situació oposada la trobem amb drogues que són àcids febles. Per a les drogues que no són àcides ni bàsiques, la relació concentració fluid oral/plasma serà propera a la unitat. Les principals drogues d'abús, particularment psicoestimulants com cocaïna i amfetamines, són bases febles amb un pK_a superior a 8-9. Per aquesta raó, i donat que el fluid oral té un pH inferior al del plasma, l'excreció d'aquestes substàncies en fluid oral és, almenys teòricament, rellevant. Hi ha diversos

estudis que demostren que aquestes substàncies tendeixen a concentrar-se en fluid oral (Cone, 1993; Kidwell et al., 1998; Moolchan et al., 2000).

En el fluid oral trobem principalment la droga inalterada (Cone i Huestis, 2007) degut a que és més liposoluble que els seus metabòlits i, per tant, és més fàcil que passi per difusió passiva del corrent sanguini al fluid oral (Crouch, 2005 i Drummer, 2005).

Quan l'administració de la droga és per via oral, fumada o per via intranasal, per exemple heroïna, metamfetamina, marihuana i cocaïna, es produeix contaminació de la cavitat oral i això provoca un augment de les concentracions de les drogues trobades en fluid oral, superiors a les calculades a partir de l'equació de Henderson-Hasselbach modificada (De la Torre et al., 2004). En alguns casos, després d'un període d'unes 2 hores, els nivells de les drogues en fluid oral reflecteixen millor les concentracions de les drogues en plasma (Crouch, 2005).

La relació de les concentracions entre el fluid oral i el plasma es veu afectada per la manera en què es recull el fluid oral (Crouch, 2005). Això, juntament amb el fet que per algunes drogues la relació concentració droga fluid oral/plasma presenta una variabilitat intra-individual molt alta, limita la utilitat de les mesures individuals de drogues en fluid oral per predir les concentracions de drogues en plasma.

El fluid oral és la matriu alternativa més utilitzada, en substitució del plasma, per al monitoratge de diferents fàrmacs i drogues i per a estudis farmacocinètics i farmacotoxicològics. Això és degut als diferents avantatges que presenta la seva utilització (Huestis i Cone, 1998; Kidwell et al., 1998; Choo i Huestis, 2004; Kadehjan, 2005; Laloup et al., 2008; Spiehler i Cooper, 2008):

- La recollida és senzilla i no invasiva, la qual cosa fa que sigui molt útil per a estudis que es realitzen en nens, en gent gran, en dones embarassades i en pacients amb problemes d'irritació de la pell o bé amb risc d'infecció. També és útil en situacions on cal recollir més d'una mostra.
- Tot el procés de recollida es pot portar a terme sota estricta vigilància, això minimitza la possibilitat d'adulteració, substitució o dilució de la mostra.
- Existeixen dispositius comercials que permeten recollir i realitzar l'anàlisi de drogues en fluid oral, la qual cosa facilita l'anàlisi.
- Les concentracions de drogues en fluid oral, en principi, reflecteixen les concentracions de la fracció de droga lliure en plasma, responsable dels efectes farmacològics.
- Permet detectar un consum recent de les drogues i hi ha evidències que, quan una droga es detecta en fluid oral, és molt probable que el subjecte es trobi sota els seus efectes (Pichini et al., 1996)
- Drogues que són bases febles es detecten en concentracions més elevades i durant més temps en fluid oral que en plasma.
- El fluid oral presenta baixa complexitat com a matriu, la qual cosa facilita la seva anàlisi.

El fluid oral, però, també presenta una sèrie de limitacions que cal tenir en compte (Huestis i Cone, 1998; Kidwell et al., 1998; Choo i Huestis, 2004; Kadehjan, 2005; Laloup et al., 2008; Spiehler i Cooper, 2008):

- El volum recollit és baix i, per tant, hi ha limitació de fluid oral disponible per realitzar l'anàlisi.
- El volum recollit varia en funció del dispositiu de recollida utilitzat.
- Es pot produir contaminació oral depenent de la ruta d'administració de la droga; això incrementa la possibilitat de

detecció, però redueix la correlació amb la concentració de la droga en plasma.

- Les concentracions de les drogues en fluid oral es veuen afectades pel mètode utilitzat per recollir-lo, ja que, depenent del sistema emprat, es produeixen canvis en el pH del fluid oral i en el flux recollit; això afecta a les concentracions de les drogues (Kidwell et al., 1998).
- Les concentracions que es troben en fluid oral són baixes. Això, juntament amb el fet que el volum de fluid oral disponible per realitzar l'anàlisi és limitat, fa necessari la utilització de metodologies analítiques sensibles.
- El fluid oral no permet estudiar el consum retrospectiu (llargs períodes) d'una droga. El fluid oral permet detectar només un consum recent similar al que és possible detectar utilitzant plasma (Verstraete, 2004).

Hi ha dues maneres d'enfocar l'anàlisi de drogues en fluid oral, depenent de com es realitza l'anàlisi de cribatge, que a la vegada depèn de com es realitza la recollida de fluid oral. El primer consisteix en recollir el fluid oral dins un recipient adient o bé emprant un dispositiu de recollida comercial i analitzar la mostra utilitzant un mètode de cribatge, normalment per tècniques immunològiques, i després sotmetre la mostra a una anàlisi de confirmació per tècniques cromatogràfiques. La segona manera d'abordar l'anàlisi de drogues en fluid oral consisteix en utilitzar un sistema que permeti recollir el fluid oral i realitzar la primera anàlisi (de cribatge) en el mateix lloc de la recollida (Point of care testing, POCT) i després transportar la mostra al laboratori i realitzar l'anàlisi de confirmació per tècniques cromatogràfiques.

La recollida de fluid oral sense utilitzar un dispositiu comercial es pot fer escopint, o bé deixant que el fluid oral caigui lliurement dins un recipient

adient. Tot i que les mostres recollides d'aquestes dues maneres són les preferides, donat que reflecteixen millor les concentracions de les drogues en fluid oral, el procés de recollida és bastant desagradable i, per això, normalment es solen emprar els dispositius de recollida comercials. Aquests consisteixen en un cotó absorbent que s'introdueix a la boca durant uns minuts i després es submergeix en un tampó del propi dispositiu que conté estabilitzadors que permeten extreure i estabilitzar les possibles drogues i metabòlits presents. En els últims temps s'han desenvolupat i s'han realitzat un gran nombre d'estudis relacionats amb els dispositius de recollida comercials (Niedbala et al., 2001a; Crouch, 2005; Dickson et al., 2007; Walsh et al., 2007; Crouch et al., 2008; Drummer, 2008; Langel et al., 2008; Bosker i Huestis, 2009). Actualment hi ha molts dispositius comercials disponibles, alguns exemples en són: Cozart® DDS (Cozart Biosciences Ltd., Abingdon, Oxfordshire, United Kingdom), Salivette® (Sarstedt AG, Rommelsdorf, Germany), Intercept® (OraSure Technologies, Bethlehem, PA, USA), Finger Collector® (Avitar Technologies, Inc., Canton, MA, USA), ORALscreen™ (Avitar Technologies, Inc, Canton, MA, USA) i Quantisal™ (Immunoanalysis Corporation, Pomona, CA, USA). Tots ells presenten problemes que cal tenir en compte:

- el volum de fluid recollit és baix, limitant la quantitat de mostra disponible per analitzar diferents drogues,
- el volum recollit és molt variable, tant entre els diferents dispositius com considerant un sol dispositiu.

El primer problema es va solucionant perquè es desenvolupen tècniques analítiques més sensibles que permeten detectar concentracions més baixes de les drogues i diverses drogues a la vegada i, per tant, es necessita menys volum de mostra. El segon és més problemàtic i es deu a la variabilitat en el volum de fluid oral recollit del subjecte i a la variabilitat en el volum de tampó que conté el dispositiu. Això fa variar les concentracions de drogues en el fluid oral, donat que la concentració depèn del grau de dilució.

La concentració de drogues al fluid oral també depèn de l'estimulació que es produeix quan s'introdueix un cotó a la boca. És impossible prevenir i controlar l'estimulació si s'empren dispositius de recollida comercials. Altres maneres d'estimular la producció de fluid oral són: utilitzar àcid cítric o pastilles amb diferents gustos, o bé mastegar substàncies inerts (parafina, tefló, etc) (Crouch et al., 2004). L'estimulació de la producció de fluid oral presenta una sèrie d'avantatges, com per exemple, permet obtenir volums més elevats de fluid oral. Però també cal tenir en compte que estimular la producció de fluid oral fa augmentar el seu pH i això provoca que les concentracions de les drogues disminueixin (Choo i Huestis, 2004; Crouch, 2005; Bosker i Huestis, 2009). Finalment, una de les limitacions més importants dels dispositius comercials és l'adsorció de drogues als cotons i a les parets dels dispositius, la qual cosa pot portar a informar mostres erròniament com a negatives (Gallardo i Queiroz, 2008). Les cases comercials intenten solucionar aquest problema utilitzant barreges que contenen diferents productes, els quals contribueixen a estabilitzar les drogues i ajuden a la seva recuperació.

En els últims temps s'han publicat gran nombre d'estudis relacionats amb l'anàlisi de drogues d'abús en fluid oral (Drummer, 2006; Cone i Huestis, 2007; Pil i Verstraete, 2008) i moltes drogues i els seus metabòlits han estat detectats en fluid oral obtingut de consumidors habituals de drogues (Cone, 2001; Hofman, 2001; Samyn et al., 2007; Concheiro et al., 2008). També s'han desenvolupat molts mètodes que permeten el cribratge i la confirmació de drogues en fluid oral (Gallardo i Queiroz, 2008; Lillsunde, 2008; Bosker i Huestis 2009). Tot això ha fet que el fluid oral sigui cada cop més utilitzat per a l'anàlisi de drogues en diferents àmbits com el de la toxicologia clínica i forense (Kintz i Samyn, 2002), en el tests de control de carretera per detectar si els conductors es troben sota els efectes de les drogues en el moment de la recollida (Samyn et al., 2002; Verstraete, 2005a; Crouch et al., 2008;

Blencowe et al., 2011; Wille et al., 2010), en l'àmbit laboral, particularment quan s'ha produït un accident i cal valorar el consum de drogues (Caplan i Goldberger, 2001; Verstraete i Pierce, 2001; Bush, 2008; Walsh, 2008; Moore, 2011) i també ha estat utilitzat per a la detecció del consum de drogues en altres situacions, com per exemple, per determinar la presa de drogues en consumidors habituals (Pichini et al., 2002) i per controlar el consum en persones que es troben a la presó o en centres correccionals, o bé en sospitosos d'algun crim.

1.2. QUALITAT ALS LABORATORIS D'ANÀLISI

1.2.1. Assegurament de la qualitat dels resultats analítics

Els resultats analítics obtinguts pels laboratoris es poden utilitzar per prendre decisions clíniques i legals que poden tenir molta repercussió per a la vida d'un individu i per a la societat en general. Per aquesta raó, és molt important desenvolupar eines que permetin assegurar l'obtenció de resultats analítics fiables en base als quals es puguin prendre decisions correctes.

Per assegurar la qualitat dels resultats analítics, els laboratoris d'assaig han d'implementar sistemes de qualitat que permetin controlar tots aquells aspectes que poden influir en l'obtenció d'un resultat analític fiable, és a dir, tots els factors implicats en l'anàlisi d'una mostra. En el context dels laboratoris d'anàlisi, un del sistemes de qualitat més important està basat en la norma ISO/IEC 17025 (ISO/IEC, 2005b). Segons aquesta norma, l'estratègia d'assegurament de la qualitat dels resultats inclou tot un conjunt de mesures que el laboratori ha de prendre per garantir la qualitat dels resultats. Aquestes mesures són (**Figura 1.3**):

- La utilització de mètodes analítics validats, de manera que permetin assegurar que els objectius de qualitat seran assolits.
- La correcta aplicació dels procediments d'anàlisi mitjançant el control de tots els factors que hi intervenen (entrenament del personal, control de les condicions ambientals, calibratge dels equips, qualitat dels reactius i materials de referència,...).
- El desenvolupament d'un sistema de control intern que permeti verificar i demostrar que el nivell de qualitat exigít es compleix en condicions de treball normals.
- La participació en programes de garantia externa de la qualitat que permeti al laboratori comparar la qualitat dels seus resultats analítics amb la qualitat dels resultats d'altres laboratoris.

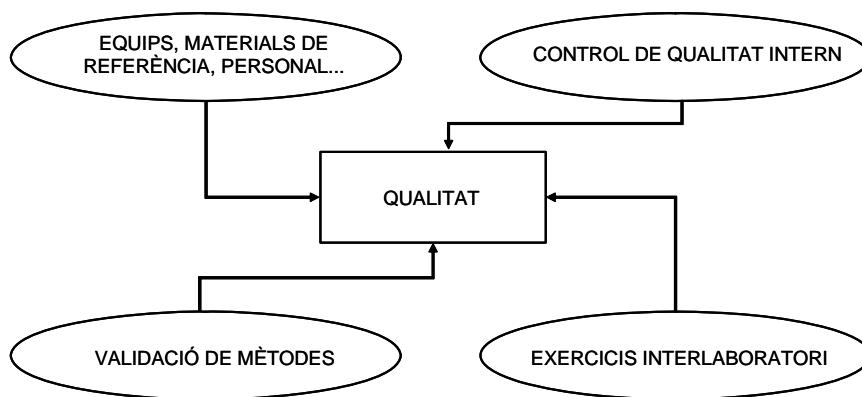


Figura 1.3. Esquema dels principals aspectes implicats en l'assegurament de la qualitat als laboratoris d'anàlisi.

L'ús de mètodes analítics adequats és molt important per tal d'assegurar la fiabilitat dels resultats que s'obtenen. La manera objectiva de demostrar si un mètode és adequat per a la finalitat i objectius perseguits, és mitjançant la

validació del mètode analític. Validar un mètode consisteix en verificar i documentar la seva validesa, això és, la seva adequació a uns determinats requisits prèviament establerts per l'usuari, per poder resoldre un problema analític concret. Aquests requisits són els que defineixen els paràmetres o criteris de qualitat que ha de tenir el mètode per poder resoldre el problema analític.

Tot i que es mantinguin totes les mesures establertes per assegurar l'obtenció d'un resultat correcte, la possibilitat d'error durant la realització del procediment està present i, per això, és necessari disposar d'una eina que permeti detectar i corregir els possibles errors. Aquesta eina és establir un sistema de control de qualitat. Aquest es defineix com el conjunt d'activitats i tècniques operacionals, empreses pel personal d'un laboratori, per a l'avaluació continuada de la fiabilitat del seu treball i dels resultats obtinguts. El control de qualitat avisa quan un procediment analític produeix resultats amb errors superiors als preestablerts. Existeixen dos tipus de control de qualitat: intern i extern, i ambdós són necessaris per assolir la màxima qualitat dels resultats analítics (Ferrara et al., 1998).

Els procediments de control intern de qualitat estan adreçats a la detecció de problemes quan es treballa en condicions normals i es basen en l'anàlisi de mostres de referència (material de referència), juntament amb les mostres que analitza el laboratori (mostres de rutina). El control intern de qualitat permet detectar els canvis relacionats amb factors variables (estabilitat de reactius i materials de referència, substitució de personal, manteniment d'equips, contaminació, etc) que fan referència a l'error aleatori (Petersen et al., 1996). Quan es treballa amb mètodes qualitius (adreçats a la identificació d'una droga), el control intern de qualitat es basa en l'avaluació de diferents paràmetres qualitius en els materials de referència i en les mostres de rutina (Jiménez et al., 2002). Quan es treballa amb mètodes

analítics quantitius (adreçats a l'obtenció d'una concentració de la droga), el control intern de qualitat es basa en la verificació de la concentració d'aquesta droga en el material de referència i en la utilització de gràfics de control, per establir els criteris d'acceptació dels resultats i per controlar la qualitat dels resultats al llarg del temps (Compañó i Ríos, 2002).

Els errors associats a factors permanents no poden ser corregits mitjançant els sistemes de control intern de la qualitat. Per això és necessari el control extern, la participació en programes de control extern de la qualitat. Aquests permeten detectar errors que afecten a l'exactitud. La participació en programes externs (Badia et al., 1998) permeten al laboratori, per una banda, conèixer i millorar la qualitat dels resultats analítics comparant el seu rendiment amb altres laboratoris i, per l'altra, avaluar la qualitat dels mètodes analítics utilitzats per analitzar les mostres (Compañó i Ríos, 2002; Ferrara et al., 1998).

1.2.2. Control extern de la qualitat

Un programa de control extern de la qualitat, també anomenat exercici interlaboratori o d'intercomparació, es basa en l'acceptació, per part de diferents laboratoris, de portar a terme unes mateixes anàlisis, sota la coordinació d'una organització, amb l'objectiu d'avaluar la qualitat del seu treball, d'avaluar un mètode o bé determinar alguna propietat d'un material (el contingut d'un element o compost, etc.). La missió principal de l'organització responsable d'un exercici interlaboratori és la d'establir els objectius del mateix, les condicions de participació dels laboratoris, assegurar la qualitat i estabilitat de la mostra objecte d'estudi, així com realitzar un tractament estadístic dels resultats. El laboratori participant cal que es comprometi a seguir les condicions establertes per l'organització, que varien segons el tipus d'exercici en què participi.

Tot i que normalment només s'utilitzen els termes exercicis interlaboratori o d'intercomparació, en realitat, segons l'objectiu que tinguin, els exercicis interlaboratori es poden classificar en:

- Exercicis d'intercalibració, coneguts com assaigs d'aptitud. Tenen com a objectiu avaluar l'exactitud i precisió dels resultats generats per una sèrie de laboratoris.
- Exercicis col·laboratius. Tenen com a finalitat la validació de mètodes analítics.
- Exercicis de certificació. Tenen com a finalitat la certificació de materials de referència.

Els assaigs d'aptitud constitueixen un tipus d'exercici interlaboratori que respon al vocable anglosaxó *proficiency testing*. Són un programa sistemàtic de proves on s'analitzen mostres de composició coneguda per avaluar la capacitat que té el laboratori per generar resultats amb un nivell acceptable de competència.

Com a document normatiu referent als assaigs d'aptitud cal destacar la Guia ISO/IEC 17043 (ISO/IEC, 2010) (*Conformity assessment - General requirements for proficiency testing*). Segons aquesta norma, la utilització dels exercicis interlaboratori està creixent internacionalment per a diferents propòsits, alguns dels quals són:

- Avaluar el funcionament dels laboratoris en quant a mesures específiques i fer un seguiment del seu funcionament de manera contínua.
- Identificar problemes i iniciar accions correctives que poden estar relacionades amb els equips o amb l'analista.
- Establir l'eficàcia i competència de mètodes analítics.
- Proporcionar confiança addicional als clients del laboratori.
- Identificar diferències interlaboratori.

- Orientar als laboratoris participants tenint en compte els resultats obtinguts.
- Avaluar el funcionament d'un procediment analític concret.
- Assignar valors a materials de referència i avaluar la idoneïtat de la seva utilització en un procediment específic.

Altres documents normatius que fan referència a la participació de laboratoris en assaigs d'aptitud són els següents:

- *Selection, Use and Interpretation of Proficiency Testing (PT) Schemes by Laboratories - 2000* (EURACHEM, 2000),
- *EA-03/04: Use of Proficiency Testing as a Tool for Accreditation in Testing* (EA-EUROLAB-EURACHEM, 2001),
- *The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories* (IUPAC Technical Report) (Thompson et al., 2006),
- *ILAC-G13:08/2007: ILAC Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Schemes* (ILAC, 2007).

Els assaigs d'aptitud tenen com a objectiu avaluar el bon funcionament dels laboratoris, ja sigui: per examinar la qualitat d'un laboratori individual, per assegurar que un grup de laboratoris aconsegueix una exactitud acceptable en els seus resultats i que els errors que comet estan sota control estadístic (només existeixen errors aleatoris), o bé per estimular l'interès per la qualitat dels resultats generals.

En aquests exercicis s'avalua l'exactitud i precisió dels resultats generats pels laboratoris participants. Constitueixen una eina bàsica per a l'harmonització i el reconeixement mutu de resultats entre laboratoris. Serveixen també per ajudar a identificar errors i detectar les necessitats de capacitació del personal del laboratori.

Els assaigs d'aptitud estan oberts a tots els laboratoris que desitgin participar; tot i que alguns estan obligats a realitzar-los, com a conseqüència de ser laboratoris acreditats. És desitjable la participació del màxim nombre possible de laboratoris i que es portin a terme rondes periòdiques amb mostres similars, per tal de millorar la qualitat dels resultats amb el temps. Es pretén que el nivell de qualitat dels laboratoris participants sigui cada cop més alt. Aquests exercicis estan organitzats per entitats externes als laboratoris, que disposen de mitjans i experiència per gestionar els exercicis.

En els assaigs d'aptitud no es fixa una metodologia experimental determinada per efectuar les determinacions, sinó que cada laboratori ha d'utilitzar la metodologia habitual que utilitza per a l'anàlisi de les mostres. D'aquesta manera, cada laboratori coneixerà quin és el nivell de qualitat del seu treball diari. Si es prenen precaucions especials, la informació obtinguda correspondrà al nivell més alt de qualitat a què pot arribar el laboratori treballant en aquelles condicions, però no a la seva manera habitual de treballar.

Els assaigs d'aptitud es caracteritzen per l'existència d'una organització o laboratori coordinador, independent i de prestigi, que és el responsable de gestionar tot l'exercici, i per l'existència d'un grup de laboratoris que són els que hi participen (laboratoris participants). L'esquema d'un assaig d'aptitud és el següent (Compañó i Ríos, 2002) (**Figura 1.4**):

- El coordinador ha de subministrar mostres representatives, homogènies i estables i distribuir-les periòdicament als laboratoris participants. La mostra pot o no anar acompanyada d'informació analítica, com per exemple, un mètode analític comú (en el cas dels exercicis col·laboratius).
- Els laboratoris participants han d'analitzar aquestes mostres en un període limitat de temps, tractant-les com si fossin mostres de rutina

i han d'enviar els resultats al coordinador, adjuntant informació analítica, com per exemple, la metodologia analítica utilitzada per a l'anàlisi.

- El coordinador ha de recollir els resultats i avaluar-los amb l'objectiu de treure conclusions sobre la qualitat dels resultats i detectar possibles problemes. Finalment, ha d'incloure aquesta avaluació en un informe de resultats que ha d'enviar a tots els laboratoris que han participat en l'exercici.

Existeix una base de dades europea d'assaigs d'aptitud anomenada EPTIS (European Information System on Proficiency Testing Schemes) (www.eptis.bam.de) que conté informació relativa a assaigs d'aptitud organitzats arreu del món.

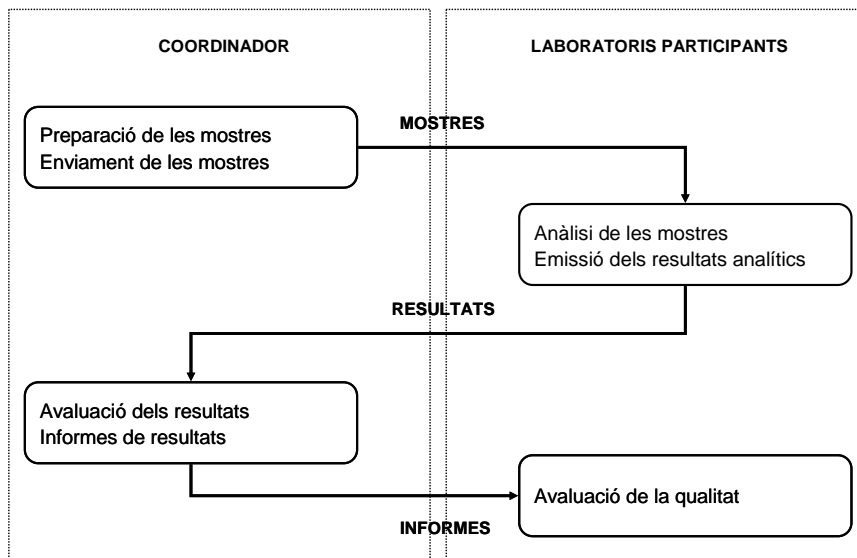


Figura 1.4. Esquema de funcionament d'un exercici interlaboratori.

Un aspecte molt important en els exercicis interlaboratori és la selecció del material que s'utilitzarà per realitzar l'assaig. En aquest sentit, cal definir el tipus de matriu i la natura i el rang de valors del paràmetre (o paràmetres) objecte d'estudi. No tots els materials són aptes per ser utilitzats en un exercici interlaboratori. L'organització responsable de l'exercici ha de garantir que el material subministrat als laboratoris sigui representatiu, homogeni i estable (Compañó i Ríos, 2002):

- Representatiu, pel que fa referència: al tipus i a la concentració de la droga i dels seus metabòlits, a la matriu, al tipus d'unió entre els anàlits i la matriu, a l'estat físic del material i a la presència de possibles substàncies que puguin interferir en l'anàlisi.
- Homogeni: les diferents alíquotes del material que s'envien als laboratoris han de contenir la mateixa concentració de droga i metabòlits.
- Estable: les drogues i metabòlits contingudes en el material han de ser estables.

El material utilitzat ha de ser el més semblant possible a les mostres reals. Les substàncies hi han de ser presents en la forma química apropiada i en concentracions properes a les que es troben en mostres reals. Aquest és un factor molt important que cal tenir en compte quan s'utilitzen mostres addicionades com a material d'assaig, que es preparen addicionant quantitats conegudes de droga sobre matriu blanca (que no conté la droga). Per aquesta raó, la millor opció, sempre que sigui possible, és utilitzar mostres reals: mostres clíniques procedents d'estudis d'excreció en voluntaris sans o de consumidors de les drogues.

Una altra característica que ha de complir el material d'assaig és que sigui suficientment homogeni per a cada anàlit, perquè les mostres que s'enviïn als laboratoris no difereixin significativament en les concentracions. Això

permet la comparabilitat entre laboratoris i permet assegurar que les desviacions que el laboratori obté en els resultats són atribuïbles a algun factor relacionat amb la realització de l'anàlisi. El material a utilitzar en un assaig es prepara i es divideix en diferents unitats que són les que s'enviaran a cadascun dels laboratoris participants. Cal comprovar que el material és homogeni dins de cada unitat i també entre unitats. Això es fa analitzant un nombre determinat de replicats d'un nombre de mostres un cop estan envasades en la forma final en què seran conservades (ILAC, 2000).

El material d'assaig utilitzat ha de ser estable. La inestabilitat dels anàlits o de la matriu pot comprometre greument la qualitat del material i dels resultats que s'obtenen de l'anàlisi. Existeixen molts factors que poden estar involucrats en la inestabilitat del material: efectes físics, deguts a la llum o la temperatura; l'activitat química, deguda a possibles reaccions químiques; i l'activitat microbiana, deguda a bacteries, virus, fongs, etc. Quan es prepara el material, cal aplicar procediments que evitin aquests efectes i garanteixin l'estabilitat dels anàlits. L'estabilitat del material s'ha de verificar, és a dir, cal assegurar que el material no patirà cap canvi mentre duri l'assaig. Per això, abans d'enviar el material, s'han d'establir les condicions òptimes de transport, manipulació, emmagatzematge i caducitat del material (Compañó i Ríos, 2002). Aquestes dades són els resultats dels estudis d'estabilitat. L'objectiu d'aquests estudis és identificar i avaluar qualsevol degradació dels anàlits o de la matriu. L'activitat microbiana i la degradació tèrmica són els efectes més habituals de degradació de les mostres biològiques. Per aquesta raó, la majoria d'estudis d'estabilitat en mostres biològiques es basen en avaluar l'estabilitat del material conservant-lo a diferents temperatures. Les condicions en què es realitzen aquests estudis han de reproduir les condicions en les quals es sotmetrà el material durant la realització de l'assaig per planificar el transport i les condicions d'emmagatzematge del material.

1.3. QUALITAT EN L'ANÀLISI DE DROGUES D'ABÚS EN CABELL I EN FLUID ORAL

En els últims temps s'ha realitzat un gran nombre d'estudis relacionats amb l'anàlisi de drogues d'abús en cabell i fluid oral. Això ha fet possible que aquestes dues matrius siguin cada cop més utilitzades per a l'anàlisi de drogues d'abús en diferents àmbits, com el de la toxicologia clínica i forense, en l'àmbit d'anàlisi de drogues en el lloc de treball i en els tests de control en carretera (Drummer, 2006; Kintz, 2007a; Bosker i Huestis, 2009).

La rellevància de les matrius cabell i fluid oral en l'anàlisi de drogues d'abús ha estimulat, per una banda, el desenvolupament de recomanacions i normatives d'utilització de les mateixes, com les *Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs* del *Substance Abuse and Mental Health Services Administration* (SAMHSA, 2004; Bush, 2008), les *Recommendations for hair testing in forensic cases* de la *Society of Hair Testing* (SoHT, 2004), en el cas del cabell, i la inclusió en lleis internacionals de *Driving Under the Influence of Drugs* (Walsh et al., 2004), en el cas del fluid oral. Per altra banda, també ha estimulat la realització de projectes per estudiar l'aplicació potencial d'aquestes matrius per a l'anàlisi de drogues d'abús, com són els projectes europeus *Roadside Testing Assessment* (ROSITA i ROSITA-2) (ROSITA; Verstraete, 2005b; Lillsunde, 2008; Bosker i Huestis, 2009) i *Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines* (DRUID) (DRUID; Lillsunde, 2008; Bosker i Huestis, 2009). Ambdós projectes han estudiat el fluid oral com a possible matriu per identificar drogues en els tests de control en carretera. Fruit d'aquests projectes han sorgit recomanacions per a la utilització de fluid oral en aquest àmbit (Bosker i Huestis, 2009).

Degut a la creixent utilització d'aquestes matrius, és molt important desenvolupar eines que permetin conèixer la qualitat dels resultats analítics i

que permetin assegurar que els resultats obtinguts són fiables i lliures d'error. Els exercicis interlaboratori són eines fonamentals per avaluar la qualitat dels resultats analítics (ISO/IEC, 2005b) i, per a poder realitzar aquests exercicis, és necessari disposar de materials d'assaig que siguin homogenis, estables i representatius en quant al tipus i a la concentració de droga i metabòlits que es poden trobar en mostres reals (Ferrara et al., 1998; Compañó i Ríos, 2002; Thompson et al., 2006).

Pel que fa referència a la representativitat del material d'assaig, durant molts anys, els pocs exercicis interlaboratori existents en cabell i en fluid oral han estat orientats a la toxicologia forense i han tingut una finalitat informativa-educativa, degut a que fins el moment la utilització d'aquestes matrius ha estat molt restringida a l'anàlisi de casos aïllats en toxicologia forense. Això ha fet que aquests exercicis tinguessin un nombre restringit de laboratoris participants i, per tant, ha fet possible la utilització de casos clínics com a material d'assaig. Donat l'increment en la utilització d'aquestes matrius, es preveu que el nombre de laboratoris participants en els exercicis interlaboratori vagi augmentant i, per tant, fa pensar que la utilització de materials d'assaig obtinguts de casos clínics cada cop serà menys viable, degut a la limitació en l'obtenció de grans quantitats de mostra contenint concentracions adequades de droga. Caldrà, doncs, dissenyar de nou aquests programes per tal d'adaptar-los a les noves realitats en l'anàlisi de matrius biològiques no-convencionals. Una de les opcions és utilitzar com a material d'assaig mostres adicionades sobre matriu blanca.

En quant a l'homogeneïtat i l'estabilitat del material d'assaig, hi ha una manca d'informació referent a les condicions òptimes, de preparació i conservació d'aquests materials, que permetin assegurar que les drogues s'han incorporat de forma homogènia al material d'assaig i no es degradaran durant el temps que duri l'exercici.

CAPÍTOL 2

OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquesta tesi és desenvolupar eines que permetin avaluar la qualitat dels resultats dels laboratoris que analitzen drogues d'abús en cabell i fluid oral i avaluar l'efecte de diferents accions sobre la qualitat final dels resultats. Per aquest motiu, s'han organitzat exercicis interlaboratori i s'han realitzat estudis per desenvolupar materials d'assaig adequats.

Els objectius específics del present treball són:

1. Respecte a l'anàlisi de drogues d'abús en cabell:
 - a. Avaluar la influència del tipus de mostra de partida en la qualitat dels resultats obtinguts.
 - b. Organitzar exercicis interlaboratori que permetin avaluar la qualitat dels resultats analítics i detectar les fonts d'error.
 - c. Portar a terme intervencions de tipus educatiu per millorar la qualitat dels resultats analítics i avaluar l'impacte d'aquestes accions en la qualitat dels resultats.

2. Respecte a l'anàlisi de drogues d'abús en fluid oral:
 - a. Desenvolupar i validar un mètode analític que permeti identificar i quantificar 6-monoacetil morfina, morfina, codeïna, cocaïna i benzoilecgonina en fluid oral.
 - b. Realitzar estudis d'estabilitat de les principals drogues en fluid oral que permetin establir les condicions òptimes de preparació, transport i conservació de mostres de fluid oral per ser utilitzades com a material d'assaig en exercicis interlaboratori.
 - c. Organitzar exercicis interlaboratori que permetin avaluar la qualitat dels resultats analítics i detectar les fonts d'error.

CAPÍTOL 3

ANÀLISI DE DROGUES D'ABÚS EN CABELL

3.1. INTRODUCCIÓ

Els primers exercicis interlaboratori en l'anàlisi de drogues d'abús en cabell foren organitzats per la Society of Hair Testing (SoHT), la Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA) i el National Institute of Standards and Technology (NIST) (Kintz, 1995; Sniegoski i Welch, 1996; Kintz i Cirimele, 1997; Sachs, 1997; Deveaux et al., 2000; Jurado i Sachs, 2003). Un dels objectius de la SoHT és l'organització d'exercicis interlaboratori (Sachs, 1997; Jurado i Sachs, 2003). Aquests exercicis es van utilitzar per conèixer la qualitat dels resultats informats pels laboratoris i per avaluar l'eficàcia de les metodologies utilitzades en les diferents parts de l'anàlisi de drogues d'abús en cabell. Els laboratoris que participen en els exercicis de la SoHT són experts en l'anàlisi de drogues en cabell.

Com en altres països d'Europa, a Itàlia existeixen laboratoris que realitzen anàlisis de drogues en cabell (Strano-Rossi et al., 1995; Chiarotti et al., 1996; Tagliaro et al., 1997; Montagna et al., 2000; Ricossa et al., 2000). En acceptar-se l'anàlisi de drogues en cabell com a prova complementària per a l'obtenció del carnet de conduir, va fer que aquest tipus de determinacions sortissin del marc de la toxicologia legal i forense, i fossin practicades per laboratoris clínics. Els resultats obtinguts permetien prendre decisions clíniques i legals que eren acceptades pel Govern Italià i, per tant, era important avaluar la qualitat dels resultats analítics obtinguts per aquests laboratoris. L'any 2002 es va organitzar un exercici interlaboratori en l'anàlisi de drogues d'abús en cabell on van participar laboratoris italians (Montagna et al., 2002). L'objectiu, però, d'aquest exercici va ser avaluar l'eficàcia d'un procediment analític determinat, amb la qual cosa els laboratoris participants no van utilitzar la metodologia que empraven normalment en el seu laboratori per a l'anàlisi de les mostres de rutina, per tant, aquest exercici no va permetre avaluar la qualitat dels resultats d'aquests laboratoris quan utilitzaven els seus

procediments. Hi havia una manca d'informació sobre la qualitat dels resultats analítics i sobre l'existència d'una harmonització en la metodologia analítica utilitzada per a l'anàlisi de drogues d'abús en cabell.

Per tal d'avaluar la qualitat en l'anàlisi de drogues d'abús en cabell, l'any 2002, l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM) de Barcelona i l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) de Roma van crear el Programa de Garantia Externa de la Qualitat en l'Anàlisi de Drogues d'Abús en Cabell (HAIRVEQ), finançat pel Departament d'Afers Socials del Govern Italià i obert a tots els laboratoris que realitzaven anàlisis de drogues en cabell. Des de l'any 2002 fins el 2006, es van realitzar un total de 9 exercicis interlaboratori. A través de l'avaluació dels resultats qualitatius i quantitius informats pels laboratoris italians en els diferents exercicis, i mitjançant la comparació dels resultats i la metodologia emprada per aquests laboratoris i laboratoris experts en l'anàlisi de drogues d'abús en cabell, va ser possible conèixer la qualitat dels resultats obtinguts pels laboratoris italians, detectar les fonts d'error i conèixer quines mesures correctives era necessari desenvolupar. Pel que fa al material d'assaig utilitzat en els exercicis, van permetre conèixer la influència que té, en els resultats, el tipus de cabell (tallat o polvoritzat) del qual es parteix per realitzar l'anàlisi.

En aquest capítol es descriuen els exercicis interlaboratori organitzats i els resultats obtinguts.

3.2. MATERIAL I MÈTODES

3.2.1. Material d'assaig utilitzat en els exercicis interlaboratori

El material d'assaig utilitzat en els exercicis del programa HAIRVEQ es va preparar a partir de cabell procedent de consumidors de drogues tractats a la Unitat de Toxicomanies de l'Hospital del Mar de Barcelona.

El cabell recollit es va rentar utilitzant un mètode estandarditzat (Kintz i Magin, 1995) consistent en submergir-lo en diclorometà durant dos minuts a temperatura ambient. Aquest procediment es va repetir dues vegades. Seguidament, es va tallar el cabell en petits segments (de pocs mil·límetres de llargada), amb tisores, i es va homogeneïtzar. Quan va caler polvoritzar-lo, el cabell es va col·locar en un molinet de boles a velocitat màxima durant 10 minuts. Finalment, les mostres es van distribuir en tubs contenint 100 mg de cabell i es van conservar protegides de la llum, a temperatura ambient, fins el seu enviament als laboratoris participants.

Prèviament a l'enviament de les mostres als laboratoris, quatre laboratoris de referència van determinar el contingut i van verificar l'homogeneïtat del material, analitzant, cadascun d'ells, quatre porcions de cabell. Per tal d'avaluar l'homogeneïtat de les mostres, es va establir que el coeficient de variació obtingut pels resultats informats fos al voltant del 20% (en ng/mg de cabell).

Els laboratoris de referència van ser: l'Institut Nacional de Toxicologia y Ciencias Forenses de Sevilla (Espanya), Psychomedics Laboratories (Estats Units), l'Istituto di Medicina Legale de Padova (Itàlia) i la Unitat de Farmacologia de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica de Barcelona

(Espanya). Per a l'anàlisi de les diferents substàncies, els laboratoris van aplicar el mètode d'anàlisi (rentat, digestió del cabell, purificació dels extractes i anàlisi instrumental) utilitzat en el seu laboratori per a l'anàlisi de les mostres de rutina (Jurado et al., 1995; Pujadas et al., 2003; Cairns et al., 2004a; Cairns et al., 2004b, Cairns et al., 2004c; Frison et al., 2005).

Les mostres de cabell del programa HAIRVEQ van ser avaluades pels següents compostos: opiàcis (heroïna, 6-monoacetil morfina, morfina i codeïna), cocaïna i benzoilecgonina, metadona, amfetamines (amfetamina, metamfetamina, 3,4-metilendioximetamfetamina i 3,4-metilendioxiamfetamina) i cannabinoids (Δ^9 -tetrahidrocannabinol i àcid 11-Nor- Δ^9 -tetrahidrocannabinol-9-carboxílic). Els laboratoris participants van informar tant resultats qualitius (presència/absència de les drogues) com resultats quantitius.

Des de l'any 2002 fins el 2006 es van realitzar 9 exercicis del programa HAIRVEQ. Per dur-los a terme, es van enviar un total de 15 mostres. A la **Taula 3.1** es descriuen els exercicis organitzats per any i el contingut de les mostres analitzades a cada exercici.

Taula 3.1. Exercicis realitzats en el programa HAIRVEQ des de l'any 2002 fins el 2006. Composició (mitjana±desviació estàndard, ng/mg de cabell, dels laboratoris de referència) de les mostres.

a) 6-monoacetil morfina (6MAM), morfina (MOR), cocaïna (COC), metadona (MET), cocaïna (COC) i benzoilecgonina (BZE).

A ^a	E ^b	N ^c	M ^d	6MAM	MOR	COD	MET	COC	BZE
2002	1	23	S11	65.9±13.0	23.0±8.1	2.4±1.5	? ^e	120.6±27.9	56.7±9.9
	2	23	S22	158.4±38.2	55.4±15.7	8.6±4.7	? ^e	63.3±3.0	35.4±6.4
			S23	-	-	-	-	-	-
3	23	S34	4.8±0.9	3.7±0.4	0.9±0.1	? ^e	152.3±11.9	27.4±10.5	
		S35	-	-	-	-	1.3±0.4 ^g	0.3±0.02 ^g	
2003	4	23	S46	65.9±13.0	23.0±8.1	2.4±1.5	? ^e	120.6±27.9	56.7±9.9
			S47	-	-	-	-	-	-
2004	5	26	S58	6.7±0.9	2.6±0.4	0.4±0.1	5.5 ^f	175.1±19.3	68.3±4.9
			S59	6.6±1.8	2.3±0.8	0.4±0.2	5.4 ^f	168.3±14.0	68.1±6.0
2005	6	26	S610	-	-	-	-	-	-
			S611	-	-	-	-	-	-
			S612	-	-	-	-	10.0±0.5	2.7±0.3
2006	7	32	S13						
	8	32	S15	4.9±1.0	3.6±0.2	0.9±0.1	82.4 ^f	150.8±10.4	29.9±6.5
	9	32	S19						

^a Any

^b Exercici

^c Nombre de laboratoris participants a l'exercici

^d Mostres

^e No es disposa de cap valor quantitatiu dels laboratoris de referència

^f Només es disposa del resultat d'un laboratori de referència

^g Només es disposa del resultat de dos laboratoris de referència

- b) 3,4-metilendioximetamfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxiamfetamina (MDA), Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) i Àcid 11-Nor- Δ^9 -tetrahidrocannabinol-9-carboxílic (THCCOOH).

A ^a	E ^b	N ^c	M ^d	MDMA	MDA	THC	THCCOOH
2002	1	23	S11	-	-	-	-
	2	23	S22	-	-	-	-
			S23	-	-	-	-
			S34	-	-	-	-
	3	23	S35	2.3±1.2	0.2±0.1 ^e	-	-
2003	4	23	S46 (=S11)	-	-	-	-
			S47	-	-	-	-
2004	5	26	S58	-	-	-	-
			S59	-	-	-	-
2005	6	26	S610	-	-	-	-
			S611	2.5±0.2	0.2±0.1	-	-
			S612	-	-	? ^f	? ^f
2006	7	32	S13				
	8	32	S15 (=S13)	-	-	-	-
	9	32	S19 (=S15=S13)				

^a Any

^b Exercici

^c Nombre de laboratoris participants a l'exercici

^d Mostres

^e Només es disposa del resultat de dos laboratoris de referència

^f No es disposa de cap valor quantitatiu dels laboratoris de referència

3.2.2. Laboratoris participants en els exercicis interlaboratori

El nombre de laboratoris participants a cada exercici s'indica a la **Taula 3.1**. Una part d'aquests participants eren laboratoris clínics d'hospitals públics pertanyents al Sistema de Sanitat Italià i una altra part eren laboratoris de toxicologia forense pertanyents a Departaments de Medicina Legal Italians. No eren laboratoris experts en l'anàlisi de drogues en cabell, donat que feia poc temps que estaven realitzant aquest tipus d'anàlisi. La participació en el

HAIRVEQ era confidencial i voluntària i no suposava cap cost, per tant, en qualsevol moment el laboratori podia decidir deixar de participar. L'únic criteri d'inclusió era que el laboratori estigués realitzant anàlisis de drogues en cabell.

A l'exercici portat a terme l'any 2005 (exercici 6), a més dels laboratoris italians, també hi van participar laboratoris clínics i forenses d'arreu del món, pertanyents a la Society of Hair Testing (SoHT) (n=21).

3.2.3. Accions específiques realitzades en els exercicis interlaboratori

En els exercicis interlaboratori es van dur a terme una sèrie d'accions específiques que es detallen a continuació.

Per estudiar la influència, en els resultats, del tipus de mostra de cabell de la qual es partia per realitzar l'anàlisi (tallada o polvoritzada), a l'exercici portat a terme l'any 2004 (exercici 5), es van enviar, com a mostres independents, dues alíquotes de la mateixa mostra, una d'elles polvoritzada (S58) i l'altra tallada en segments de pocs mil·límetres de llargada (S59).

Per comparar la qualitat dels resultats obtinguts entre laboratoris no experts i laboratoris experts, a l'exercici del 2005 (exercici 6) hi van participar laboratoris de la SoHT (laboratoris experts), a més dels laboratoris italians (no experts).

Per conèixer si la qualitat de les anàlisis millorava al llarg de la realització dels exercicis, es van portar a terme dues accions específiques. Per una banda, en l'exercici realitzat l'any 2003 (exercici 4), es va tornar a enviar la mostra enviada en el primer exercici (S46=S11) i es van comparar els resultats

informats. Per altra banda, en els tres exercicis realitzats l'any 2006 (exercicis 7, 8 i 9) es va enviar la mateixa mostra, a la vegada que es van portar a terme diferents accions educatives enfocades a millorar la qualitat dels resultats. Els laboratoris que van participar en els tres exercicis van ser els mateixos. En el primer exercici (exercici 7), es va enviar la mostra i es va indicar als laboratoris que l'analitzessin utilitzant les metodologies que empraven rutinàriament en el seu laboratori. En el segon exercici (exercici 8), els laboratoris van tornar a rebre la mateixa mostra, però en aquest cas se'ls van fer una sèrie de recomanacions dels procediments a utilitzar per a l'anàlisi d'opiacis, cocaïna, amfetamines i cannabinoids en cabell, i se'ls van enviar mostres reals de composició coneguda. Els procediments contenien informació de com preparar la mostra (rentat, quantitat de cabell a analitzar, patrons interns), de les mostres de control a utilitzar (nombre, concentració i preparació), de com analitzar les mostres (digestió del cabell, extracció, derivatització i anàlisi instrumental), de l'avaluació i interpretació dels resultats i de les concentracions de tall recomanades. Després del segon exercici, es va realitzar una reunió amb els laboratoris participants per posar en comú els resultats obtinguts i per resoldre qualsevol problema sorgit en l'aplicació dels procediments enviats i en la interpretació dels resultats obtinguts. En el tercer exercici (exercici 9), es va enviar la mateixa mostra per a què els laboratoris l'analitzessin amb les noves metodologies que havien desenvolupat i es va realitzar l'avaluació final dels laboratoris. En cap dels exercicis, els laboratoris sabien que es tractava de la mateixa mostra.

3.2.4. Avaluació dels resultats qualitius i quantitius dels laboratoris participants

Es van avaluar els resultats qualitius i quantitius informats pels laboratoris participants tenint el compte els resultats trobats pels laboratoris de referència.

Els resultats qualitatis (determinació de la presència o absència d'una substància) es van avaluar identificant els resultats falsos negatius i els resultats falsos positius informats pels laboratoris.

Els resultats quantitatis informats per cada laboratori es van avaluar calculant el valor de z-score:

$$z\text{-score} = (X_i - \mu) / \sigma$$

On X_i és el resultat obtingut pel laboratori participant, μ és el valor assignat per a la substància estudiada i σ és la variabilitat acceptable. En els diferents exercicis, es van utilitzar diferents criteris per establir aquests dos paràmetres. En els exercicis del 2002 i 2003, es va utilitzar la mitjana i la desviació estàndard dels resultats dels laboratoris de referència, com a valor assignat i com a variabilitat acceptable, respectivament.

Donat que els valors de z-score calculats d'aquesta manera eren dependents dels resultats dels laboratoris de referència, als exercicis del 2004 i 2005 es va utilitzar, com a variabilitat acceptable, una desviació estàndard relativa (σ) calculada a partir del model de precisió de Horwitz (Horwitz et al., 1980; Horwitz i Albert, 1997). Horwitz va definir una equació que relaciona la concentració d'anàlit a la mostra amb la dispersió dels resultats que es pot esperar en un exercici interlaboratori:

$$\%RSD_{\text{Horwitz}} = 2^{(1-0.5*\log C)}$$

On **%RSD** és la desviació estàndard relativa i **C** és la concentració de l'anàlit expressada com a fracció decimal o potència de 10. Aquesta equació indica que el $\%RSD_{\text{Horwitz}}$ només depèn de la concentració, per tant, és totalment independent de la naturalesa de l'anàlit i del procediment analític utilitzat.

Com a valor assignat, es va utilitzar la mitjana dels resultats informats pels laboratoris de referència, però calculant la mitjana robusta d'aquests resultats, per tal de donar menys pes en el càlcul als valors més allunyats de la resta (Analytical Methods Committee, Royal Society of Chemistry, 1898a i 1989b). Els paràmetres robustos es van calcular seguint la guia *International Standard ISO 13528:2005. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons* (ISO, 2005a).

Finalment, en els exercicis de l'any 2006, es van avaluar els resultats quantitativs mesurant dos valors de z-score diferents: un es va calcular utilitzant, com a valor assignat, la mitjana robusta dels resultats dels laboratoris participants i, com a variabilitat acceptable, la desviació estàndard relativa calculada amb l'equació de Horwitz. L'altre valor de z-score es va calcular utilitzant la mitjana i la desviació estàndard robustes dels laboratoris participants. El criteri que es va seguir per avaluar els resultats quantitativs en base al valor de z-score obtingut va ser: resultats satisfactoris quan $|z| \leq 2$, resultats dubtosos quan $2 < |z| < 3$ i resultats no satisfactoris quan $|z| \geq 3$.

Per cadascun dels exercicis, es va mesurar la dispersió de tots els resultats quantitativs informats, calculant el coeficient de variació (CV%).

En els exercicis portats a terme l'any 2006, també es va mesurar l'exactitud dels resultats informats pels laboratoris, calculant l'error relatiu (ERR%) de la mitjana dels laboratoris participants respecte a la mitjana dels laboratoris de referència.

Per tal d'avaluar si s'havia produït millora al llarg de la participació en els exercicis, es van comparar els resultats de la mostra S11 (exercici 1, any 2002) i la mostra S46 (exercici 4, any 2003). Es va desenvolupar un sistema de puntuació de laboratoris basat en els resultats de z-score obtinguts. Els valors

entre 0 i 1, es van puntuar com a 1; els valors entre 1 i 2, com a 2; els valors entre 2 i 3, com a 3; els valors més alts de 3, com a 4. Les puntuacions obtingudes pels laboratoris per cadascuna de les substàncies es van sumar i es van comparar els resultats.

En l'exercici 5 (any 2004), per comparar els resultats informats pels laboratoris en les mostres S58 i S59 (mostres idèntiques però una polvoritzada i l'altra tallada en petits segments), es va aplicar el test no paramètric de Wilcoxon ($\alpha=5\%$) utilitzant el paquet estadístic SPSS 12.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Es van comparar només els resultats d'aquells laboratoris que havien informat valors quantitatius per ambdues mostres: es van comparar els resultats de 17 laboratoris per cocaïna, de 16 per morfina, de 15 per benzoilecgonina, de 13 per 6-monoacetil morfina i 8 per codeïna.

En l'exercici 6 (any 2005), per comparar els resultats dels laboratoris del programa HAIRVEQ i dels laboratoris de la SoHT, informats per 3,4-metilendioximetamfetamina i 3,4-metilendioxiamfetamina en S611 i per cocaïna i benzoilecgonina en S612, es va utilitzar el test no paramètric U de Mann-Whitney utilitzant el paquet estadístic SPSS 12.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

3.3. RESULTATS

Els resultats obtinguts en els diferents exercicis es descriuen en les següents publicacions:

S. Pichini, **M. Ventura**, M. Pujadas, R. Ventura, M. Pellegrini, P. Zuccaro, R. Pacifici, R. de la Torre. HAIRVEQ: an external quality control scheme for drugs of abuse analysis in hair. *Forensic Sci Int.* 2004;145(2-3):109-115.

M. Ventura, S. Pichini, M. Pujadas, R. Ventura, R. Di Giovannandrea, P. Zuccaro, R. Pacifici, K. Langohr, C. Jurado, R. de la Torre. Four Years' Experience in External Proficiency Testing Programs for Hair Testing of Drugs of Abuse in Italy (HAIRVEQ) and comparison with the Society of Hair Testing Program in 2005. *Ther Drug Monit.* 2007;29(1):11-19.

M. Ventura, C. Stramesi, S. Pichini, R. Ventura, M. Pujadas, R. Di Giovannandrea, P. Zuccaro, R. Pacifici, K. Langohr, R. de la Torre. HAIRVEQ 2006: Evolution of laboratories' performance after different educational actions. *Forensic Sci Int.* 2008;176(1):2-8.

Pichini S, Ventura M, Pujadas M, Ventura R, Pellegrini M, Zuccaro P, Pacifici R, de la Torre R. [HAIRVEQ: an external quality control scheme for drugs of abuse analysis in hair](#). *Forensic Sci Int.* 2004;145(2-3):109-115.

Ventura M, Pichini S, Pujadas M, Ventura R, Di Giovannandrea R, Zuccaro P, Pacifici R, Langohr K, Jurado C, de la Torre R. [Four Years' Experience in External Proficiency Testing Programs for Hair Testing of Drugs of Abuse in Italy \(HAIRVEQ\) and comparison with the Society of Hair Testing Program in 2005.](#) Ther Drug Monit. 2007;29(1):11-19.

Ventura M, Stramesi C, Pichini S, Ventura R, Pujadas M, Di Giovannandrea R, Zuccaro P, Pacifici R, Langohr K, de la Torre R. [HAIRVEQ 2006: Evolution of laboratories' performance after different educational actions.](#) Forensic Sci Int. 2008;176(1):2-8.

3.4. DISCUSSIÓ

Material d'assaig utilitzat en els exercicis interlaboratori

Per poder realitzar exercicis interlaboratori, és important disposar de material d'assaig que sigui representatiu, en quant al tipus i a la concentració de drogues i metabòlits que es poden trobar en mostres reals, que sigui homogeni i que sigui estable. Per tal d'aconseguir-ho, la millor opció és utilitzar mostres reals: mostres clíniques procedents d'estudis d'excreció en voluntaris sans, o bé mostres procedents de consumidors de les drogues. Una alternativa és preparar mostres carregades que siguin representatives de mostres reals, que es preparen addicionant quantitats conegudes de droga sobre matriu blanca (que no conté la droga). Però, en el cas del cabell, aquest opció no és la recomanada donat que no es pot assegurar que les drogues s'incorporin al cabell igual com si es tractés de mostres reals (Sniegoski i Welch, 1996; SoHT, 2004). En el programa HAIRVEQ, en tots els exercicis es van utilitzar mostres reals procedents de consumidors de drogues, de la mateixa manera que a la resta d'exercicis interlaboratori de drogues d'abús en cabell (Kintz, 1995; Sniegoski i Welch, 1996; Kintz i Cirimele, 1997; Sachs, 1997; Deveaux et al., 2000; Montagna et al., 2002; Jurado i Sachs, 2003).

Una altra característica que ha de complir el material d'assaig és que sigui suficientment homogeni per a cada anàlit, per a què les mostres que s'enviïn als laboratoris no difereixin significativament en les concentracions. En el programa HAIRVEQ, l'homogeneïtat de cadascuna de les mostres va ser avaluada pels quatre laboratoris de referència, tal i com s'havia realitzat en els exercicis interlaboratori en cabell portats a terme per la SoHT (Sachs, 1997; Jurado i Sachs, 2003). En el nostre cas, es va establir que el coeficient de variació dels resultats obtinguts pels laboratoris de referència fos al voltant del 20% (en ng/mg de cabell). En alguns casos, però, es van acceptar

coeficients de variació superiors, donat que l'aplicació de mètodes d'anàlisi diferents per part dels laboratoris de referència i la baixa concentració d'alguns dels anàlits presents a les mostres, podia explicar un augment de dispersió en els resultats (Kintz, 1995; Sniegowski i Welch, 1996; Deveaux et al., 2000; Montagna et al., 2002; Jurado i Sachs, 2003).

Un dels avantatges de la utilització del cabell per a l'anàlisi és l'elevada estabilitat de les drogues en ell (Welch et al., 1993; Kintz, 2004a; Pragst i Balikova, 2006; Kronstrand i Druid, 2007). Els factors que poden afectar a l'estabilitat de les drogues en el cabell són els tractaments cosmètics, l'exposició a condicions ambientals extremes, les condicions d'emmagatzematge inadequades o bé el dany sever del cabell (Pötsch i Skopp, 1996; Jurado et al., 1997; Skopp et al., 1997). En el nostre cas, les mostres es van preparar, enviar als laboratoris de referència i es van conservar protegides de la llum i a temperatura ambient, fins el seu enviament als laboratoris participants, tal i com recomana la SoHT (SoHT, 2004).

Un altre aspecte que cal considerar en el cas del cabell és que, per poder realitzar l'anàlisi, abans és necessari fragmentar-lo. Els laboratoris poden tallar-lo en segments de pocs mil·límetres de llargada o bé tallar-lo i posteriorment polvoritzar-lo utilitzant un molinet de boles. Per tant, la mostra de partida per a la realització de l'anàlisi pot ser cabell tallat o bé cabell polvoritzat. Fins l'any 2004, totes les mostres enviades en el programa HAIRVEQ havien estat mostres polvoritzades. A la resta d'exercicis interlaboratori de drogues en cabell, s'havien utilitzat tant mostres de cabell polvoritzades (Kintz, 1995; Kintz i Cirimele, 1997; Sachs, 1997; Deveaux et al., 2000) com tallades en petits segments (Sniegowski i Welch, 1996; Montagna et al., 2002; Jurado i Sachs, 2003). Polvoritzar les mostres, però, presenta un desavantatge enfront a utilitzar mostres tallades en petits

fragments: la neteja del molinet de boles utilitzat per polvoritzar les mostres és molt laboriosa i, moltes vegades, no s'aconsegueix netejar-lo completament. Això pot provocar que es produeixi contaminació entre les mostres. Per tant, si els resultats no depenguessin del tipus de mostra del qual es parteix per realitzar l'anàlisi, es podria utilitzar sempre cabell tallat en petits fragments, evitant així la possible contaminació entre mostres per aquest factor. Fins el moment, però, no hi havia cap treball publicat on s'hagués estudiat aquest problema. Per això, en l'exercici realitzat l'any 2004, es van enviar, com a mostres independents, dues alíquotes de la mateixa mostra, una polvoritzada (S58) i l'altra tallada en segments petits (S59) i es van comparar els resultats obtinguts. Comparant els resultats qualitius, no es van trobar diferències importants entre ambdues mostres: en la S58 es van informar un total de 15 resultats erronis (15 falsos negatius) i en la S59, un total de 17 resultats erronis (16 falsos negatius i 1 fals positiu).

Respecte als resultats quantitius, es van comparar els resultats individuals informats per cadascuna de les substàncies, utilitzant el test no paramètric de Wilcoxon ($\alpha=5\%$). Per a cadascun dels anàlisis només es van tenir en compte els valors quantitius informats pels laboratoris que havien analitzat ambdues mostres. Per cocaïna, benzoilecgonina, 6-monoacetil morfina i morfina no es van trobar diferències, estadísticament significatives, entre els resultats quantitius informats per les dues mostres. Només per a codeïna es van trobar diferències, probablement degudes a la baixa concentració de codeïna a les mostres (0.4 ± 0.1 ng/mg a S58 i 0.4 ± 0.2 ng/mg a S59) i a que es disposava de pocs valors. Per tant, es pot concloure que la qualitat dels resultats analítics no depèn del tipus de mostra de cabell de la qual es parteix i que, per tant, ambdós tipus poden ser utilitzats com a material d'assaig en exercicis interlaboratori.

Pel que fa referència al material d'assaig, s'ha conclòs que la qualitat dels resultats analítics no depèn del tipus de mostra de cabell de la qual es parteix per realitzar l'anàlisi i que, per tant, el cabell tallat en petits fragments i el cabell polvoritzat poden ser utilitzats indistintament com a material d'assaig en exercicis interlaboratori.

Qualitat dels resultats analítics des d'un punt de vista qualitatiu

Durant tots els exercicis del programa HAIRVEQ es van informar un elevat nombre de resultats falsos negatius i falsos positius. En els primers exercicis, realitzats en els anys 2002 i 2003, un 82% dels laboratoris van informar 74 errors: 40 falsos negatius i 34 falsos positius (veure **Taula 3.2**). En els exercicis posteriors, el nombre d'errors i el percentatge de laboratoris que els van informar va ser inferior. En els últims exercicis realitzats, l'any 2006, 13 laboratoris (41%) van informar 26 errors per les tres mostres avaluades: 19 falsos negatius i 7 falsos positius. Tot i que el nombre i la composició de les mostres que es van analitzar en els diferents exercicis són diferents, al llarg de la participació en el Programa HAIRVEQ es va produir una disminució en el nombre d'errors i també en el percentatge de laboratoris que els van informar. Per tant, la qualitat dels resultats dels laboratoris participants va millorar de forma significativa.

Taula 3.2. Exercicis realitzats en el programa HAIRVEQ. Composició qualitativa i errors qualitatus informats pels laboratoris.

A ^a	E ^b	M ^c	COMPOSICIÓ	FN ^d	FP ^e	N LAB ^f	% LAB ^g
2002	1	S11	6MAM, MOR, COD, MET, COC, BZE	6	4	19	82%
	2	S22	6MAM, MOR, COD, MET, COC, BZE	2	3		
		S23	-	-	13		
	3	S34	6MAM, MOR, COD, MET, COC, BZE	5	1		
		S35	MDMA, MDA, COC, BZE	24	4		
2003	4	S46	6MAM, MOR, COD, MET, COC, BZE	3	1		
		S47	-	-	8		
2004	5	S58	6MAM, MOR, COD, MET, COC, BZE	15	0	11	42%
		S59	6MAM, MOR, COD, MET, COC, BZE	16	1		
2005	6	S610	-	-	9	13	50%
		S611	MDMA, MDA	7	18		
		S612	COC, BZE, THC, THCCOOH	5	8		
2006	7	S13		10	1	13	41%
	8	S15	6MAM, MOR, COD, MET, COC, BZE	4	1		
	9	S19		5	5		

^a Any

^b Exercici

^c Mostres

^d Nombre de falsos negatius

^e Nombre de falsos positius

^f Nombre de laboratoris que van informar resultats falsos negatius o falsos positius

^g Percentatge de laboratoris que van informar resultats falsos negatius o falsos positius

6MAM: 6-monoacetil morfina, MOR: morfina, COD: codeïna, MET: metadona, COC: cocaïna, BZE: benzoilecgonina, MDMA: 3,4-metilendioximetamfetamina, MDA: 3,4-metilendioxiamfetamina, THC: Δ^9 -tetrahidrocannabinol, THCCOOH: Àcid 11-Nor- Δ^9 -tetrahidrocannabinol-9-carboxílic.

La majoria de falsos negatius van ser informats en aquelles mostres en què els anàlits estaven presents en concentracions baixes, tot i que en tots els casos, excepte per a MDA a les mostres S35 i S611, les concentracions estaven per sobre dels límits de quantificació recomanats per la SoHT (SoHT, 2004) i de les concentracions de tall proposades pel SAMHSA (SAMHSA, 2004; Bush, 2008).

Respecte als falsos positius, en tots els exercicis es va observar que la majoria eren informats per a les mostres blanc, que no contenien cap droga d'abús. Comparant les tres mostres blanc analitzades al llarg del programa HAIRVEQ, la S23 analitzada l'any 2002, la S47 analitzada el 2003 i la S610 analitzada el 2005, el nombre de falsos positius i el percentatge de laboratoris que els van informar va disminuir al llarg dels anys: 13 i 8 falsos positius van ser informats en la S23 i en la S47, respectivament, pel 22% dels laboratoris i 9 falsos positius van ser informats per l'11% de laboratoris a la S610.

Taula 3.3. Exercicis del programa HAIRVEQ realitzat juntament amb el programa de la SoHT. Composició qualitativa i errors qualitius informats per ambdós grups de laboratoris.

ANY	E ^a	M ^b	COMPOSICIÓ	FN ^c	FP ^d	N LAB ^e	% LAB ^f
HAIRVEQ laboratoris							
		S610	-	-	9		
2005	6	S611	MDMA, MDA	7	18	13	50%
		S612	COC, BZE, THC, THCCOOH	5	8		
SoHT laboratoris							
		S610	-	-	0		
2005	6	S611	MDMA, MDA	1	4	3	18%
		S612	COC, BZE, THC, THCCOOH	0	0		

^a Exercici

^b Mostres

^c Nombre de falsos negatius

^d Nombre de falsos positius

^e Nombre de laboratoris que van informar resultats falsos negatius o falsos positius

^f Percentatge de laboratoris que van informar resultats falsos negatius o falsos positius

COC: cocaïna, BZE: benzoilecgonina, MDMA: 3,4-metilendioximetamfetamina, MDA: 3,4-metilendioxiamfetamina, THC: Δ^9 -tetrahidrocannabinol, THCCOOH: Àcid 11-Nor- Δ^9 -tetrahidrocannabinol-9-carboxílic.

Comparant els resultats obtinguts pels laboratoris del programa HAIRVEQ i els del programa de la SoHT a l'exercici de l'any 2005 (**Taula 3.3**), els laboratoris del HAIRVEQ van informar molts més resultats erronis, tant falsos positius com falsos negatius i el percentatge de laboratoris que ho van

informar va ser molt més alt: 13 laboratoris del HAIRVEQ (50%) enfront a 3 laboratoris de la SoHT (18%). Comparant les metodologies emprades per ambdós grups de laboratoris, no es van observar diferències importants pel que fa referència a la digestió del cabell, a la purificació dels extractes i a l'anàlisi instrumental. Únicament en aquest últim cas, alguns laboratoris del programa HAIRVEQ van utilitzar metodologies no recomanades per a l'anàlisi de drogues en cabell, metodologies que utilitzaven un sistema de detecció diferent a l'espectrometria de masses, com per exemple, detecció ultravioleta. El fet de no observar grans diferències entre les metodologies utilitzades entre ambdós grups de laboratoris, posa de manifest que els resultats qualitius erronis informats pels laboratoris del programa HAIRVEQ estaven relacionats principalment amb la mala aplicació de la metodologia (manca de validació) i en la interpretació errònia dels resultats.

Pel que fa referència als resultats de tipus qualitatiu, al llarg de la participació en el HAIRVEQ s'ha produït una reducció en el nombre d'errors i en el percentatge de laboratoris que els informen. Els errors informats estan relacionats amb l'aplicació de metodologies que no han estat validades en termes de sensibilitat i especificitat per a l'anàlisi de drogues en cabell, amb la utilització de tècniques d'anàlisi amb sistemes de detecció diferents a l'espectrometria de masses i amb la interpretació errònia dels resultats analítics.

Qualitat dels resultats analítics des d'un punt de vista quantitatiu

Al voltant d'un 60% dels laboratoris van informar resultats quantitius per a la majoria de les substàncies en els diferents exercicis del programa HAIRVEQ realitzats.

La dispersió (mesurada pel CV%) dels resultats quantitius va ser alta al llarg de tots els exercicis del programa HAIRVEQ. En molts casos, es van obtenir CV% superiors al 70%. Donat que entre els resultats informats pels laboratoris participants es van detectar valors aberrants (valors molt allunyats de la majoria de resultats) i aquests resultats provocaven un augment important de la dispersió, en els exercicis realitzats l'any 2006, es va voler minimitzar l'efecte d'aquests valors aberrants utilitzant la mitjana i desviació estàndard robusta per calcular el CV%. L'estadística robusta no elimina els valors aberrants però els dóna menys pes en el càlcul (Analytical Methods Committee, Royal Society of Chemistry, 1989a i 1989b). En aquests exercicis, per la majoria d'anàlisis, es van obtenir CV% més baixos que per la resta d'exercicis del HAIRVEQ i similars als trobats en altres programes de control de qualitat d'anàlisi de drogues en cabell (Sachs, 1997; Jurado i Sachs, 2003).

En l'exercici realitzat l'any 2005, juntament amb la SoHT, gairebé per a tots els anàlisis, la dispersió dels resultats va ser més alta en els resultats informats pels laboratoris del programa HAIRVEQ que en els informats pels laboratoris de la SoHT, tot i que no es van trobar diferències estadísticament significatives entre les medianes d'ambdós grups.

Pel que fa referència a la dificultat d'anàlisi de les diferents drogues i els seus metabòlits, en el programa HAIRVEQ es va observar que, en sis de les nou

mostres de MOR/6MAM enviades i en vuit de les onze mostres de BZE/COC analitzades, la dispersió dels resultats informats pels metabòlits era superior a la dispersió dels resultats informats per les drogues inalterades. Aquest fet, que ja va ser observat per Sachs en un dels exercicis realitzats per la SoHT (Sachs, 1997), sembla indicar que els metabòlits no es poden determinar amb la mateixa precisió que les drogues. Una possible explicació podria ser que els metabòlits es troben en cabell a concentracions més baixes que les drogues i tenen una naturalesa més hidròfila. Això dificulta la seva anàlisi, provocant un augment de dispersió en els resultats informats.

En els programes en cabell realitzats fins el moment, només s'havia avaluat la dispersió conjunta de tots els resultats quantitius informats pels laboratoris participants, mitjançant el càlcul del CV% o del rang de resultats informats (Kintz, 1995; Kintz i Cirimele, 1997; Sachs, 1997; Deveaux et al., 2000; Montagna et al., 2002; Jurado i Sachs, 2003). En el programa HAIRVEQ, a part d'avaluar la dispersió conjunta de tots els resultats, es va realitzar una avaluació individual de cadascun dels resultats quantitius informats pels laboratoris, a través del càlcul del valor de z-score. D'aquesta manera, cada laboratori va poder conèixer la desviació del seu resultat respecte al valor assignat. Per poder calcular aquest valor, és necessari establir un valor assignat per l'anàlit estudiat, així com la variabilitat acceptable per a l'assaig. Aquests valors es poden establir de diferents maneres (ISO, 2005a). Respecte al valor assignat, en el cas del programa HAIRVEQ, es va utilitzar la mitjana dels resultats informats pels laboratoris de referència (valor consens de laboratoris experts) o bé la mitjana robusta dels laboratoris participants, donat que en cabell no és recomanable utilitzar mostres carregades i, per tant, no podem disposar de cap concentració teòrica. Respecte a la variabilitat acceptable per a l'assaig, en el programa HAIRVEQ es va utilitzar la desviació estàndard dels laboratoris de referència, la desviació estàndard robusta dels laboratoris participants o bé la desviació estàndard relativa

calculada a partir del model de precisió de Horwitz, depenent de l'exercici. El fet de no haver usat un valor fix de variabilitat acceptable (per exemple, desviació estàndard relativa de Horwitz) per calcular el valor z-score en els diferents exercicis, no permet utilitzar el percentatge de resultats satisfactoris, basat en z-score, per realitzar un seguiment global de la qualitat dels resultats quantitatius des de l'inici al final del programa HAIRVEQ. El que sí es va poder observar és que la qualitat dels resultats millorava amb el temps de participació en el programa, mitjançant la comparació de resultats de les mostres S46 (exercici 4, 2003) i S11 (exercici 1, 2002) en 6 laboratoris que van participar en els dos exercicis, usant el sistema de puntuació de laboratoris basat en z-score descrit a l'apartat 3.2.4 (veure **Figura 1** de l'article Pichini et al., 2004; pàgina 65).

Pel que fa referència als resultats de tipus quantitatiu, al llarg de la participació en el HAIRVEQ la dispersió de resultats és alta, tot i que en els exercicis realitzats l'any 2006 s'observa una disminució dels CV% respecte als anys anteriors i aquests CV% són similars als trobats en altres programes de control de qualitat d'anàlisi de drogues en cabell.

Pel que fa referència a la dificultat d'anàlisi de les diferents drogues i els seus metabòlits, s'arriba a la conclusió que els metabòlits es poden determinar amb menys precisió que les drogues inalterades.

Accions educatives realitzades per corregir les fonts d'error detectades

En el programa HAIRVEQ es van realitzar diferents accions educatives dirigides a corregir les fonts d'error detectades.

En els exercicis realitzats els anys 2002 i 2003, es va enviar als laboratoris informació sobre les metodologies proposades per a l'anàlisi de drogues d'abús en cabell (Pichini et al., 1999), juntament amb mostres reals de composició coneguda, per tal d'ajudar-los a desenvolupar i implementar la metodologia idònia per a cada grup de compostos. També es van enviar patrons metanòlics de les substàncies problema i dels seus anàlegs deuterats, aquests últims amb la finalitat que els laboratoris els utilitzessin com a estàndard interns en el procediment d'anàlisi de la mostra.

Després d'aquests exercicis, es va observar que molts dels laboratoris del programa HAIRVEQ no eren capaços d'analitzar correctament drogues en cabell. Els resultats obtinguts van suggerir que els errors podien explicar-se per l'aplicació de metodologies que no havien estat validades en termes de sensibilitat i especificitat per a l'anàlisi de drogues en cabell, per la utilització de concentracions de tall no adequades per aquest tipus d'anàlisi o bé per la utilització de tècniques d'anàlisi amb sistemes de detecció diferents a l'espectrometria de masses.

En base a aquests resultats, en els exercicis realitzats el 2004 i 2005, es van tornar a enviar, als laboratoris, solucions metanòliques de les substàncies problema i dels seus anàlegs deuterats, juntament amb els procediments proposats per a l'anàlisi de drogues en cabell, recomanant la seva validació tenint en compte els requeriments de l'anàlisi de drogues en cabell, i aconsellant el seu ús als laboratoris per tal de millorar els resultats de les

anàlisi. Els resultats obtinguts en aquests exercicis, que incloïen la comparació dels procediments i resultats entre els laboratoris del programa HAIRVEQ i els del programa de la SoHT, van reforçar la idea que les metodologies usades en els laboratoris del programa HAIRVEQ no havien estat prèviament validades per comprovar que funcionaven correctament en el propi laboratori i va mostrar que les fonts d'error es trobaven tant en la preparació i anàlisi de la mostra com en l'avaluació dels resultats analítics. Donat que, després d'aquests exercicis, pocs laboratoris del programa HAIRVEQ van demostrar ser capaços de realitzar correctament l'anàlisi de drogues en cabell, tant qualitatiu com quantitatiu, els tres exercicis de l'any 2006 es van programar incloent una sèrie d'accions específiques per tal d'ajudar a millorar la qualitat dels resultats.

En els tres exercicis de l'any 2006, es va enviar la mateixa mostra i es va avaluar la qualitat dels resultats després de portar a terme diferents accions educatives. En el primer exercici es va demanar als laboratoris que analitzessin la mostra aplicant les metodologies que estaven utilitzant rutinàriament; en el segon exercici es va demanar que l'analitzessin utilitzant uns procediments recomanats i, en el tercer, es va demanar que utilitzessin els procediments que empraven en aquell moment per a l'anàlisi de mostres de rutina, que haurien de ser els mètodes suggerits validats seguint les recomanacions enviades. Entre el segon i el tercer exercici, es va realitzar una reunió on es va recalcar als laboratoris la importància de seguir els procediments recomanats i la importància de validar-los abans d'utilitzar-los rutinàriament.

Respecte als resultats qualitius, del primer al segon exercici (després d'enviar procediments recomanats), es va observar una reducció de gairebé el 50% del nombre d'errors i dels laboratoris que els van informar. Però en el tercer exercici el nombre d'errors va tornar a augmentar, sobretot en el cas

dels falsos positius. Cal tenir en compte, però, que dels 5 falsos positius, 3 van ser informats pel mateix laboratori.

Respecte als resultats quantitius, la dispersió va ser alta en els tres exercicis, però del primer al tercer exercici es va observar una petita millora per alguns anàlisis (morfina, metadona, cocaïna i benzoilecgonina) i l'exactitud dels resultats, mesurada per ERR%, va millorar del primer al tercer exercici, però només per 6-monoacetil morfina i per cocaïna. Per tant, després de les accions realitzades l'any 2006, els resultats des d'un punt de vista qualitatiu van millorar per la majoria de laboratoris i, respecte als resultats quantitius, la dispersió va continuar sent alta, tot i que els CV% van millorar respecte als observats en els exercicis anteriors.

En base als resultats obtinguts i després de la reunió realitzada amb els laboratoris entre el segon i el tercer exercici, es va reforçar la idea que les fonts d'error estaven relacionades amb els següents aspectes:

- Processament incorrecte de la mostra, com per exemple, la no utilització d'estàndard intern o bé la no utilització de corbes de calibratge per quantificar les substàncies.
- Utilització de tècniques d'anàlisi no adequades per a l'anàlisi de drogues en cabell, com per exemple, la utilització de cromatografia líquida o cromatografia de gasos no acoblada a espectrometria de masses (per exemple, cromatografia líquida acoblada a detectors ultraviolat).
- Manca d'una validació adequada de les metodologies en termes de sensibilitat i especificitat.
- Avaluació incorrecta dels resultats, com per exemple, la utilització de concentracions de tall diferents a les recomanades per a l'anàlisi de drogues en cabell i la interpretació incorrecta dels resultats obtinguts per espectrometria de masses.

El programa HAIRVEQ ha estat útil, no només per avaluar la qualitat dels resultats informats pels laboratoris, sinó també per identificar les fonts d'error i conèixer les eines que era necessari desenvolupar per ajudar als laboratoris a millorar la qualitat dels seus resultats analítics.

Després de cinc anys de participació en el programa HAIRVEQ, hi ha laboratoris que informen molts errors de tipus qualitatiu i amb una dispersió de resultats elevada. Tot i haver identificat les fonts, hi ha errors que no es corregeixen, probablement degut a la manca de recursos dels laboratoris, com per exemple, per adquirir instrumentació adequada o bé per formar al personal.

CAPÍTOL 4

ANÀLISI DE DROGUES D'ABÚS EN FLUID ORAL

4.1. DESENVOLUPAMENT DE METODOLOGIA ANALÍTICA

4.1.1. Introducció

Una part de la tesi ha consistit en conèixer i assegurar la qualitat dels resultats analítics obtinguts pels laboratoris que analitzen drogues d'abús en fluid oral. Això s'ha fet a través de l'organització d'exercicis interlaboratori i per poder dur-los a terme ha estat necessari realitzar estudis per desenvolupar materials d'assaig adequats.

Les primeres drogues estudiades en fluid oral van ser amfetamina, metamfetamina, 3,4-metilendioximetamfetamina, 3,4-metilendioxiamfetamina, 6-monoacetil morfina, morfina, codeïna, cocaïna i benzoilecgonina.

Per poder realitzar tots els estudis calia disposar de mètodes que permetessin identificar i quantificar aquestes drogues en fluid oral. Respecte a les amfetamines i metilendioxi derivats disposàvem d'un mètode analític (Navarro et al., 2001), però, per a l'anàlisi de la resta de compostos, en aquell moment no es disposava de cap mètode. Per això es va desenvolupar i validar un mètode que permetés la identificació i quantificació de 6-monoacetil morfina, morfina, codeïna, cocaïna i benzoilecgonina en fluid oral.

Per desenvolupar una metodologia per a la detecció de drogues en fluid oral, cal tenir en compte el volum limitat de mostra de la qual es disposa (1-3 mL) i els requeriments de sensibilitat, ja que les concentracions de les drogues en

fluid oral són similars a les que es poden trobar en plasma però almenys un ordre de magnitud més baixes que les que es poden trobar a l'orina.

Les tècniques cromatogràfiques acoblades a espectrometria de masses són les tècniques recomanades per a la quantificació de drogues en matrius biològiques. De fet, en els últims anys havien estat publicats diversos mètodes que utilitzaven tant cromatografia de gasos com cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses (Mortier et al., 2002; Gunnar et al., 2005; Wood et al., 2005; Wylie et al., 2005a).

En aquest capítol es descriu el desenvolupament i la validació d'un mètode analític per identificar i quantificar 6-monoacetil morfina, morfina, codeïna, cocaïna i benzoilecgonina en fluid oral utilitzant cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses. La idoneïtat del mètode analític es va comprovar analitzant mostres reals procedents d'un estudi d'excreció de codeïna realitzat en dos voluntaris i analitzant mostres de pacients consumidors de drogues d'abús. Tots els resultats es presenten en aquest capítol i també estan recollits en un pòster científic que va ser presentat al “XXV Congreso Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular” (Bilbao, 2006). El pòster s'inclou com **Annex 1** d'aquesta tesi.

4.1.2. Material i mètodes

4.1.2.1. Solucions de referència

Les solucions mare de cocaïna, benzoilecgonina, 6-monoacetil morfina, morfina i codeïna van ser preparades amb metanol a una concentració d'1 mg/mL. Les solucions de cocaïna i morfina procedien d'Alcaliber S.A. (Madrid, Espanya), les solucions de benzoilecgonina i 6-monoacetil morfina procedien de Cerilliant (Austin, Texas, USA) i la de codeïna procedia de

Radian (Morton Groves, Illinois, USA). Les solucions de treball de concentració de 10 µg/mL, 1 µg/mL i 0.1 µg/mL van ser preparades a partir de la solució mare per dilució 1:100, 1:1000 i 1:10000, respectivament, utilitzant metanol.

Com a patrons interns es van utilitzar els anàlegs deuterats dels anàlits. En aquest cas, la solució metanòlica d'1 mg/mL de cocaïna-d₃ procedia de Radian (Morton Groves, Illinois, USA), les de benzoilecgonina-d₃, 6-monoacetil morfina-d₃ i morfina-d₃ procedien de Cerilliant (Austin, Texas, USA) i la de codeïna-d₃ procedia de Sigma - Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanya). Com en el cas dels anàlits, la solució de treball d'1 µg/mL va ser preparada per dilució 1:1000 de la solució mare utilitzant metanol.

La concentració de les solucions va ser verificada per espectrofotometria UV. Totes les solucions van ser conservades a -20 °C.

4.1.2.2. Reactius i materials

Es va utilitzar aigua desionitzada obtinguda mitjançant un sistema de purificació Milli-Q (MilliPore Ibèrica, S.A., Madrid, Espanya) així com metanol, 2-isopropanol, amoníac, acetonitril, hidròxid de potassi, dihidrogen fosfat de potassi i àcid acètic glacial subministrats per la casa comercial Merck (Darmstadt, Germany). El metanol era de qualitat HPLC (cromatografia líquida d'alta eficàcia) i la resta de reactius eren de qualitat per a anàlisi. A més, es va utilitzar cloroform de qualitat HPLC de la casa Scharlau Chemie S.A. (Sentmenat, Espanya) i N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida amb 1% de trimetilclorosilà (BSTFA 1% TMCS) proporcionat per Sigma - Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanya).

Els materials i equips auxiliars necessaris van ser: una centrífuga (P-Selecta, model Meditronic BL-S, Abrera, Espanya), una centrífuga refrigerada (P-Selecta, model Macrofriger BL, Abrera, Espanya), un bany sec (P-Selecta, model 0435941, Abrera, Espanya), un extractor sòlid-líquid (Supelco - Sigma-Aldrich Corporation, model Visiprep 24, Steinhelm, Alemanya), un evaporador de corrent de nitrogen Turbo-Vap LV (Zymarck corporation, Hopkinton, Ma, Estats Units), una estufa de buit amb P₂O₅ / KOH (Gallenkamp, model OVA 031) i, per a fer l'extracció sòlid-líquid, es van utilitzar columnes Bond Elut Certify® (Varian Sample Preparation Products, Harbor City, CA, USA).

El tampó fosfat de potassi 0.1 M pH 6.0 es va preparar dissolent 13.6 g de dihidrogen fosfat de potassi en 1000 mL d'aigua Milli-Q i el pH es va ajustar mitjançant una solució d'hidròxid de potassi 1 M. El tampó acetat sòdic 0.1 M pH 4.0 es va preparar barrejant 5.7 mL d'àcid acètic glacial amb 1000 mL d'aigua Milli-Q i el pH es va ajustar mitjançant una solució d'hidròxid de potassi 1M. Finalment, la solució d'elució utilitzada en l'extracció sòlid-líquid era una barreja de cloroform/isopropanol (80:20,v:v) que contenia amoníac al 2%.

4.1.2.3. Preparació de les mostres

A 1 mL de fluid oral, es van afegir 40 µL d'una solució metanòlica dels patrons interns (cocaïna-d₃, benzoilecgonina-d₃, 6-monoacetil morfina-d₃, morfina-d₃ i codeïna-d₃) de concentració d'1 µg/mL. A continuació, les mostres van ser portades a pH 6 afegint 1 mL de tampó fosfat 0.1 M a pH 6, homogeneïtzades en un agitador vòrtex, centrifugades durant 5 minuts a 3500 rpm i sotmeses a una extracció sòlid-líquid, utilitzant columnes Bond Elut Certify®. Primer es van activar i condicionar les columnes amb 2 mL de metanol, 2 mL d'aigua Milli-Q i 2 mL de tampó fosfat 0.1 M a pH 6. A

continuació es va aplicar la mostra, es van rentar les columnes amb 2 mL d'aigua Milli-Q, 1 mL de tampó acetat sòdic 0.1 M a pH 4 i 2 mL de metanol i es van deixar assecar durant més de 2 minuts. Seguidament, els anàlits van ser eluïts utilitzant 2 mL d'una barreja de cloroform/isopropanol (80:20,v:v) que contenia amoníac al 2%. Els extractes resultants es van evaporar a sequedat sota corrent de nitrogen en un bany d'aigua a 40°C i després es van col·locar en una estufa de buit amb P₂O₅ un mínim de 60 minuts. Els tubs secs es van reconstituir amb 20 µL d'acetonitril i 20 µL de BSTFA 1% TMCS i es van incubar en un bany sec a una temperatura de 60°C durant 30 minuts. Després de la incubació, els extractes derivatitzats van ser transferits a vials d'injecció i 2 µL van ser injectats al sistema cromatogràfic.

4.1.2.4. Anàlisi instrumental

Les anàlisis cromatogràfiques es van realitzar en un cromatògraf de gasos (HP 5890A), amb un injector automàtic (HP 7673A) i acoblat a un detector d'espectrometria de masses (HP 5970) (Hewlett Packard, Palo alto, CA, USA). Es va utilitzar una columna capil·lar de sílice fosa amb una fase estacionària de 5 % fenilmetilsilicona (12 m x 0.2 mm de diàmetre intern, 0.33 µm de gruix de pel·lícula) (Agilent Technologies, Califòrnia, USA). El gas portador va ser heli a un flux d'1 mL/min (mesurat a temperatura del forn de 180°C). El programa de temperatures del forn va ser: temperatura inicial 100°C i, després, va anar augmentant 20°C/minut fins assolir una temperatura de 290°C, que es va mantenir durant 5 minuts. El temps total de l'anàlisi per a cada mostra va ser de 14 minuts. Els extractes van ser injectats en mode splitless. Les temperatures del bloc d'injecció i de la interfase es van mantenir a 280°C. Es va treballar en ionització per impacte electrònic (70eV) i amb adquisició en mode SIM (Monitorització selectiva d'ions) monitoritzant tres ions característics per cadascun dels anàlits en el temps de

retenció corresponent. Aquests tres ions es van utilitzar per identificar els anàlits a les mostres (verificant la seva presència al temps de retenció esperat i calculant la relació entre els diferents ions) i un d'ells per a la quantificació. Els ions utilitzats per a cadascun dels compostos s'indiquen a **Taula 4.1**.

Taula 4.1. Anàlits, derivats analitzats, temps de retenció absolut i relatiu i m/z dels ions utilitzats per identificar i quantificar cadascun dels anàlits a les mostres.

Anàlit	Derivat analitzat	t _R ^a	t _{RR} ^b	m/z diagnòstic ^c
Cocaïna	Cocaïna	7.2	0.84	82, 182, <u>303</u>
Benzoilecgonina	Benzoilecgonina-O-TMS	7.5	0.87	105, <u>240</u> , 361
Morfina	Morfina-bis-O-TMS	8.5	0.99	401, 414, <u>429</u>
Codeïna	Codeïna-O-TMS	8.3	0.97	178, 313, <u>371</u>
6MAM	6MAM-O-TMS	8.8	1.02	287, 340, <u>399</u>
Cocaïna-d ₃	Cocaïna-d ₃	7.2	0.84	185, <u>306</u>
Benzoilecgonina-d ₃	Benzoilecgonina-d ₃ -O-TMS	7.5	0.87	<u>243</u>
Morfina-d ₃	Morfina-d ₃ -bis-O-TMS	8.6	1.00	<u>432</u>
Codeïna-d ₃	Codeïna-d ₃ -O-TMS	8.3	0.97	<u>374</u>
6MAM-d ₃	6MAM-d ₃ -O-TMS	8.8	1.02	<u>402</u>

^a Temps de retenció absolut

^b Temps de retenció relatiu

^c Ions utilitzats per identificar els anàlits; els ions utilitzats per quantificar els anàlits s'indiquen en cursiva i subratllats.

6MAM: 6-monoacetil morfina

4.1.2.5. Protocol de validació

El mètode analític desenvolupat va ser validat. Es van avaluar els següents paràmetres: selectivitat/especificitat, contaminació entre mostres, homo/heteroscedasticitat, linealitat, límit de detecció i quantificació, rendiment d'extracció, precisió i exactitud intra-assaig, precisió i exactitud inter-assaig i idoneïtat de l'anàlisi d'una mostra diluïda.

La selectivitat/especificitat mesura la capacitat del mètode per determinar inequívocament un anàlit en una mescla complexa sense ser interferit per altres components que en formen part, com per exemple impureses dels reactius o altres compostos de la pròpia matriu. Per avaluar la selectivitat/especificitat del mètode es van analitzar cinc mostres de fluid oral blanc, procedents de cinc voluntaris sans que no havien estat sotmesos a cap tractament farmacològic i es va verificar l'absència de pics interferents en el temps de retenció dels anàlits i dels patrons interns.

La contaminació entre mostres es mesura per avaluar la capacitat del mètode per donar resultats d'una mostra independentment de la mostra analitzada anteriorment. Per avaluar la contaminació entre mostres es va analitzar una mostra de fluid oral blanc (sense patrons interns), just després d'una de les mostres de calibratge de concentració més alta i es va verificar l'absència de pics interferents en el temps de retenció dels anàlits i dels patrons interns.

L'homocedasticitat del procediment indica la independència de la variància de la resposta (relació àrea anàlit i àrea patró intern als m/z corresponents) respecte a la concentració d'anàlit. Quan la variància de la resposta depèn de la concentració, el procediment és heterocedàstic. En aquest cas, la recta de calibratge es calcula mitjançant el mètode de mínims quadrats ponderats per la inversa de la concentració. L'homo/heteroscedasticitat del procediment es va avaluar analitzant les mostres de calibratge per quadruplicat. Per a cadascun dels anàlits, es van calcular les relacions entre les àrees de l'anàlit i del patró intern corresponent. Es va aplicar el test de Dixon per a un nivell de significació del 5% als replicats de cada concentració, per detectar els valors aberrants i es va avaluar el comportament de la variància de la resposta al llarg de la recta de calibratge utilitzant el test de Levene per a un nivell de significació del 5%.

Linealitat és la demostració que la relació entre la concentració d'anàlit (**x**) i la resposta del mètode (**y**) s'ajusta a una equació del tipus $y = a + bx$, on **a** i **b** són els paràmetres propis de l'equació obtinguda. Per avaluar la linealitat, es va utilitzar una recta de calibratge amb sis punts de concentració (4, 10, 20, 40, 100 i 400 ng/mL) per a cadascun dels anàlits. Donat que el volum de dissolvent orgànic afegit al fluid oral no podia superar el 5% del volum total de mostra, per preparar les mostres de calibratge es va afegir el volum adient de la solució metanòlica de treball en un tub, es va portar a sequedat sota una corrent de N₂ i, posteriorment, es va redissoldre amb 1 mL de fluid oral blanc.

En el primer assaig de validació, les mostres de calibratge van ser preparades i analitzades per quadruplicat, per avaluar l'homo/heterocedasticitat del procediment. Per a la resta d'assajos es van preparar per duplicat. Per comprovar l'ajust dels valors a un model lineal, es va emprar una regressió de mínims quadrats ponderats per la inversa de la concentració, ja que per tots els anàlits els procediments van ser heterocedàstics.

Els límits de detecció i de quantificació es defineixen com la concentració mínima d'un anàlit que pot ser detectada i quantificada, respectivament, de manera reproducible. Els límits de detecció i de quantificació es van definir com 3.3 i 10 vegades el valor del soroll, respectivament. Com a estimació d'aquest es va agafar la desviació estàndard dels valors resposta (relació àrea anàlit i àrea patró intern als m/z corresponents) pel nivell de concentració inferior.

El rendiment d'extracció es calcula per comparació entre la resposta obtinguda quan una quantitat d'anàlit es determina prescindint de l'etapa d'extracció del procediment analític i quan s'analitza seguint el procediment analític complet. El rendiment d'extracció es va calcular a 40 ng/mL (n=4).

Per calcular-lo, es van analitzar mostres de fluid oral blanc carregades a aquestes concentracions. La senyal corresponent al 100% d'extracció es va obtenir per l'anàlisi d'extractes de fluid oral blanc que es van carregar amb les solucions de referència, un cop realitzada l'extracció. El rendiment d'extracció es va calcular per comparació de la resposta obtinguda en les mostres extretes amb la mitjana de les respostes obtingudes en les mostres corresponents al 100 % d'extracció.

La precisió intra-assaig, també anomenada repetibilitat, és el grau de concordança entre una sèrie de resultats independents obtinguts en analitzar mostres idèntiques, amb el mateix mètode analític, en el mateix laboratori, pel mateix operador i utilitzant els mateixos equips en un mateix assaig. L'exactitud intra-assaig és el grau de concordança entre el valor mesurat, expressat com la mitjana d'una sèrie de mesures realitzades en el mateix lot experimental, i el valor de referència acceptat, en el nostre cas, el valor de concentració nominal. La precisió i l'exactitud intra-assaig es van calcular a partir de l'anàlisi de tres replicats de mostres control de dues concentracions diferents (16 i 200 ng/mL). La precisió intra-assaig es va determinar calculant, per a cada nivell de concentració, la dispersió dels resultats obtinguts expressada com la desviació estàndard relativa (RSD%), mentre que l'exactitud intra-assaig es va determinar calculant l'error relatiu (ERR%) per a cada nivell de concentració.

Les mostres control es van preparar enriquint fluid oral blanc amb el volum adient de solucions de referència dels anàlits. El volum de dissolvent orgànic afegit al fluid oral no va superar el 5% del volum total de mostra.

La precisió inter-assaig és el grau de concordança entre una sèrie de resultats independents obtinguts en analitzar mostres idèntiques en diversos lots experimentals. L'exactitud inter-assaig és el grau de concordança entre el

valor mesurat, expressat com la mitjana d'una sèrie de mesures realitzades durant diversos lots experimentals, i el valor de referència acceptat, en el nostre cas, el valor de concentració nominal. La precisió i l'exactitud inter-assaig es van calcular a partir dels resultats obtinguts per les mostres control analitzades en diferents dies. La precisió es va expressar com la desviació estàndard relativa (RSD%) i l'exactitud es va expressar com l'error relatiu (ERR%) de les concentracions.

La idoneïtat de l'anàlisi d'una mostra diluïda mesura la capacitat per donar resultats fiables per a mostres de concentracions més altes que el límit superior de la recta de calibratge, després d'haver-les diluït amb fluid oral blanc i de corregir els resultats obtinguts pel factor de dilució. Per tal d'avaluar aquest paràmetre, es van analitzar, a més de les mostres control ja descrites, mostres del control superior (200 ng/mL) diluïdes a la meitat amb fluid oral blanc. Es va aplicar un test F de comparació de variàncies i un test t d'Student entre els valors de concentració obtinguts per les mostres control superior i els valors de concentració obtinguts per les mostres control diluïdes, després de multiplicar-los per dos.

4.1.2.6. Mostres biològiques utilitzades

El fluid oral blanc utilitzat per a la preparació de les mostres de calibratge i de les mostres control, procedia de voluntaris sans que no estaven sotmesos a cap tractament farmacològic i es va recollir a la Unitat de Farmacologia de l'IMIM. Es va recollir fluid oral de diversos voluntaris, es va barrejar, es va centrifugar i es va analitzar per verificar l'absència de substàncies interferents.

Per tal de comprovar la idoneïtat del mètode desenvolupat per a l'anàlisi de mostres reals, es van analitzar mostres de fluid oral procedents d'estudis d'excreció de codeïna en voluntaris sans i també mostres de fluid oral

procedents de consumidors de drogues, pacients de la Unitat de Toxicomanies de l'Hospital del Mar de Barcelona. A l'estudi d'excreció de codeïna hi van participar 2 voluntaris sans als quals se'ls va administrar una dosi única de 28.7 mg de codeïna, en forma de comprimit, per via oral. L'especialitat farmacèutica va ser Codeisan, del Laboratori Belmac (Madrid, Espanya). El voluntari 1 era un home de 50 anys d'edat i el voluntari 2 era una dona de 34 anys d'edat. L'estudi es va dur a terme a la Unitat de Farmacologia de l'IMIM. Es van recollir mostres de fluid oral abans de l'administració i a les 1, 2, 3, 4, 6, 8 i 24 hores després de l'administració.

A la **Taula 4.2** s'indiquen les mostres recollides procedents de consumidors de drogues, juntament amb el sexe del voluntari i la informació proporcionada pel pacient respecte a la droga consumida, la dosi i el temps aproximat des de l'última administració.

Taula 4.2. Mostres procedents de pacients de la Unitat de Toxicomanies de l'Hospital del Mar.

Pacient	Sexe	Droga consumida	Dosi declarada (mg)	Temps des de l'últim consum
1	Dona	Heroïna	250	23 h
2	Home	Cocaïna	1000	4 dies
3	Home	Cocaïna	2000	24 h
4	Home	Heroïna	500	12 h
5	Home	Cocaïna	500	12 h
		Heroïna	250	48 h
6	Dona	Cocaïna	500	15 h
7	Dona	Heroïna	250	25 h
8	Dona	Cocaïna	500	13 h
		Heroïna	100	5 h
9	Home	Cocaïna	2000	2 dies

4.1.3. Resultats i discussió

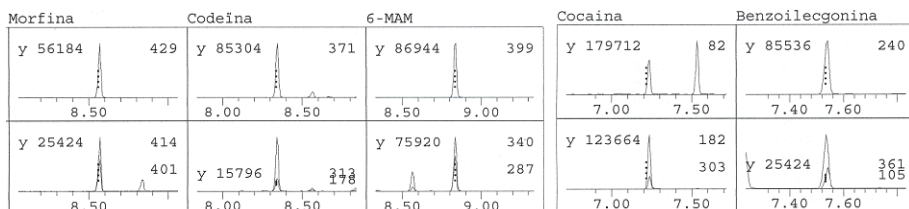
4.1.3.1. Procediment analític

El mètode analític desenvolupat consta d'una primera part de preparació de les mostres, partint de 1 mL de fluid oral. Donat que després d'una administració de cocaïna, heroïna, morfina i codeïna, en aquesta matriu es troben els compostos en forma lliure, no és necessari realitzar cap tipus d'hidròlisi a les mostres. A continuació, aquestes mostres es porten a pH 6 abans de l'extracció en fase sòlida. En aquestes condicions de pH, els anàlits estudiats, que tenen un pKa entre 8-9, es troben en forma ionitzada, que és l'adient per a la realització de l'extracció. Seguidament, es realitza l'extracció en fase sòlida i els anàlits són eluïts utilitzant una barreja de cloroform/isopropanol (80:20, v:v) que conté amoníac al 2%. La darrera part consisteix en la derivatització dels extractes secs utilitzant el reactiu BSTFA 1% TMCS que reacciona amb els grups hidroxil i carboxil donant lloc a la formació dels derivats trimetilsilil (TMS). En aquest cas, es formen els derivats TMS de tots els anàlits estudiats excepte de cocaïna. A la **Taula 4.1** s'indica el derivat analitzat, els temps de retenció absolut i relatiu, els ions m/z utilitzats per a la identificació i l'ió m/z utilitzat per a la quantificació de cocaïna, benzoilecgonina, morfina, codeïna i 6-monoacetil morfina.

A la **Figura 4.1** es presenten els cromatogrames obtinguts per a cadascun dels anàlits i dels patrons interns en una de les mostres control. A la **Figura 4.2** s'inclouen els espectres de masses de cocaïna i dels derivats TMS de la resta de compostos estudiats.

Figura 4.1. Cromatogrames obtinguts per cadascun dels anàlits (a) i dels patrons interns (b) en una mostra control.

a)



b)

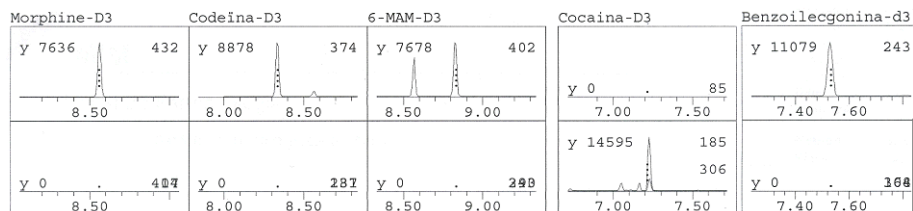
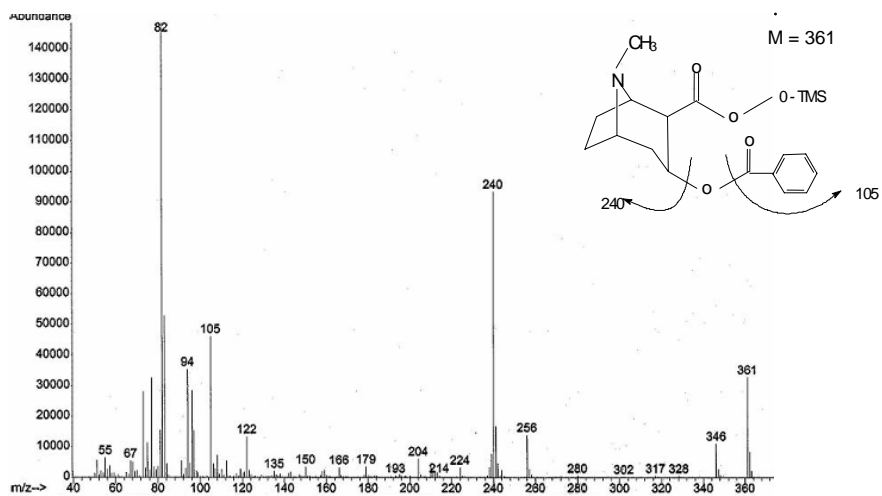
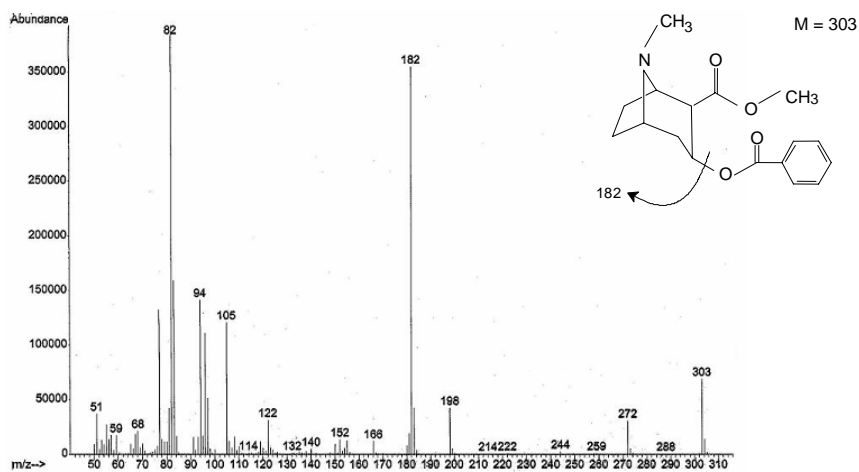
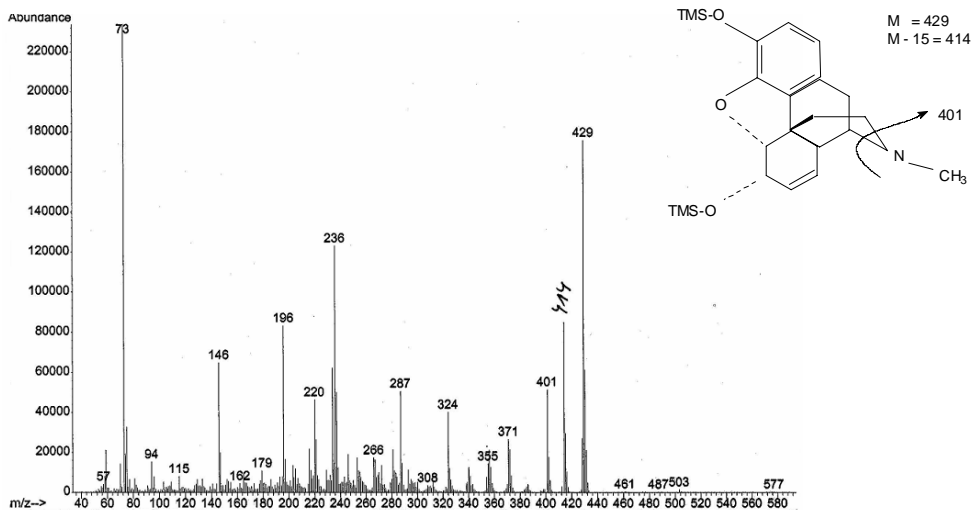


Figura 4.2.

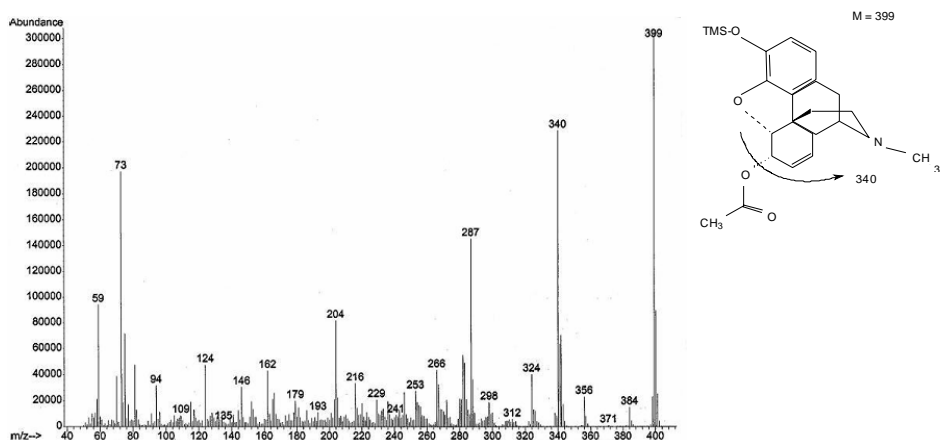
a) Espectre de masses de Cocaina (dalt) i Benzoilegonina-O-TMS (baix).



b) Espectre de masses de Morfina-bis-O-TMS (dalt) i de Codeïna-O-TMS (baix).



c) Espectre de masses de 6-Monoacetil morfina-O-TMS



L'absència de pics interferents en el temps de retenció dels anàlits i dels patrons interns a les cinc mostres de fluid oral blanc analitzades i també en la mostra blanc analitzada just després de la mostra de concentració més alta, va permetre demostrar que el mètode era prou selectiu i també l'absència de contaminació entre mostres.

El procediment va resultar ser heterocedàstic per a tots els anàlits, és a dir, que la variància de la resposta (relació entre l'àrea de l'anàlit i àrea del patró intern als m/z corresponents) depenia de la concentració dels anàlits. Per aquesta raó, la recta de calibratge es va calcular mitjançant el mètode de mínims quadrats ponderats per la inversa de la concentració. Per a tots els anàlits, les corbes de calibratge van mostrar una linealitat satisfactòria amb coeficients de correlació superiors al 0.99 en tots els casos.

Els valors estimats dels límits de detecció i quantificació s'inclouen a la **Taula 4.3**. Per a cocaïna, codeïna i 6-monoacetil morfina els límits de detecció van ser inferiors a 1 ng/mL, i per a benzoilecgonina i morfina van ser inferiors a 2 ng/mL. Respecte als límits de quantificació, van ser inferiors a 4 ng/mL per a tots els anàlits, excepte per a benzoilecgonina (4.3 ng/mL) i per a morfina (4.8 ng/mL). Per a benzoilecgonina i morfina, tot i que els límits de quantificació van ser superiors a 4 ng/mL, en ambdós casos van ser inferiors a les concentracions de tall proposades pel SAMHSA per a l'anàlisi de drogues en fluid oral (SAMHSA, 2004; Bush, 2008).

Taula 4.3. Límits de detecció i quantificació estimats, rendiments d'extracció calculats a 40 ng/mL (n=4) i concentracions de tall recomanades pel SAMHSA per a cada anàlit.

Anàlit	LDest (ng/mL)	LQest (ng/mL)	Conc. de tall (SAMHSA) (ng/mL)	Rendiment d'extracció (%) mitjana ± sd
Cocaïna	0.5	1.6	8	80.3 ± 2.5
Benzoilecgonina	1.4	4.3	8	56.3 ± 8.8
Morfina	1.6	4.8	40	85.1 ± 1.6
Codeïna	0.2	0.6	40	89.5 ± 2.2
6-Monoacetil morfina	0.3	1.0	4	87.5 ± 0.8

Els rendiments d'extracció van ser superiors al 80% per a tots els anàlits, excepte per benzoilecgonina, que va ser del 56% (**Taula 4.3**). Aquest baix rendiment per benzoilecgonina es va acceptar donat que ens permetia quantificar correctament la concentració de tall proposada pel SAMHSA (SAMHSA, 2004; Bush, 2008) i perquè el rendiment d'extracció per a la resta d'anàlits estudiats era correcte.

Els resultats obtinguts per a la precisió i exactitud intra i inter-assaig es presenten a les **Taules 4.4 i 4.5**, respectivament. Respecte a la precisió intra i inter-assaig, els resultats obtinguts van estar d'acord amb els límits acceptats internacionalment per a aquest paràmetre (Guidance for industry, 2001). En tots els casos, els valors de RSD% van ser inferiors al 15%, per tant, es va considerar que el mètode era precís per a totes les substàncies estudiades. Respecte a l'exactitud intra i inter-assaig, l'error relatiu va ser inferior al 15%, excepte en pocs casos, però no va superar mai el 19%.

Finalment, els resultats obtinguts per a la idoneïtat de l'anàlisi d'una mostra diluïda van ser adequats per a tots els anàlisis. No es van trobar diferències estadísticament significatives entre la variància ni entre les mitjanes dels valors de concentració obtinguts per a les mostres de control normals i els valors de concentració obtinguts per a les mostres de control diluïdes i multiplicats per dos.

Taula 4.4. Precisió i exactitud intra-assaig.

Anàlit	Conc. teòrica (ng/mL)	n	Concentració mitjana ± sd (ng/mL)	Intra-assaig	
				RSD%	ERR%
Cocaïna	16	3	17.0 ± 0.6	3.6	4.0
		3	16.8 ± 0.6	3.5	2.5
		3	17.0 ± 0.4	2.5	3.4
	200	3	219.3 ± 17.3	7.9	7.1
		3	191.4 ± 4.2	2.2	6.6
		3	187.8 ± 6.8	3.8	8.3
Benzoilecgonina	16	3	17.0 ± 1.0	5.8	14.3
		3	16.9 ± 0.7	3.9	13.9
		2	17.0 ± 0.4	2.3	9.6
	200	3	217.7 ± 4.0	1.8	17.0
		3	210.0 ± 4.7	2.2	12.9
		3	207.0 ± 8.7	4.2	11.2
Morfina	16	3	15.8 ± 0.1	0.8	3.3
		3	18.2 ± 0.3	1.6	18.8
		3	18.2 ± 0.4	2.0	19.0
	200	3	222.7 ± 3.4	1.5	16.4
		3	216.6 ± 6.4	2.9	13.2
		3	193.1 ± 3.7	1.9	1.8
Codeïna	16	3	15.6 ± 0.3	2.1	2.0
		3	15.7 ± 0.3	2.0	2.8
		3	15.7 ± 0.7	4.7	4.6
	200	3	192.1 ± 15.9	8.3	5.8
		3	177.7 ± 3.0	1.7	7.0
		3	166.3 ± 5.3	3.2	13.0
6-Monoacetil morfina	16	3	14.4 ± 0.3	1.8	12.2
		3	14.0 ± 0.6	4.5	14.8
		3	14.2 ± 0.7	4.6	13.4
	200	3	178.3 ± 19.2	10.8	13.0
		3	172.6 ± 7.3	4.2	15.8
		3	181.8 ± 8.5	4.7	11.3

Taula 4.5. Precisió i exactitud inter-assaig.

Anàlit	Conc. teòrica (ng/mL)	n	Concentració mitjana \pm sd (ng/mL)	Inter-assaig	
				RSD%	ERR%
Cocaïna	16	9	17.0 \pm 0.5	2.9	3.4
	200	9	199.5 \pm 17.7	8.9	7.4
Benzoilecgonina	16	8	17.0 \pm 0.7	3.8	12.6
	200	9	211.6 \pm 7.2	3.4	13.7
Morfina	16	9	17.4 \pm 1.2	7.0	13.7
	200	9	210.8 \pm 14.2	6.7	10.4
Codeïna	16	9	15.7 \pm 0.4	2.8	3.1
	200	9	178.7 \pm 14.1	7.9	8.6
6-Monoacetil morfina	16	9	14.2 \pm 0.5	3.6	13.5
	200	9	177.5 \pm 11.8	6.6	13.4

4.1.3.2. Anàlisi de mostres biològiques reals

Es va utilitzar el mètode descrit per a l'anàlisi quantitativa de cocaïna, benzoilecgonina, 6-monoacetil morfina, morfina i codeïna en mostres de fluid oral procedents d'estudis d'excreció de codeïna en voluntaris sans i en mostres de fluid oral procedents de consumidors de drogues, pacients de la Unitat de Toxicomanies de l'Hospital del Mar de Barcelona.

Els resultats obtinguts en l'anàlisi de les mostres procedents d'estudis d'excreció de codeïna es presenten a la **Taula 4.6**. Es va detectar codeïna en totes les mostres i en cap d'elles es va detectar morfina. Aquest fet també havia estat observat en altres estudis publicats (Kintz et al., 1998; Kim et al., 2002; Barnes et al., 2003 i Kacinko et al., 2004), usant dosis i vies d'administració de codeïna diferents. Les concentracions de codeïna obtingudes en els dos voluntaris van ser molt diferents entre sí, però en

ambdós casos la concentració de codeïna va ser màxima una hora després de l'administració. Kintz i col·laboradors van trobar les concentracions màximes de codeïna entre 1 i 3 hores després de l'administració (Kintz et al., 1998) i Kim i col·laboradors entre 0.5 i 4 hores després de l'administració (Kim et al., 2002).

Taula 4.6. Concentracions de codeïna i morfina a les mostres procedents del voluntari 1 (Vol 1) i del voluntari 2 (Vol 2) després de l'administració de codeïna (28.7 mg de codeïna).

Mostra	Temps (h)	Codeïna (ng/mL)	Morfina (ng/mL)
Vol 1, mostra 1	0	-	-
Vol 1, mostra 2	1	838.4	-
Vol 1, mostra 3	2	132.5	-
Vol 1, mostra 4	3	189.5	-
Vol 1, mostra 5	4	26.7	-
Vol 1, mostra 6	6	20.4	-
Vol 1, mostra 7	8	31.3	-
Vol 1, mostra 8	24	< LQ ^a	-
Vol 2, mostra 1	0	-	-
Vol 2, mostra 2	1	205.6	-
Vol 2, mostra 3	2	84.3	-
Vol 2, mostra 4	3	90.8	-
Vol 2, mostra 5	4	56.8	-
Vol 2, mostra 6	6	18.5	-
Vol 2, mostra 7	8	13.2	-
Vol 2, mostra 8	24	< LQ ^a	-

^a Concentracions inferiors al límit de quantificació (LQ)

En el nostre estudi, a partir d'una hora, les concentracions de codeïna van anar disminuint fins a les 8 hores després de l'administració. A la darrera mostra recollida a les 24 hores, els senyals de codeïna observats van ser

inferiors al límit de quantificació en els dos voluntaris. Els resultats obtinguts indiquen que la codeïna pot ser detectada fins més de 8 hores després de l'administració, però el disseny de l'estudi no permet avaluar el temps de detecció. Caldria realitzar estudis addicionals amb recollida de mostres entre 8 i 24 hores per avaluar el temps de detecció després de l'administració.

Els resultats obtinguts per a les mostres de pacients consumidors de drogues de la Unitat de Toxicomanies de l'Hospital del Mar de Barcelona es presenten a la **Taules 4.7 i 4.8**. Les mostres van ser analitzades per a aquelles substàncies que podien estar presents en el fluid oral, tenint en compte la informació proporcionada per cada pacient.

Taula 4.7. Concentracions de cocaïna i benzoilecgonina en mostres de pacients de la Unitat de Toxicomanies de l'Hospital del Mar.

Pacient	Dosi declarada (mg)	Temps ^a	Cocaïna (ng/mL)	Benzoilecgonina (ng/mL)
2	1000	4 dies	108.1	23.2
3	2000	24 h	360.4	1248.4 ^b
4	consum no declarat	-	52.5	21.1
5	500	12 h	26.3	20.8
6	500	15 h	198.6	57.1
8	500	13 h	28.6	360.4
9	2000	2 dies	125.9	1154.2 ^b

^a Temps transcorregut des de l'últim consum

^b Valors aproximats, donat que no es va poder repetir l'anàlisi de la mostra diluïda per falta de volum de mostra

Taula 4.8. Concentracions de 6-monoacetil morfina (6MAM), morfina i codeïna en mostres de pacients de la Unitat de Toxicomanies de l'Hospital del Mar.

Pacient	Dosi declarada (mg)	Temps ^a	6MAM (ng/mL)	Morfina (ng/mL)	Codeïna (ng/mL)
1	250	23 h	5.8	131.2	10.3
4	500	12 h	107.9	96.7	7.0
5	250	48 h	< LQ ^b	< LQ ^b	< LQ ^b
7	250	25 h	6.7	12.2	< LQ ^b
8	100	5 h	31.6	204.8	34.7

^a Temps transcorregut des de l'últim consum

^b Concentracions inferiors al límit de quantificació (LQ)

En les mostres recollides en pacients que havien indicat consum de cocaïna (**Taula 4.7**), en tots els casos es va poder quantificar cocaïna i el seu metabòlit, benzoilecgonina. Tenint en compte la informació proporcionada pel consumidor i els resultats obtinguts, cocaïna i el seu metabòlit poden ser detectats en fluid oral 4 dies després de l'administració.

De les cinc mostres que provenien de pacients que havien consumit heroïna (**Taula 4.8**), en totes es van poder quantificar 6-monoacetil morfina, morfina i codeïna, excepte a la mostra 5, on es van detectar les tres substàncies però no es van poder quantificar, probablement degut al temps transcorregut des de l'administració, i a la mostra 7, on es va detectar codeïna però no es va poder quantificar. A la mostra 4 es van trobar concentracions de cocaïna i benzoilecgonina, encara que el pacient només havia declarat el consum d'heroïna.

Els anàlits trobats en el nostre estudi en les mostres de consumidors d'opiacis i els trobats en les mostres de consumidors de cocaïna, són els

mateixos trobats en els estudis publicats per Samyn i Van Haeren (Samyn i Van Haeren, 2000) i per Niedbala i col·laboradors (Niedbala et al., 2001a).

Els resultats obtinguts en l'anàlisi de les mostres procedents dels estudis d'excreció i de consumidors habituals de drogues, demostren que el mètode descrit permet detectar i quantificar en fluid oral les diferents drogues d'abús estudiades, així com els seus metabòlits.

S'ha desenvolupat i validat un mètode analític que permet identificar i quantificar 6-monoacetil morfina, morfina, codeïna, cocaïna i benzoïlecgonina en fluid oral. La idoneïtat del mètode per identificar i quantificar aquestes drogues en mostres reals, s'ha comprovat analitzant mostres de fluid oral procedents d'un estudi d'excreció de codeïna, realitzat en voluntaris sans, i analitzant mostres de fluid oral procedents de consumidors de drogues d'abús.

4.2. ESTUDIS D'ESTABILITAT i EXERCICIS INTERLABORATORI

4.2.1. Introducció

Els exercicis interlaboratori són una eina important per avaluar la qualitat de les anàlisis realitzades. Pel que fa al fluid oral, existeixen pocs treballs publicats i la informació sobre la qualitat de les anàlisis de drogues en aquesta matriu és, per tant, limitada. Clarke i Wilson (Clarke i Wilson, 2005) descriuen exercicis interlaboratori realitzats, entre els anys 2002 i 2004, amb mostres recollides i preparades amb un sol dispositiu comercial (Intercept). Dins el projecte europeu DRUID (Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines), s'ha realitzat un exercici interlaboratori per validar metodologies analítiques per a l'anàlisi de vint-i-dues substàncies, entre les quals hi ha les principals drogues d'abús, en fluid oral (Pil et al., 2010).

L'estabilitat de les drogues en les matrius biològiques pot afectar els resultats de les anàlisis. En el cas del fluid oral, és important conèixer l'estabilitat de les drogues en els tampons usats en els diferents dispositius de recollida comercials i comprovar si eviten la degradació i permeten una millor recuperació de les drogues (Drummer, 2008). Conèixer l'estabilitat de les drogues en fluid oral també és important per planificar el transport i les condicions de conservació dels materials d'assaig en exercicis interlaboratori.

S'han publicat diversos treballs sobre l'estabilitat de drogues d'abús en fluid oral (Cone i Menchen, 1988; Crouch, 2005; Moore et al., 2006; Drummer, 2006; Dickson et al., 2007; Moore et al., 2007; Crouch et al., 2008; Langel et al., 2008). En tots ells s'ha estudiat l'estabilitat de les principals drogues d'abús (amfetamines, cannabinoids, cocaïna, opiacis i cocaïna) en dispositius de recollida comercials (Cozart ® DDS, Salivette®, Intercept®, Finger

Collector[®], ORALscreen[™], Quantisal[™], entre d'altres). Només en un dels treballs es presenten resultats de l'estabilitat de cocaïna en fluid oral recollit sense utilitzar dispositius comercials (Cone i Menchen, 1988). Cone i Menchen troben que la cocaïna és estable en mostres de fluid oral recollides de forma no estimulada, guardades a 4°C i 22°C fins a 7 dies quan el fluid oral és acidificat. Per tant, la informació disponible sobre l'estabilitat de drogues en fluid oral és molt limitada i cal realitzar estudis que permetin determinar les condicions òptimes de preparació, transport i conservació del fluid oral.

En aquest treball es va avaluar, en primer lloc, l'estabilitat de drogues en fluid oral per tal de preparar materials d'assaig per a exercicis interlaboratori. En segon lloc, es van organitzar dos exercicis interlaboratori per avaluar la qualitat de les anàlisis de drogues d'abús en fluid oral, en el segon dels quals es va avaluar l'estabilitat de les drogues en dos dels dispositius comercials més usats per a la recollida de fluid oral. En aquest capítol es descriuen els resultats de tots aquest estudis.

4.2.2. Material i mètodes

4.2.2.1. Estudis d'estabilitat de drogues en fluid oral

Es van realitzar estudis d'estabilitat d'amfetamina, metamfetamina, 3,4-metilendioximetamfetamina (MDMA) i 3,4-metilendioxiamfetamina (MDA), cocaïna, benzoilecgonina, 6-monoacetil morfina, morfina i codeïna en fluid oral estabilitzat i no estabilitzat, a diferents condicions de temperatura i temps de conservació.

4.2.2.1.1. Mostres

Es va estudiar l'estabilitat dels anàlits en fluid oral estabilitzat amb azida sòdica i tampó citrat, i en fluid oral sense estabilitzants.

Es van preparar tres mostres enriquint fluid oral blanc amb solucions patró dels anàlits. Es va recollir fluid oral de voluntaris sans de la Unitat de Farmacologia de l'IMIM, es va barrejar, i es va analitzar per verificar l'absència de substàncies interferents. La primera mostra es va enriquir amb 600 ng/ml d'amfetamina, metamfetamina, MDMA i MDA; la segona, amb 600 ng/ml de benzoilecgonina, morfina i codeïna; i la tercera, amb 600 ng/ml de cocaïna i 6-monoacetil morfina.

Cadascuna de les mostres es va dividir en dues fraccions: a la primera (A) es va afegir 0.1% d'azida sòdica (w/vol) i es va diluir 1:1 amb tampó a pH 4 (0.1M àcid cítric, 0.1M citrat de sodi, aigua, 33:17:50, vol/vol/vol); i la segona (B) es va diluir 1:1 amb fluid oral blanc. Un cop preparades, les diferents fraccions es van distribuir en alíquotes de 1 ml en tubs de vidre i cada una es va sotmetre a condicions de temperatura i temps de conservació diferents.

4.2.2.1.2. Condicions de temperatura i temps de conservació

Es va avaluar l'estabilitat a curt i llarg termini i a diferents cicles de congelació i descongelació. L'estabilitat a curt termini es va estudiar en les següents condicions:

- a 37°C, durant 3 i 7 dies
- a temperatura ambient (entre 22 i 25°C), durant 7 dies
- a 4°C, durant 7 dies

A més, una alíquota de la fracció A de cada mostra es va conservar a -20°C , com a condició de referència. L'estudi a 37°C es va realitzar usant una estufa d'incubació. Les alíquotes conservades a 37°C durant 3 dies van ser retirades un cop passat aquest període, guardades a -20°C i analitzades conjuntament amb les alíquotes conservades a 37°C , a temperatura ambient i a 4°C durant 7 dies.

L'estabilitat a llarg termini va ser avaluada a 4°C i a -20°C , durant 1 i 2 mesos. A més, una alíquota de la fracció A de cada mostra va ser conservada a -80°C , com a condició de referència.

L'estabilitat als cicles de congelació/descongelació (C/D) es va estudiar en mostres de fluid oral conservades a -20°C . Les alíquotes es van analitzar després de ser sotmeses a 3 cicles de C/D. Per realitzar un cicle de C/D, l'alíquota es conservava a -20°C durant aproximadament una hora i, passat aquest temps, es deixava descongelar a temperatura ambient. Aquest procés es va repetir successivament fins a obtenir mostres sotmeses a 2 i 3 cicles de C/D.

4.2.2.1.3. Anàlisi de les mostres i avaluació de resultats

Al final de cada condició de conservació, es van analitzar les mostres usant tres mètodes d'anàlisi diferents, en funció dels anàlits presents a les mostres: el mètode descrit a l'apartat 4.1 d'aquesta tesi i els mètodes desenvolupats per Navarro i col·laboradors (Navarro et al., 2001) i per Pujadas i col·laboradors (Pujadas et al., 2007).

Cada condició de conservació es va analitzar per quintuplicat. Es va calcular el valor mig de concentració de les cinc alíquotes un cop els valors aberrants

havien estat exclosos. Per a la detecció de valors aberrants es va utilitzar el test de Dixon per a un nivell de significació del 5% (Miller i Miller, 2002).

Es van comparar estadísticament els valors de concentració obtinguts per a les fraccions A i B conservades a cada condició de temps i temperatura estudiades, amb les alíquotes conservades a les condicions de referència.

L'estabilitat als cicles de congelació/descongelació es va avaluar comparant estadísticament els resultats per les alíquotes que no havien estat sotmeses a cap cicle (C/D 0) (valor de referència) amb les alíquotes sotmeses a 1, 2 o 3 cicles (C/D 1, C/D 2 i C/D 3).

La comparació estadística dels valors de concentració respecte al valor de referència es va realitzar aplicant un test d'anàlisi de la variància (ANOVA) per a un nivell de significació del 5% als replicats de cada mostra. A més, per a cada condició estudiada, es va calcular el percentatge de variació de la concentració de l'anàlit respecte al valor de referència. Tots els càlculs estadístics van ser portats a terme mitjançant el paquet estadístic SPSS versió 12.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

4.2.2.2. Exercicis interlaboratori

L'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM) de Barcelona i l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) de Roma van crear l'ORALVEQ (Programa de Garantia Externa de la Qualitat en l'Anàlisi de Drogues d'Abús en Fluid Oral). Es van organitzar dos exercicis interlaboratori: ORALVEQ 2007 i ORALVEQ 2008. En el primer, es van enviar mostres de fluid oral estabilitzades com s'ha descrit a l'apartat anterior. En el segon, es van enviar mostres de fluid oral preparades en dos dispositius comercials per tal d'avaluar l'estabilitat de les drogues en aquests dispositius.

4.2.2.2.1. Mostres

En l'exercici ORALVEQ 2007, es van enviar tres mostres de fluid oral (S1, S2 i S3) preparades tal com s'ha descrit a l'apartat 4.2.2.1.1, estabilitzades amb 0.1% d'azida sòdica i tampó citrat a pH 4. S1 era una mostra blanc que no contenia cap droga d'abús, S2 es va carregar amb 300 ng/mL de 6-monoacetil morfina, 800 ng/ml de morfina, 200 ng/ml de cocaïna i 150 ng/ml de benzoilecgonina i S3 es va carregar amb 800 ng/ml de MDMA i 150 ng/ml de MDA. Un cop preparades, les mostres es van homogeneïtzar i es van distribuir en alíquotes de 4 ml en tubs Nunc-cryotubes TM (Nange Nunc International, Rochester, NY).

En l'exercici ORALVEQ 2008, es van preparar dues mostres (S4 i S5) utilitzant dos dispositius comercials desenvolupats per recollir fluid oral: Cozart (Cozart Drug Detection System, Cozart, Abingdon, Oxfordshire, United Kingdom) (Speedy et al., 2007) i Intercept (Orasure Technologies, Bethlehem, PA, USA) (Niedbala et al., 2001b). Ambdós dispositius tenen un cotó que permet recollir el fluid oral, introduint-lo a la boca del subjecte, i un tub que conté una dissolució tampó on es submergeix el cotó un cop s'ha impregnat de fluid oral. La solució resultant de la barreja fluid oral i dissolució tampó s'utilitza per a la realització de l'anàlisi.

Per preparar les mostres S4 i S5 es va enriquir fluid oral blanc amb 600 ng/ml de 6-monoacetil morfina i cocaïna, i 240 ng/ml de Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) i àcid 11-Nor- Δ^9 -tetrahidrocannabinol-9-carboxílic (THCCOOH). La mostra S4 es va preparar diluint 1:3 el fluid oral enriquit amb tampó Cozart, i la mostra S5 es va preparar diluint 1:3 el fluid oral enriquit amb tampó Intercept.

A la **Taula 4.9** es descriu el contingut de les mostres S1, S2, S3, S4 i S5, segons els resultats informats pels laboratoris de referència.

Taula 4.9. Composició de les mostres de fluid oral dels exercicis ORALVEQ. Concentracions informades pels laboratoris de referència (mitjana±desviació estàndard, ng/mL).

a) 6-monoacetil morfina (6MAM), morfina (MOR), cocaïna (COC) i benzoilecgonina (BZE).

Any	M ^a	Composició			
		6MAM	MOR	COC	BZE
2007	S1	-	-	-	-
	S2	281.0±17.7	692.4±19.0	188.1±10.3	163.7±21.2
	S3	-	-	-	-
2008	S4	719.8±106.7	67.9±46.0 ^b	258.9±8.2	355.5±43.7 ^b
	S5	767.1±73.6	54.1±54.0 ^b	381.4±21.9	231.1±38.0 ^b

^a Mostres

^b Morfina i Benzoilecgonina no van ser adicionades al fluid oral a les mostres S4 i S5, es van formar a partir de la degradació de 6-monoacetil morfina i cocaïna, respectivament

b) 3,4-metilendioximetamfetamina (MDMA), 3,4-metilendioxiamfetamina (MDA), Δ⁹-tetrahidrocannabinol (THC) i Àcid 11-Nor-Δ⁹-tetrahidrocannabinol-9-carboxílic (THCCOOH).

Any	M ^a	Composició			
		MDMA	MDA	THC	THCCOOH
2007	S1	-	-	-	-
	S2	-	-	-	-
	S3	800.5±70.9	147.6±7.2	-	-
2008	S4	-	-	126.3±8.4	142.0 ^b
	S5	-	-	62.1±6.6	209.0 ^b

^a Mostres

^b Només es disposa del resultat d'un laboratori de referència

4.2.2.2.2. Estudi d'homogeneïtat

Prèviament a l'enviament de les mostres als laboratoris, es va verificar el seu contingut i homogeneïtat. L'homogeneïtat de cada mostra va ser avaluada analitzant 2 replicats de 8 alíquotes escollides al principi, al mig i al final del procediment d'aliquotatge. Per a l'anàlisi de cadascuna de les mostres, es van utilitzar tres mètodes diferents, en funció de l'anàlit present a la mostra: el mètode descrit a l'apartat 4.1 d'aquesta tesi i els mètodes desenvolupats per Navarro i col·laboradors (Navarro et al., 2001) i per Pujadas i col·laboradors (Pujadas et al., 2007).

L'avaluació de l'homogeneïtat de les mostres es va realitzar comparant estadísticament els resultats obtinguts en l'anàlisi dels 2 replicats de les 8 alíquotes, aplicant un test d'anàlisi de la variància (ANOVA) per a un nivell de significació del 5%.

4.2.2.2.3. Laboratoris de referència

Tres laboratoris de referència van analitzar les mostres al mateix temps que els laboratoris participants en els exercicis del programa ORALVEQ. Els resultats informats per aquests laboratoris van ser utilitzats per corroborar la concentració dels anàlits a cadascuna de les mostres. Els tres laboratoris de referència van ser:

- Servicio de Toxicología Forense, Instituto de Medicina Legal, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, Espanya;
- Orasure Technologies, Inc., Bethlehem, PA, Estats Units;
- Section Toxicology, National Institute of Criminalistics and Criminology, Brussel·les, Bèlgica.

Aquests tres centres són experts en l'anàlisi de drogues en fluid oral. Són autors de nombrosos articles científics que tracten aquest tipus d'anàlisi, com per exemple els que es citen a continuació: Samyn i Van Haeren, 2000; Niedbala et al., 2001a; Niedbala et al., 2001b; Kintz i Samyn, 2002; Samyn et al., 2007; Concheiro et al., 2008; de Castro et al., 2008; Fritch et al., 2009; Wille et al., 2009.

4.2.2.2.4. Laboratoris participants

Els laboratoris participants en els exercicis del programa ORALVEQ van ser els mateixos a l'any 2007 i a l'any 2008, excepte un laboratori. A l'exercici del 2007 hi van participar 15 laboratoris europeus i 3 americans, i a l'exercici del 2008, 14 laboratoris europeus i 3 americans. Una part d'aquests eren laboratoris clínics d'hospitals públics i una altra part eren laboratoris de toxicologia forense pertanyents a departaments de medicina legal. Els laboratoris participants a l'ORALVEQ van ser convidats a participar i la participació no suposava cap cost, era confidencial i voluntària.

4.2.2.2.5. Avaluació dels resultats qualitatius i quantitius dels laboratoris participants

Els resultats qualitatius (determinació de la presència o absència d'una substància) es van avaluar identificant els resultats falsos negatius i els falsos positius informats pels laboratoris.

Els resultats quantitius informats per cada laboratori es van avaluar calculant el valor de z-score:

$$z\text{-score} = (X_i - \mu) / \sigma$$

on X_i és el resultat obtingut pel laboratori participant, μ és el valor assignat pel compost estudiat i σ és la variabilitat acceptable per a l'assaig. En ambdós exercicis es van utilitzar la mitjana i la desviació estàndard robustes dels resultats informats pels laboratoris participants, com a valor assignat i com a variabilitat acceptable, respectivament. En l'exercici realitzat l'any 2008, els valors clarament aberrants informats per alguns laboratoris participants (aproximadament 10 vegades més grans que els valors informats per la resta de laboratoris), van ser eliminats abans de realitzar els càlculs. Els paràmetres robustos es van calcular seguint la guia *International Standard ISO 13528:2005. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons* (ISO, 2005a). El criteri que es va seguir per avaluar els resultats quantitius en base al valor de z-score obtingut va ser: resultats satisfactoris quan $|z| \leq 2$, resultats dubtosos quan $2 < |z| < 3$ i resultats no satisfactoris quan $|z| \geq 3$.

Per a cadascun dels exercicis es va mesurar la dispersió de tots els resultats quantitius informats, calculant el coeficient de variació (CV%) utilitzant la mitjana i la desviació estàndard robustes dels laboratoris participants.

També es va mesurar l'exactitud dels resultats informats pels laboratoris, calculant l'error relatiu (ERR%) de la mitjana dels laboratoris participants respecte a la mitjana dels laboratoris de referència.

En ambdós exercicis, els laboratoris participants van rebre un informe que incloïa una breu explicació de l'avaluació realitzada, juntament amb les metodologies utilitzades pels laboratoris i els resultats qualitius i quantitius obtinguts per tots els participants en els exercicis.

4.2.2.2.6. Avaluació de l'estabilitat de les drogues en els dispositius comercials

Per avaluar l'estabilitat de les drogues en els dispositius comercials, es va calcular la seva recuperació a partir dels resultats quantitius informats pels laboratoris participants.

Per als anàlisis addicionats a les mostres, 6-monoacetil morfina, cocaïna, THCCOOH i THC, la recuperació es va calcular per comparació entre la mitjana robusta informada pels laboratoris participants i la concentració de substància addicionada al fluid oral.

Per a morfina i benzoilecgonina, no addicionades a les mostres, la recuperació es va calcular per comparació entre la mitjana robusta informada pels laboratoris participants i les concentracions màximes de morfina i benzoilecgonina que es podien obtenir a partir de 6-monoacetil morfina i cocaïna, respectivament, addicionades a les mostres.

La comparació estadística entre els valors de concentració obtinguts per la mostra S4 i els obtinguts per la mostra S5 es va realitzar aplicant un test t d'Student.

4.2.3. Resultats

Els resultats obtinguts en els estudis d'estabilitat i en els exercicis interlaboratori realitzats es descriuen en les següents publicacions:

M. Ventura, S. Pichini, R. Ventura, P. Zuccaro, R. Pacifici, R. de la Torre. Stability Studies of Principal Illicit Drugs in Oral Fluid: Preparation of Reference Materials for External Quality Assessment Schemes. Ther Drug

Monit. 2007;29(5):662-665. **A l'Annex 2, es presenten dades addicionals d'aquest treball que no figuren a la publicació.**

M. Ventura, R. Ventura, S. Pichini, S. Leal, P. Zuccaro, R. Pacifici, K. Langohr, R. de la Torre. ORALVEQ: External quality assessment scheme of drugs of abuse in oral fluid. Results obtained in the first round performed in 2007. Forensic Sci Int. 2008;182(1-3):35-40.

M. Ventura, S. Pichini, R. Ventura, S. Leal, P. Zuccaro, R. Pacifici, R. de la Torre. Stability of Drugs of Abuse in Oral Fluid Collection Devices with Purpose of External Quality Assessment Schemes. Ther Drug Monit. 2009;31(2):277-280.

Ventura M, Pichini S, Ventura R, Zuccaro P, Pacifici R, de la Torre R. Stability Studies of Principal Illicit Drugs in Oral Fluid: Preparation of Reference Materials for External Quality Assessment Schemes. Ther Drug Monit. 2007;29(5):662-665.

Ventura M, Ventura R, Pichini S, Leal S, Zuccaro P, Pacifici R, Langohr K, de la Torre R. [ORALVEQ: External quality assessment scheme of drugs of abuse in oral fluid. Results obtained in the first round performed in 2007.](#) Forensic Sci Int. 2008;182(1-3):35-40.

Ventura M, Pichini S, Ventura R, Leal S, Zuccaro P, Pacifici R, de la Torre R. [Stability of Drugs of Abuse in Oral Fluid Collection Devices with Purpose of External Quality Assessment Schemes](#). *Ther Drug Monit.* 2009;31(2):277-280.

4.2.4. Discussió

Estabilitat de les drogues en fluid oral i en fluid oral recollit utilitzant dispositius comercials. Desenvolupament de materials d'assaig per a exercicis interlaboratori.

El fluid oral pot ser recollit dins un recipient adient (escopint o deixant-lo caure lliurement), o bé utilitzant dispositius de recollida comercials i, per tant, els laboratoris poden rebre ambdós tipus de mostres per a la seva anàlisi. Per aquesta raó, és important conèixer l'estabilitat de les drogues en fluid oral, recollit d'ambdues maneres, a les condicions de temps i temperatura en què aquestes mostres es poden trobar tant pel que fa referència a la preparació i conservació de material d'assaig per a exercicis interlaboratori, com pel que fa referència al seu transport des del lloc de recollida al laboratori d'anàlisi i el seu posterior emmagatzematge.

La primera part del treball va consistir en estudiar l'estabilitat de les drogues en fluid oral recollit escopint dins un recipient adient, sense utilitzar cap tipus de dispositiu comercial. Hi ha molts factors que poden influir en l'estabilitat de les drogues d'abús en matrius biològiques, com per exemple, el temps i la temperatura de conservació, la concentració de la substància, l'addició d'estabilitzadors i el material del qual està fet el dispositiu que conté la matriu biològica. Donat que estudiar tots els factors és inviable, en aquest treball es va estudiar l'estabilitat de les drogues a les condicions de temperatura i temps a les quals normalment es sotmeten les mostres de fluid oral que són recollides i que es transporten al laboratori per fer l'anàlisi de cribatge i/o confirmació, i també a les condicions més habituals d'enviament i conservació de materials d'assaig que s'utilitzen per a exercicis interlaboratori. Estudis previs fets per avaluar l'estabilitat de la cocaïna en

fluid oral, van demostrar que es requeria la presència d'àcid cítric per evitar la degradació de cocaïna quan la mostra era sotmesa a determinades condicions de temperatura (Cone i Menchen, 1988). Tenint en compte aquest fet, els estudis d'estabilitat es van portar a terme en paral·lel amb fluid oral amb tampó citrat a pH 4 i amb fluid oral sense tamponar. Al fluid oral tamponat, també se li va afegir azida sòdica, per evitar la possible degradació de les substàncies per activitat microbiana.

L'estabilitat dels anàlits es va estudiar conservant les mostres a 4°C i -20°C fins a un període de 2 mesos, temperatures habituals de conservació de les mostres de fluid oral que són recollides i que es transporten al laboratori per a la seva anàlisi i, també, temperatures habituals de conservació dels materials d'assaig que són preparats per ser utilitzats en exercicis interlaboratori. També es va avaluar l'estabilitat dels anàlits, conservant les mostres a temperatura ambient (entre 22 i 25°C), per un període de 7 dies i, en condicions de degradació accelerada, a 37°C, durant 7 dies, per reproduir condicions extremes en què es poden trobar les mostres quan són transportades. Finalment, donat que les mostres biològiques normalment es conserven congelades a -20°C, també es va considerar important estudiar l'estabilitat dels anàlits després de sotmetre les mostres a diversos cicles de congelació i descongelació.

En totes les anàlisis, es va processar, en paral·lel, una alíquota de la mostra conservada en condicions de referència, per tal d'avaluar la degradació dels anàlits en les condicions d'estudi. Amb aquesta finalitat, es van utilitzar alíquotes de les mostres conservades a -20°C, per a l'estabilitat a curt termini, i a -80°C, per a l'estabilitat a llarg termini, temperatura i temps a les quals es considera que la degradació dels anàlits és poc probable.

Els anàlits estudiats van ser amfetamina, metamfetamina, MDMA, MDA, cocaïna, benzoilecgonina, 6-monoacetil morfina, morfina i codeïna. Es van seleccionar aquestes substàncies perquè són les que es troben en fluid oral després d'una presa d'amfetamines, cocaïna i heroïna (Wood et al., 2005 i Wylie et al., 2005b).

Es va estudiar l'estabilitat en mostres de fluid oral que contenen 300 ng/mL dels anàlits estudiats. Es va seleccionar aquesta quantitat tenint en compte les concentracions trobades per als diferents anàlits en mostres reals de fluid oral (Wood et al., 2005 i Wylie et al., 2005b).

Els resultats obtinguts van demostrar l'estabilitat de totes les drogues estudiades en fluid oral en absència de tampó citrat a pH 4 i d'estabilitzador (azida sòdica) en les condicions de conservació estudiades a curt i llarg termini, excepte per a cocaïna i 6-monoacetil morfina. Per a aquests dos compostos, en absència de tampó i azida sòdica, es produïa degradació donant lloc a la formació de benzoilecgonina i morfina, respectivament, per hidròlisi dels enllaços ester. L'addició al fluid oral de tampó citrat a pH 4 i azida sòdica va evitar la degradació de cocaïna i 6-monoacetil morfina. Tampoc es va observar degradació de cap dels anàlits en fluid oral enfront els cicles de congelació/descongelació.

D'aquesta manera, es va trobar que l'estabilitat d'amfetamina, metamfetamina, MDMA, MDA, cocaïna, benzoilecgonina, 6-monoacetil morfina, morfina i codeïna addicionades a fluid oral estabilitzat amb tampó citrat a pH 4 i azida sòdica, és adequada per a què aquest fluid oral pugui ser transportat durant una setmana a 25°C (i fins a una temperatura màxima de 37°C) i per conservar-lo a 4°C i a -20°C, durant almenys 2 mesos. Així, es van poder determinar les condicions òptimes de preparació, transport i

conservació de mostres de fluid oral per ser utilitzades en exercicis interlaboratori.

Els estudis d'estabilitat portats a terme han demostrat l'estabilitat d'amfetamina, metamfetamina, MDMA i MDA i de morfina, codeïna i benzoïlecgonina a diferents temperatures i temps. Aquests estudis també han demostrat la necessitat de tamponar i estabilitzar el fluid oral per aquelles substàncies amb enllaços esters a les seves estructures (cocaïna i 6-monoacetil morfina) per prevenir la hidròlisi i per evitar la possible degradació per microorganismes.

Tenint en compte els resultats obtinguts per cocaïna i 6-monoacetil morfina, i donat l'augment de la utilització de dispositius comercials per recollir el fluid oral (Crouch et al., 2008), es va estudiar l'estabilitat de les substàncies que presenten problemes amb el fluid oral sense tamponar i estabilitzar, i de les substàncies que poden presentar problemes de recuperació degut a l'adsorció als materials, com el THC i el seu metabòlit THCCOOH (Crouch et al., 2004; Crouch, 2005; Dickson et al., 2007; Crouch et al., 2008; Langel et al., 2008), en dos dispositius de recollida de fluid oral de les firmes Cozart (Cozart) i Orasure (Intercept). Es va estudiar la recuperació de 6-monoacetil morfina, cocaïna, THC i THCCOOH en els dos dispositius comercials, a partir de l'avaluació dels resultats quantitatius de l'exercici ORALVEQ de l'any 2008. Les concentracions dels anàlits es van escollir tenint en compte les concentracions que es podien trobar en mostres reals i també es van escollir suficientment altes per poder detectar possibles degradacions dels anàlits, formació de productes i detectar possibles problemes de recuperació.

Tal i com es va observar amb el fluid oral recollit sense la utilització de dispositius comercials i sense tamponar a pH àcid, en els dos dispositius de

recollida comercials estudiats es va observar la conversió de 6-monoacetil morfina a morfina i la conversió de cocaïna a benzoilecgonina. Les recuperacions, però, per 6-monoacetil morfina i cocaïna van ser millors que les trobades quan no s'havien afegit preservatius al fluid oral. Això va posar de manifest que les barreges que contenen els dispositius comercials (preservatius, solucions tamponades, etc) contribueixen a estabilitzar les drogues contingudes en les mostres de fluid oral, tot i que no aconsegueixen estabilitzar-les totalment.

Tant en el dispositiu Cozart com en l'Intercept, es van observar recuperacions adients per THCCOOH i molt baixes per THC. Aquests resultats, ja prèviament descrits a la literatura (Moore et al., 2006b), són els esperats, donat que es coneix que els problemes d'adsorció d'aquests compostos en les superfícies dels tubs limita la seva recuperació (Crouch, 2005 i Dickson et al., 2007).

Els resultats obtinguts han mostrat les mancances que presenten els dispositius de recollida comercials estudiats: baixa estabilitat de les substàncies amb enllaços esters a les seves estructures i baixa recuperació dels cannabinoids per adhesió a les parets dels dispositius. Això posa de manifest les dificultats existents en la preparació de materials d'assaig adequats per ser utilitzats en exercicis interlaboratori, i també en la interpretació dels resultats de mostres de consumidors de drogues, pel que fa a les concentracions realment presents en el fluid oral i al temps transcorregut des de l'administració. No obstant això, és important dir que, independentment del dispositiu comercial utilitzat, tots els laboratoris que van participar a l'exercici, van arribar a les mateixes conclusions pel que fa referència al tipus de drogues consumides en les mostres analitzades.

Programa ORALVEQ. Resultats qualitatis: qualitat de les anàlisis i errors detectats

A partir dels resultats informats pels laboratoris en l'exercici del programa ORALVEQ realitzat el 2007, es va concloure que la qualitat de les anàlisis des d'un punt de vista qualitatiu era bona. En les anàlisis de cribratge, per tècniques immunològiques, no es va informar cap resultat fals negatiu i 5 dels 10 falsos positius informats podrien estar relacionats amb la interferència del pH àcid del tampó amb un dels immunoassaigs utilitzats. Pel que fa referència a les anàlisis de confirmació, es van informar 11 errors (8 falsos positius i 3 falsos negatius), però cal tenir en compte que els 8 falsos positius es van concentrar en 3 dels 21 laboratoris participants. Els resultats falsos negatius i falsos positius informats en aquest exercici no estan relacionats amb la no utilització de concentracions de tall (concentració de droga a partir de la qual es considera una mostra positiva) ni amb la utilització de metodologies analítiques no adequades, doncs gairebé tots els laboratoris van utilitzar concentracions de tall i, per a les anàlisis de confirmació, es va utilitzar cromatografia de gasos o cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses. En el cas de les concentracions de tall, en alguns casos es van utilitzar concentracions més altes que les recomanades pel SAMHSA (SAMHSA, 2004; Bush, 2008), però això no va fer que s'informessin resultats erronis, donat que, en tots els casos, les concentracions de les drogues presents a les mostres de fluid oral eren superiors als valors de tall emprats pels laboratoris.

Pel que fa referència a l'exercici del programa ORALVEQ realitzat l'any 2008, també es va concloure que la qualitat de les anàlisis des d'un punt de vista qualitatiu era bona. En aquest cas no es va informar cap resultat fals positiu ni a les anàlisis de cribratge, per tècniques immunològiques, ni a les anàlisis de confirmació. En canvi, sí que es van informar resultats falsos

negatius: 2 a les anàlisis de cribratge (un per a cada mostra) i 3 a les anàlisis de confirmació (2 per a la S4 i 1 per a la S5). Aquests falsos negatius van ser informats per un nombre reduït de laboratoris: 3 dels 20 laboratoris que van participar en l'exercici. A diferència del que va passar l'any 2007, sobretot en el cas de les anàlisis de cribratge, en aquest exercici els resultats falsos negatius sí que van estar relacionats amb la utilització de concentracions de tall molt més elevades que les recomanades pel SAMHSA (SAMHSA, 2004; Bush, 2008) i també a la utilització de tècniques immunològiques dirigides a la detecció de benzoilecgonina, en comptes de cocaïna, per a la detecció del consum de cocaïna, i a la detecció de morfina, en comptes de 6-monoacetil morfina, per a la detecció del consum d'heroïna. Cocaïna i 6-monoacetil morfina són les drogues que es troben principalment al fluid oral quan es produeix un consum de cocaïna i heroïna, respectivament (Huestis i Cone, 1998; Cone i Huestis, 2007).

La qualitat dels resultats qualitius ha estat bona, tant pel que fa referència a les anàlisis de cribratge com a les anàlisis de confirmació. Els falsos positius i falsos negatius trobats han estat informats per un nombre reduït de laboratoris. Alguns dels falsos negatius estan relacionats amb la utilització de concentracions de tall molt més elevades que les proposades pel SAMHSA i a la utilització de tècniques dirigides a la detecció de compostos que no són els que es troben principalment al fluid oral.

Programa ORALVEQ. Resultats quantitius: qualitat de les anàlisis i errors detectats

Un elevat nombre de laboratoris van informar resultats quantitius tant a l'exercici del 2007 com a l'exercici del 2008.

Respecte a l'exactitud dels resultats, l'error estàndard (ERR%), calculat a partir de la mitjana informada pels laboratoris de referència, va ser aproximadament del 20% per a tots els anàlisis. Respecte a la dispersió, aquesta va ser bastant elevada a l'exercici del 2007 (CV% al voltant del 40%) degut, principalment, a la presència de valors aberrants informats per alguns laboratoris, doncs aplicant estadística robusta no s'eliminen aquests valors, tot i que se'ls dona menys pes en els càlculs. En l'exercici del 2008, la dispersió dels resultats es va calcular utilitzant la mitjana i la desviació estàndard robusta dels resultats informats pels laboratoris participants, tal i com s'havia fet a l'exercici del 2007, però en aquest cas es van eliminar prèviament aquells valors considerats molt aberrants i que podien distorsionar els resultats: valors aproximadament deu vegades més grans que els resultats informats per la resta de laboratoris. Un total de set valors (quatre per a la S4 i tres per a la S5), informats per 3 laboratoris, no van ser considerats per als càlculs de la mitjana i la desviació estàndard robusta. Els CV% calculats d'aquesta manera van ser al voltant del 30% per a tots els anàlisis, excepte per THC a la S5 i per benzoïlecgonina, morfina i THCCOOH a ambdues mostres que van ser molt més alts. Cal tenir en compte, però, que benzoïlecgonina i morfina no es van addicionar al fluid oral, sinó que són productes de degradació per la hidròlisi espontània dels enllaços esters de cocaïna i 6-monoacetil morfina, respectivament, i THC i THCCOOH és conegut que presenten problemes de recuperació per adsorció a les parets dels dispositius. Per tant, els alts CV% trobats per aquestes quatre substàncies cal atribuir-los majoritàriament als problemes

que ofereixen els dispositius comercials de recollida de fluid oral (baixa recuperació de cannabinoids per adsorció a les parets dels dispositius i degradació de cocaïna i 6-monoacetil morfina). Els CV% observats van ser similars als trobats en els exercicis portats a terme per Clarke i Wilson entre els anys 2002 i 2004, amb mostres de fluid oral recollides amb el dispositiu comercial Intercept (Clarke i Wilson, 2005).

Als exercicis del programa ORALVEQ, tal i com s'havia realitzat en els exercicis del HAIRVEQ, a part d'avaluar la dispersió conjunta dels resultats informats per tots els laboratoris, també es va realitzar una avaluació individual de cadascun dels resultats quantitatius, a través del càlcul del valor de z-score. D'aquesta manera, cada laboratori podia conèixer la desviació del seu resultat respecte al valor assignat. En ambdós exercicis de l'ORALVEQ, com a valor assignat i com a variabilitat acceptable, es van utilitzar la mitjana robusta i la desviació estàndard robusta dels laboratoris participants, respectivament. Tant a l'exercici realitzat l'any 2007 com al realitzat l'any 2008, es va observar un elevat nombre de resultats satisfactoris ($|z| \leq 2$): entre un 75% i un 100%, depenent de l'anàlit. Aquest alt percentatge de resultats satisfactoris s'explica, en part, perquè la desviació estàndard robusta dels laboratoris participants va ser alta.

Pel que fa referència als resultats quantitatius, es pot concloure que tant l'exactitud com la dispersió dels resultats es veu afectada, per una banda, per l'existència de valors aberrants informats per un nombre reduït de laboratoris i, per l'altra, per les mancances que presenten els dispositius de recollida comercials de fluid oral: baixa recuperació dels cannabinoids per adhesió a les parets dels dispositius i formació de benzoïllecgonina i morfina per la degradació de cocaïna i 6-monoacetil morfina.

L'exercici portat a terme l'any 2007 va ser el primer exercici interlaboratori d'anàlisi de drogues d'abús en aquesta matriu, utilitzant fluid oral recollit sense cap mena d'estimulació i sense utilitzar dispositius de recollida comercials.

Un important assoliment dels exercicis del programa ORALVEQ és que va obligar a alguns laboratoris, que no analitzaven rutinàriament mostres de fluid oral, a validar en fluid oral metodologies analítiques desenvolupades i validades inicialment pel cribratge i la confirmació de drogues d'abús en altres matrius biològiques.

CAPÍTOL 5

CONCLUSIONS

ANÀLISI DE DROGUES D'ABÚS EN CABELL

Material d'assaig

1. S'ha demostrat que la qualitat dels resultats analítics no depèn del tipus de mostra de cabell de la qual es parteix per realitzar l'anàlisi i que, per tant, el cabell tallat en petits fragments i el cabell polvoritzat poden ser utilitzats indistintament com a material d'assaig en exercicis interlaboratori.

Qualitat dels resultats i fonts d'error

2. Els exercicis interlaboratori en cabell (HAIRVEQ) han estat útils, no només per avaluar la qualitat dels resultats informats pels laboratoris, sinó també per identificar les fonts d'error i conèixer les eines que era necessari desenvolupar per ajudar als laboratoris a millorar la qualitat dels seus resultats analítics.
Els exercicis interlaboratori realitzats i les intervencions de tipus educatiu portades a terme, han permès millorar la qualitat dels resultats analítics des d'un punt de vista qualitatiu al llarg de la realització del programa.
3. S'ha observat una elevada dispersió de resultats quantitius en els laboratoris participants en el programa, que s'ha reduït en els últims exercicis fins als valors observats en altres programes de control de qualitat d'anàlisi de drogues en cabell.
S'ha detectat que els metabòlits, com benzoilecgonina o morfina, es poden determinar amb menys precisió que les drogues inalterades.

4. S'ha identificat que els errors estan relacionats tant amb el processament incorrecte de la mostra (com per exemple, la no utilització d'estàndard intern o bé la no utilització de corbes de calibratge per quantificar les substàncies), com amb la utilització de tècniques d'anàlisi no adequades (com per exemple, la cromatografia no acoblada a espectrometria de masses), o amb la manca d'una validació adequada de les metodologies en termes de sensibilitat i especificitat, o amb una avaluació incorrecta dels resultats (com per exemple, la utilització de concentracions de tall diferents a les recomanades per a l'anàlisi de drogues en cabell i la interpretació incorrecta dels resultats obtinguts per espectrometria de masses).
5. S'ha observat que després de cinc anys de participació en els exercicis interlaboratori en cabell (HAIRVEQ), hi ha laboratoris que informen molts errors de tipus qualitatiu i amb una dispersió de resultats elevada. Tot i haver identificat les fonts, hi ha errors que no es corregeixen, probablement degut a la manca de recursos dels laboratoris.

ANÀLISI DE DROGUES D'ABÚS EN FLUID ORAL

Metodologia analítica

6. S'ha desenvolupat i validat un mètode analític que permet identificar i quantificar 6-monoacetil morfina, morfina, codeïna, cocaïna i benzoilecgonina en fluid oral.

La idoneïtat del mètode per identificar i quantificar aquestes drogues en mostres reals, s'ha comprovat analitzant mostres de fluid oral procedents d'un estudi d'excreció de codeïna, realitzat en voluntaris

sans, i analitzant mostres de fluid oral procedents de consumidors de drogues d'abús.

Material d'assaig

7. S'ha demostrat que amfetamina, metamfetamina, MDMA, MDA, benzoilecgonina, morfina i codeïna són estables en fluid oral o bé en fluid oral estabilitzat amb tampó citrat a pH 4 i azida sòdica, conservat a 37°C i a temperatura ambient (entre 22 i 25°C) durant 7 dies i conservat a 4°C i a -20°C durant 2 mesos.
8. S'ha demostrat que per a compostos amb enllaços ester, com cocaïna i 6-monoacetil morfina, és necessari estabilitzar el fluid oral amb tampó citrat a pH 4 i azida sòdica. En aquestes condicions, els compostos són estables conservats a 37°C i a temperatura ambient (entre 22 i 25°C) durant 7 dies i conservats a 4°C i -20°C durant 2 mesos.
9. S'ha demostrat l'estabilitat dels compostos en estudi en fluid oral enfront cicles de congelació/descongelació.
10. S'han determinat les mancances que presenten els dispositius de recollida comercials estudiats: baixa estabilitat de les substàncies amb enllaços esters a les seves estructures i baixa recuperació dels cannabinoids per adhesió a les parets dels dispositius.

Qualitat dels resultats i fonts d'error

11. L'exercici interlaboratori en fluid oral realitzat l'any 2007 (ORALVEQ 2007) va ser el primer exercici d'anàlisi de drogues d'abús en aquesta

matriu, utilitzant fluid oral recollit sense cap mena d'estimulació i sense utilitzar dispositius de recollida comercials.

12. La qualitat dels resultats dels laboratoris participants en els dos exercicis interlaboratori en fluid oral realitzats, des d'un punt de vista qualitatiu, ha estat bona, tant pel que fa referència a les anàlisis de cribratge com a les anàlisis de confirmació.
13. Les principals causes dels errors de tipus qualitatiu han estat: la utilització de concentracions de tall molt més elevades que les proposades pel SAMHSA i la utilització de tècniques dirigides a la detecció de compostos que no són els que es troben principalment al fluid oral.
14. S'ha vist que tant l'exactitud com la precisió globals dels resultats obtinguts pels laboratoris es veu afectada, per una banda, per l'existència de valors aberrants informats per un nombre reduït de laboratoris i, per l'altra, per les mancances que presenten els dispositius de recollida comercials de fluid oral: baixa recuperació dels cannabinoids per adhesió a les parets dels dispositius i formació de benzoilecgonina i morfina per la degradació de cocaïna i 6-monoacetil morfina.
15. Un important assoliment dels exercicis interlaboratori en fluid oral (ORALVEQ) és que va obligar a alguns laboratoris, que no analitzaven rutinàriament mostres de fluid oral, a validar en fluid oral metodologies analítiques desenvolupades i validades inicialment pel cribratge i la confirmació de drogues d'abús en altres matrius biològiques.

CAPÍTOL 6

BIBLIOGRAFIA

Analytical Methods Committee, Analytical Division, Royal Society of Chemistry. Robust statistics-how not to reject outliers. Part 1. Basic concepts. *Analyst*. **1989a**;114:1693-7.

Analytical Methods Committee, Analytical Division, Royal Society of Chemistry. Robust statistics-how not to reject outliers. Part 2. Inter-laboratory trials. *Analyst*. **1989b**;114:1699-1702.

Aps JK, Martens LC. Review: The Physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int*. **2005**;150(2-3):119-31.

Badia R, Segura J, Artola A, de la Torre R. Survey on drugs-of-abuse testing in the European Union. *J Anal Toxicol*. **1998**;22(2):117-26.

Barnes AJ, Kim I, Schepers R, Moolchan ET, Wilson L, Cooper G, Reid C, Hand C, Huestis MA. Sensitivity, specificity, and efficiency in detecting opiates in oral fluid with the Cozart Opiate Microplate EIA and GC-MS following controlled codeine administration. *J Anal Toxicol*. **2003**;27(7):402-7.

Blencowe T, Pehrsson A, Lillsunde P, Vimpari K, Houwing S, Smink B, Mathijssen R, Van der Linden T, Legrand SA, Pil K, Verstraete A. An analytical evaluation of eight on-site oral fluid drug screening devices using laboratory confirmation results from oral fluid. *Forensic Sci Int*. **2011**;208(1-3):173-9.

Bosker WM, Huestis MA. Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clin Chem*. **2009**;55(11):1910-31.

Bush DM. The U.S. Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs: current status and future considerations. *Forensic Sci Int*. **2008**;174(2-3):111-9.

Cairns T, Hill V, Schaffer M, Thistle W. Removing and identifying drug contamination in the analysis of human hair. *Forensic Sci Int*. **2004a**;145(2-3):97-108.

Cairns T, Hill V, Schaffer M, Thistle W. Amphetamines in washed hair of demonstrated users and workplace subjects. *Forensic Sci Int*. **2004b**;145(2-3):137-42.

Cairns T, Hill V, Schaffer M, Thistle W. Levels of cocaine and its metabolites in washed hair of demonstrated cocaine users and workplace subjects. *Forensic Sci Int*. **2004c**;145(2-3):175-81.

- Caplan** YH, Goldberger BA. Alternative specimens for workplace drug testing. *J Anal Toxicol.* **2001**;25(5):396-9.
- Chiarotti** M, Strano-Rossi S, Offidani C, Fiori A. Evaluation of cocaine use during pregnancy through toxicological analysis of hair. *J Anal Toxicol.* **1996**;20(7):555-8.
- Choo** RE, Huestis MA. Oral fluid as a diagnostic tool. *Clin Chem Lab Med.* **2004**;42(11):1273-87.
- Clarke** J, Wilson JF. Proficiency testing (external quality assessment) of drug detection in oral fluid. *Forensic Sci Int.* **2005**;150(2-3):161-4.
- Compañó** R, Ríos A. *Garantía de la Calidad en los laboratorios Analíticos.* Editorial Síntesis S.A., Madrid, **2002**.
- Concheiro** M, de Castro A, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M. Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* **2008**;391(6):2329-38.
- Cone** EJ, Menchen SL. Stability of cocaine in saliva. *Clin Chem.* **1988**;34(7):1508.
- Cone** EJ. Saliva testing for drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci.* **1993**;694:91-127.
- Cone** EJ. Legal, workplace, and treatment drug testing with alternate biological matrices on a global scale. *Forensic Sci Int.* **2001**;121(1-2):7-15.
- Cone** EJ, Huestis MA. Interpretation of oral fluid tests for drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci.* **2007**;1098:51-103.
- Crouch** DJ, Day J, Baudys J, Fatah AA. Evaluation of Saliva/Oral Fluid as an Alternate Drug Testing Specimen. *NIJ Report 605-03. NCJ 203569.* **2004**, 70p.
- Crouch** DJ. Oral fluid collection: the neglected variable in oral fluid testing. *Forensic Sci Int.* **2005**;150 (2-3):165-73.
- Crouch** DJ, Walsh JM, Cangianelli L, Quintela O. Laboratory evaluation and field application of roadside oral fluid collectors and drug testing devices. *Ther Drug Monit.* **2008**;30(2):188-95.

De Castro A, Concheiro M, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M. LC-MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma. Study of correlation between venlafaxine concentrations in both matrices. *J Pharm Biomed Anal.* **2008**;48(1):183-93.

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.* **2004**;43(3):157-85.

Deveaux M, Kintz P, Goullé JP, Bessard J, Pépin G, Gosset D. The hair analysis proficiency testing program of French Society of Analytical Toxicology. *Forensic Sci. Int.* **2000**;107(1-3):389-94.

Dickson S, Park A, Nolan S, Kenworthy S, Nicholson C, Midgley J, Pinfold R, Hampton S. The recovery of illicit drugs from oral fluid sampling devices. *Forensic Sci Int.* **2007**;165(1):78-84.

DRUID. European Project Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines. Project No. TREN-05-FP6TR-S07.61320-518404-DRUID (www.druid-project.eu).

Drummer OH. Postmortem toxicology of drugs of abuse. *Forensic Sci Int.* **2004**;142(2-3):101-13.

Drummer OH. Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. *Forensic Sci Int.* **2005**;150(2-3):133-42.

Drummer OH. Drug testing in oral fluid. *Clin Biochem Rev.* **2006**;27(3):147-59.

Drummer OH. Introduction and review of collection techniques and applications of drug testing of oral fluid. *Ther Drug Monit.* **2008**;30(2):203-6.

EA-EUROLAB-EURACHEM Guide EA-03/04: Use of Proficiency Testing as a tool for accreditation in testing, rev. 01. European Accreditation (EA), August, **2001**.

EURACHEM Working Group. Selection, Use and Interpretation of Proficiency Testing (PT) Schemes by Laboratories. EURACHEM Secretariat, Teddington, Middlesex, UK, **2000**.

Ferrara DS, Tedeschi L, Frison G, Brusini G. Quality control in toxicological analysis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **1998**;713(1):227-43.

- Frison G**, Tedeschi L, Favretto D, Reheman A, Ferrara SD. Gas chromatography/mass spectrometry determination of amphetamine-related drugs and ephedrines in plasma, urine and hair samples after derivatization with 2,2,2-trichloroethyl chloroformate. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2005**;19(7):919-27.
- Fritch D**, Blum K, Nonnemacher S, Haggerty BJ, Sullivan MP, Cone EJ. Identification and quantitation of amphetamines, cocaine, opiates, and phencyclidine in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* **2009**;33(9):569-77.
- Gallardo E**, Queiroz JA. The role of alternative specimens in toxicological analysis. *Biomed Chromatogr.* **2008**;22(8):795-821.
- Girod C**, Staub C. Analysis of drugs of abuse in hair by automated solid-phase extraction, GC/EI/MS and GC ion trap/CI/MS. *Forensic Sci Int.* **2000**;107(1-3):261-71.
- Goldberger BA**, Darraj AG, Caplan YH, Cone EJ. Detection of methadone, methadone metabolites, and other illicit drugs of abuse in hair of methadone-treatment subjects. *J Anal Toxicol.* **1998**;22(6):526-30.
- Guidance for industry**; Bioanalytical method validation. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), U.S. Food and Drug Administration, Rockville, **2001**.
- Gunnar T**, Ariniemi K, Lillsunde P. Validated toxicological determination of 30 drugs of abuse as optimized derivatives in oral fluid by long column fast gas chromatography/electron impact mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **2005**;40(6):739-53.
- Hammer DI**, Finklea JF, Hendricks RH, Shy CM, Horton RJ. Hair trace metal levels and environmental exposure. *Am J Epidemiol.* **1971**;93(2):84-92.
- Harkey MR**. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci Int.* **1993**;63(1-3):9-18.
- Hofman LF**. Human saliva as a diagnostic specimen. *J Nutr.* **2001**;131(5):1621S-5S.
- Horwitz W**, Kamps LR, Boyer KW. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *J Assoc Off Anal Chem.* **1980**;63(6):1344-54.
- Horwitz W**, Albert R. The concept of uncertainty as applied to chemical measurements. *Analyst.* **1997**;122(6):615-7.

Huestis MA, Cone EJ. Alternative testing matrices. Drug of Abuse Handbook. **1998**; 11:799-814.

ILAC-G12: Guidelines for the requirements for the competence of reference materials producers. The ILAC Secretariat, Rhodes, NSW, Australia, **2000**.

ILAC-G13: Guidelines for the requirements for the competence of providers of proficiency testing schemes. ILAC Proficiency Testing Consultative Group. The ILAC Secretariat, Rhodes, NSW, Australia, **2007**.

ISO 13528:2005. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons, ISO, Geneva, Switzerland, **2005a**.

ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO, Geneva, Switzerland, **2005b**.

ISO/IEC 17043:2010. Conformity assessment - General requirements for proficiency testing. ISO, Geneva, Switzerland, **2010**.

Jiménez C, Ventura R, de la Torre X, Segura J. Strategies for internal quality control in antidoping analyses. Anal Chim Acta. **2002**;460(2):289-307.

Jurado C, Giménez MP, Menéndez M, Repetto M. Simultaneous quantification of opiates, cocaine and cannabinoids in hair. Forensic Sci Int. **1995**;70(1-3):165-74.

Jurado C, Kintz P, Menéndez M, Repetto M. Influence of the cosmetic treatment of hair on drug testing. Int J Legal Med. **1997**;110(3):159-63.

Jurado C, Sachs H. Proficiency test for the analysis of hair for drugs of abuse, organized by the Society of Hair Testing. Forensic Sci Int. **2003**;133(1-2):175-8.

Jurado C, Soriano T, Giménez MP, Menéndez M. Diagnosis of chronic alcohol consumption. Hair analysis for ethyl-glucuronide. Forensic Sci Int. **2004**;145(2-3):161-6.

Jurado C. Hair Analysis for Cocaine. Analytical and practical aspects of drug testing in hair. **2007**;4:95-125.

Kacinko SL, Barnes AJ, Kim I, Moolchan ET, Wilson L, Cooper GA, Reid C, Baldwin D, Hand CW, Huestis MA. Performance characteristics of the Cozart RapiScan Oral Fluid Drug Testing System for opiates in comparison

to ELISA and GC/MS following controlled codeine administration. *Forensic Sci Int.* **2004**;141(1):41-8.

Kadehjan LJ. Specimens for Drugs-of-Abuse Testing. *Drugs of Abuse. Body Fluid Testing.* **2005**;2:11-28.

Kidwell DA, Holland JC, Athanaselis S. Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **1998**;713(1):111-35.

Kim I, Barnes AJ, Oyler JM, Schepers R, Joseph RE Jr, Cone EJ, Lafko D, Moolchan ET, Huestis MA. Plasma and oral fluid pharmacokinetics and pharmacodynamics after oral codeine administration. *Clin Chem.* **2002**;48(9):1486-96.

Kintz P, Mangin P. Simultaneous determination of opiates, cocaine and major metabolites of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Forensic Sci Int.* **1995**;73(2):93-100.

Kintz P. Interlaboratory comparison of quantitative determinations of drug in hair samples. *Forensic Sci Int.* **1995**; 70(1-3):105-9.

Kintz P ed. *Drug Testing in Hair.* CRC Press, Boca Raton, Florida, **1996.**

Kintz P, Cirimele V. Interlaboratory comparison of quantitative determination of amphetamine and related compounds in hair samples. *Forensic Sci Int.* **1997**;84(1-3): 151-6.

Kintz P, Cirimele V, Ludes B. Codeine testing in sweat and saliva with the Drugwipe. *Int J Legal Med.* **1998**;111(2):82-4.

Kintz P, Samyn N. Use of alternative specimens: drugs of abuse in saliva and doping agents in hair. *Ther Drug Monit.* **2002**;24(2):239-46.

Kintz P. Hair Analysis. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons.* **2004a**;8:124-133.

Kintz P. Value of hair analysis in postmortem toxicology. *Forensic Sci Int.* **2004b**;142(2-3):127-34.

Kintz P ed. *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair.* CRC Press, Boca Raton, Florida, **2007a.**

Kintz P. Bioanalytical procedures for detection of chemical agents in hair in the case of drug-facilitated crimes. *Anal Bioanal Chem.* **2007b**;388(7):1467-74.

- Klein J**, Karaskov T, Koren G. Clinical applications of hair testing for drugs of abuse-the Canadian experience. *Forensic Sci Int.* **2000**;107(1-3):281-8.
- Kopito L**, Byers RK, Shwachman H. Lead in hair of children with chronic lead poisoning. *N Engl J Med.* **1967**;276(17):949-53.
- Kronstrand R**, Scott K. Drug incorporation into hair. Analytical and practical aspects of drug testing in hair. **2007**;1:1-23.
- Kronstrand R**, Druid H. Drug Hair in Postmortem Toxicology. Analytical and practical aspects of drug testing in hair. **2007**;10:223-39.
- Kronstrand R**, Nyström I, Forsman M, Käll K. Hair analysis for drugs in driver's license regranting. A Swedish pilot study. *Forensic Sci Int.* **2010**;196(1-3):55-8.
- Langel K**, Engblom C, Pehrsson A, Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P. Drug testing in oral fluid-evaluation of sample collection devices. *J Anal Toxicol.* **2008**;32(6):393-401.
- Laloup M**, De Boeck G, Samyn N. Unconventional samples and alternative matrices. *Handbook of Analytical Separations* **2008**;20:653-97.
- Lillsunde P**. Analytical techniques for drug detection in oral fluid. *Ther Drug Monit.* **2008**;30(2):181-7.
- Lozano J**, García-Algar O, Vall O, de la Torre R, Scaravelli G, Pichini S. Biological matrices for the evaluation of in utero exposure to drugs of abuse. *Ther Drug Monit.* **2007**;29(6):711-34.
- Mangin P**, Kintz P. Variability of opiates concentrations in human hair according to their anatomical origin: head, axillary and pubic regions. *Forensic Sci Int.* **1993**;63(1-3):77-83.
- Miller JC**, Miller JN. *Estadística y quimiometría para química analítica.* Pearson Educación, Madrid, **2002**.
- Montagna M**, Stramesi C, Vignali C, Groppi A, Polettoni A. Simultaneous hair testing for opiates, cocaine, and metabolites by GC-MS: a survey of applicants for driving licenses with a history of drug use. *Forensic Sci Int.* **2000**;107(1-3):157-67.
- Montagna M**, Polettoni A, Stramesi C, Groppi A, Vignali C. Hair analysis for opiates, cocaine and metabolites. Evaluation of a method by interlaboratory comparison. *Forensic Sci Int.* **2002**;128(1-2):79-83.

Moolchan ET, Cone EJ, Wstadik A, Huestis MA, Preston KL. Cocaine and metabolite elimination patterns in chronic cocaine users during cessation: plasma and saliva analysis. *J Anal Toxicol.* **2000**;24(7):458-66.

Moore C, Vincent M, Rana S, Coulter C, Agrawal A, Soares J. Stability of Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC) in oral fluid using the Quantisal collection device. *Forensic Sci Int.* **2006**;164(2-3):126-30.

Moore C, Rana S, Coulter C. Simultaneous identification of 2-carboxy-tetrahydrocannabinol, tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol in oral fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **2007**;852(1-2):459-64.

Moore C. Oral fluid and hair in workplace drug testing programs: new technology for immunoassays. *Drug Test Anal.* **2011**;3(3):166-8.

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 Analyt Technol Biomed Life Sci.* **2002**;779(2):321-30.

Nakahara Y. Hair analysis for abused and therapeutic drugs. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **1999**;733(1-2):161-80.

Navarro M, Pichini S, Farré M, Ortuño J, Roset PN, Segura J, de la Torre R. Usefulness of saliva for measurement of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites: correlation with plasma drug concentrations and effect of salivary pH. *Clin Chem.* **2001**;47(10):1788-95.

Niedbala RS, Kardos K, Waga J, Fritch D, Yeager L, Doddamane S, Schoener E. Laboratory analysis of remotely collected oral fluid specimens for opiates by immunoassay. *J Anal Toxicol.* **2001a**;25(5):310-5.

Niedbala RS, Kardos KW, Fritch DF, Kardos S, Fries T, Waga J, Robb J, Cone EJ. Detection of marijuana use by oral fluid and urine analysis following single-dose administration of smoked and oral marijuana. *J Anal Toxicol.* **2001b**;25(5):289-303.

Pellegrini M, Rotolo MC, La Grutta S, Cibella F, Garcia-Algar O, Bacosi A, Cuttitta G, Pacifici R, Pichini S. Assessment of exposure to environmental tobacco smoke in young adolescents following implementation of smoke-free policy in Italy. *Forensic Sci Int.* **2010**;196(1-3):97-100.

- Pépin G**, Gaillard Y. Concordance between self-reported drug use and findings in hair about cocaine and heroin. *Forensic Sci Int.* **1997**;84(1-3):37-41.
- Petersen PH**, Ricós C, Stöckl D, Libeer JC, Baadenhuijsen H, Fraser C, Thienpont L. Proposed guidelines for the internal quality control of analytical results in the medical laboratory. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* **1996**;34(12):983-99.
- Pichini S**, Altieri I, Zuccaro P, Pacifici R. Drug monitoring in nonconventional biological fluids and matrices. *Clin Pharmacokinet.* **1996**;30(3):211-28.
- Pichini S**, Palmeri A, Pellegrini M, Zuccaro P, Pacifici R. Proposta di linee guida per l'analisi di farmaci e sostanze d'abuso nei capelli. Istituto Superiore di Sanità. Rapporti ISTISAN 99/24. **1999**, iv, 34 p.
- Pichini S**, Navarro M, Farré M, Ortuño J, Roset PN, Pacifici R, Zuccaro P, Segura J, de la Torre R. On-site testing of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in saliva with Drugwipe and Drugread: a controlled study in recreational users. *Clin Chem.* **2002**;48(1):174-6.
- Pichini S**, Garcia-Algar O, Muñoz L, Vall O, Pacifici R, Figueroa C, Pascual JA, Diaz D, Sunyer J. Assessment of chronic exposure to cigarette smoke and its change during pregnancy by segmental analysis of maternal hair nicotine. *J Expo Anal Environ Epidemiol.* **2003**;13(2):144-51.
- Pichini S**, Poudevida S, Pujadas M, Menoyo E, Pacifici R, Farré M, de la Torre R. Assessment of chronic exposure to MDMA in a group of consumers by segmental hair analysis. *Ther Drug Monit.* **2006**;28(1):106-9.
- Pichini S**, García-Algar O, de la Torre R. Clinical Applications of Hair Analysis. Analytical and practical aspects of drug testing in hair. **2007**;9:201-22.
- Pil K**, Verstraete A. Current developments in drug testing in oral fluid. *Ther Drug Monit.* **2008**;30(2):196-202.
- Pil K**, Esposito FM, Verstraete A. External quality assessment of multi-analyte chromatographic methods in oral fluid. *Clin Chim Acta.* **2010**;411(15-16):1041-5.
- Pötsch L**, Skopp G. Stability of opiates in hair fibers after exposure to cosmetic treatment. *Forensic Sci Int.* **1996**;81(2-3):95-102.

Pragst F, Spiegel K, Sporkert F, Bohnenkamp M. Are there possibilities for the detection of chronically elevated alcohol consumption by hair analysis? A report about the state of investigation. *Forensic Sci Int.* **2000**;107(1-3):201–23.

Pragst F, Balikova MA. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta.* **2006**;370(1-2):17-49.

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 Analyt Technol Biomed Life Sci.* **2003**;798(2):249-55.

Pujadas M, Pichini S, Civit E, Santamariña E, Perez K, de la Torre R. A simple and reliable procedure for the determination of psychoactive drugs in oral fluid by gas chromatography–mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* **2007**;44(2):594–601.

Quintela O, Bermejo AM, Taberero 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.* **2000**;107(1-3):273–9.

Raes E, Verstraete A, Wenning R. Drugs and driving. *Handbook of Analytical Separations.* **2008**;19:611-651.

Ricossa MC, Bernini M, de Ferrari F. Hair analysis for driving licence in cocaine and heroin users. An epidemiological study. *Forensic Sci Int.* **2000**;107(1-3), 301-8.

ROSITA. European Project Roadside Testing Assessment. Contract N° DG VII PL98-3032. (www.rosita.org).

Sachs H. Quality control by the Society of Hair Testing. *Forensic Sci. Int.* **1997**;84 (1-3):145–50.

SAMHSA (Substance Abuse and Mental Health Services Administration). United States Department of Health and Human Services. Proposed revisions to Mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs. *Federal Register* **2004**;69:19673–732. (www.samhsa.gov).

Samyn N, van Haeren C. On-site testing of saliva and sweat with Drugwipe and determination of concentrations of drugs of abuse in saliva, plasma and urine of suspected users. *Int J Legal Med.* **2000**;113(3):150-4.

Samyn N, De Boeck G, Verstraete AG. The use of oral fluid and sweat wipes for the detection of drugs of abuse in drivers. *J Forensic Sci.* **2002**;47(6):1380-7.

Samyn N, Laloup M, de Boeck G. Bioanalytical procedures for determination of drugs of abuse in oral fluid. *Anal Bioanal Chem.* **2007**;388(7):1437-53.

Schaffer M, Hill V, Cairns T. Hair analysis for cocaine: the requirement for effective wash procedures and effects of drug concentration and hair porosity in contamination and decontamination. *J Anal Toxicol.* **2005**;29(5):319-26.

Schaffer M, Hill V. Hair Analysis in Drugs-of-Abuse Testing. *Drugs of Abuse. Body Fluid Testing.* **2005**;11:177-200.

Scheidweiler KB, Huestis MA. Simultaneous quantification of opiates, cocaine, and metabolites in hair by LC-APCI-MS/MS. *Anal Chem.* **2004**;76(15):4358-63.

Segura J, Stramesi C, Redón A, Ventura M, Sanchez CJ, González G, San L, Montagna M. Immunological screening of drugs of abuse and gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of opiates and cocaine in hair. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **1999**;724(1):9-21.

Skopp G, Pötsch L, Moeller MR. On cosmetically treated hair--aspects and pitfalls of interpretation. *Forensic Sci Int.* **1997**;84(1-3):43-52.

Sniegowski LT, Welch MJ. Interlaboratory studies on the analysis of hair for drugs of abuse: results from the fourth exercise. *J Anal Toxicol.* **1996**;20(4):242-7.

SoHT (Society of Hair Testing). Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci Int.* **2004**;145(2-3):83-4.

Speedy T, Baldwin D, Jowett G, Gallina M, Jehanli A. Development and validation of the Cozart DDS oral fluid collection device. *Forensic Sci Int.* **2007**;170(2-3):117-20.

Spiehler V. Drugs in saliva. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons.* **2004**;7:109-123.

Spiehler V, Cooper G. Drugs-of-Abuse testing in saliva or oral fluid. *Drug testing in Alternate Biological Specimens.* **2008**;5:83-99.

Stramesi C, Polla M, Vignali C, Zucchella A, Groppi A. Segmental hair analysis in order to evaluate driving performance. *Forensic Sci Int.* **2008**;176(1):34-7.

Strano-Rossi S, Bermejo-Barrera A, Chiarotti M. Segmental hair analysis for cocaine and heroin abuse determination. *Forensic Sci. Int.* **1995**;70(1-3):211-6.

Tagliaro F, de Battisti Z, Lubli G, Neri C, Manetto G, Marigo M. Integrated use of hair analysis to investigate the physical fitness to obtain the driving licence: a casework study. *Forensic Sci. Int.* **1997**;84(1-3):129–35.

Thompson M, Ellison SLR, Wood R. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. *Pure Appl Chem.* **2006**;78(1): 145-96.

Tsatsakis A, Tutudaki M. Progress in pesticide and POPs hair analysis for the assessment of exposure. *Forensic Sci Int.* **2004**;145(2-3):195–9.

Verstraete AG, Pierce A. Workplace drug testing in Europe. *Forensic Sci Int.* **2001**;121(1-2):2-6.

Verstraete AG. Detection times of drugs of abuse in blood, urine, and oral fluid. *Ther Drug Monit.* **2004**;26(2):200-5.

Verstraete AG. Oral fluid testing for driving under the influence of drugs: history, recent progress and remaining challenges. *Forensic Sci Int.* **2005a**;150(2-3):143-50.

Verstraete AG. The results of the Roadside Drug Testins Assessment Project. *Drugs of Abuse. Body Fluid Testing.* **2005b**;17:271-292.

Walsh JM, de Gier JJ, Christopherson AS, Verstraete AG. Drugs and driving. *Traffic Inj Prev.* **2004**;5(3):241-53.

Walsh JM, Crouch DJ, Danaceau JP, Cangianelli L, Liddicoat L, Adkins R. Evaluation of ten oral fluid point-of-collection drug-testing devices. *J Anal Toxicol.* **2007**;31(1):44-54.

Walsh JM. New technology and new initiatives in U.S. workplace testing. *Forensic Sci Int.* **2008**;174(2-3):120-4.

Welch MJ, Sniegowski LT, Allgood CC, Habram M. Hair analysis for drugs of abuse: evaluation of analytical methods, environmental issues, and development of reference materials. *J Anal Toxicol.* **1993**;17(7):389-98.

Welp EA, Bosman I, Langendam MW, Totté M, Maes RA, van Ameijden EJ. Amount of self-reported illicit drug use compared to quantitative hair test results in community-recruited young drug users in Amsterdam. *Addiction*. **2003**;98(7):987-94.

Wennig R. Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Sci Int*. **2000**;107(1-3):5-12.

Wille SM, Raes E, Lillsunde P, Gunnar T, Laloup M, Samyn N, Christophersen AS, Moeller MR, Hammer KP, Verstraete AG. Relationship between oral fluid and blood concentrations of drugs of abuse in drivers suspected of driving under the influence of drugs. *Ther Drug Monit*. **2009**;31(4):511-9.

Wille SM, Ramírez-Fernandez M del M, Samyn N, De Boeck G. Conventional and alternative matrices for driving under the influence of cannabis: recent progress and remaining challenges. *Bioanalysis*. **2010**;2(4):791-806.

Wood M, Laloup M, Ramirez Fernandez M del M, 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*. **2005**;150(2-3):227-38.

Wylie FM, Torrance H, Anderson RA, Oliver JS. Drugs in oral fluid Part I. Validation of an analytical procedure for licit and illicit drugs in oral fluid. *Forensic Sci Int*. **2005a**;150(2-3):191-8.

Wylie FM, Torrance H, Seymour A, Buttress S, Oliver JS. Drugs in oral fluid Part II. Investigation of drugs in drivers. *Forensic Sci Int*. **2005b**;150(2-3):199-204.

CAPÍTOL 7

ANNEXOS

Annex 1

Pòster que es va presentar al “XXV Congreso Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular”. Bilbao. 2006.

S. Fernández Roig, M. Ventura, S. Pichini, R. de la Torre, J. Segura, R. Ventura.

Cuantificación de cocaína, benzoilecgonina, 6-monacetilmorfina, morfina, codeína, metadona y EDDP en saliva por cromatografía de gases/espectrometría de masas.



Cuantificación de cocaína, benzoilegonina, 6-monoacetilmorfina, morfina, codeína, metadona y EDDP en saliva por cromatografía de gases/espectrometría de masas



S. Fernández Roig^{1,2}, M. Ventura^{1,2}, S. Pichini³, R. De la Torre^{1,2}, J. Segura^{1,2}, R. Ventura^{1,2}

¹ Unitat de Recerca en Farmacologia, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona

² CEQS, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona

³ UDIMAS, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona

⁴ Drug Control and Evaluation Department, Istituto Superiore di Sanità, Roma

INTRODUCCIÓN

- Las matrices convencionales usadas para el análisis de drogas de abuso son la orina y la sangre, pero presentan algunas limitaciones. Las matrices alternativas, como la saliva, permiten solucionar algunos de estos problemas.
- La saliva presenta algunas ventajas: una fácil recogida de la muestra así como la correlación entre efecto farmacológico y concentración, que permite conocer si la persona está bajo los efectos de la droga en el momento de la recogida de la muestra.

- Los compuestos que se detectan en saliva, después de la administración de una droga se indican en la **Tabla 1**

Tabla 1

Compuestos en saliva	
Cocaína	Cocaína + Benzoilegonina+ Ecgonina metil ester
Heroina	Heroina + 6-monoacetilmorfina + morfina
Morfina	Morfina
Codeína	Codeína
Metadona	Metadona + EDDP

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de muestras

Volumen de saliva	1 mL
ISTD	Estándares internos deuterados
Extracción	ESL Bond-Elut Certify™
pH	pH 8,0, tampón fosfato
Elución	CHCl ₃ /2-propanol (80:20 v/v), 2% NH ₃
Extractos secos	
Cocaína y opiáceos	Derivatización BSTFA/TMCS 30 min 60°C
Metadona/EDDP	Reconstitución con metanol

Análisis instrumental

Instrumento	CGEM Serie II 5800A, inyector automático 7873A, detector de masas 5970 (Hewlett-Packard)
Columna	Capilar 5% fenilmetilsilicona 12 m x 0.2 mm x 0.33 µm
Inyección	Splitless
Volumen de muestra	2 µl
Gas portador	Helio (1 ml/min)
Tª del inyector	280°C
Programa Tª	Tª inicial = 100°C 20°C/min Tª final = 290°C Tiempo final = 5 min Tiempo total = 14.5 minutos
Modo de ionización	El. 70eV
Tipo de adquisición	SIM (ver iones monitorizados en Tabla 2)

OBJETIVOS

- Desarrollo y validación de métodos de análisis para la cuantificación de drogas de abuso en saliva utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CGEM).
- Los compuestos objetivo del estudio son opiáceos (morfina, codeína, 6-monoacetilmorfina), cocaína y metabolito (benzoilegonina), metadona y metabolito (EDDP).
- Utilización de los métodos desarrollados para el análisis de muestras obtenidas después de la administración de codeína en voluntarios sanos y para el análisis de muestras procedentes de consumidores habituales de drogas.

Protocolo de validación

- La validación del método constó de 4 ensayos en que se evaluaron los siguientes parámetros: intervalo de linealidad, idoneidad de la precisión y de la exactitud, límite de detección y de cuantificación, recuperación, precisión intra-ensayo y inter-ensayo, exactitud intra-ensayo y inter-ensayo.

Muestras analizadas

- Saliva procedente de voluntarios sanos no consumidores de drogas
- Saliva de voluntarios sanos (n=2) después de la administración oral de 30 mg de codeína, recogida a distintos tiempos: 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 24 horas.
- Saliva de pacientes toxicómanos en tratamiento, de la Unidad de Toxicomanía de l'Hospital del Mar, después de haber consumido cocaína, heroína y/o metadona.

RESULTADOS

Tabla 2. Análisis estudiados: a) Cocaína y opiáceos, b) Metadona y EDDP

Compuesto	Abundancia	Deflexión	m/z	Relación parentera	Relación hijera
Cocaína					
COE	100	100	152	100	100
DE	100	240	281	240	240
MORF	85	401	438	438	438
Codeína	83	178	371	371	371
6-monoacetilmorfina					
6-MAC	72	30	336	336	336
6-MAC-d3	75	241	241	241	241
6-MAC-d3	89	432	432	432	432
6-MAC-d3	83	374	374	374	374
Benzoilegonina					
BE	100	100	100	100	100
Metadona					
MET	100	100	100	100	100
EDDP					
EDDP	100	100	100	100	100

Figura 1. Estructuras de los derivados de los analitos analizados

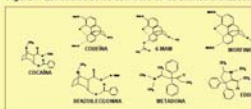


Figura 2. Cromatograma de una muestra de control



Tabla 3. Resultados de la validación cuantitativa

Compuesto	Concentración (ng/ml)	Area	Retención (min)	Coeficiente de correlación
Cocaine				
COE	10	2.1	2.1	0.99
DE	10	2.2	4.4	0.99
MORF	10	2.3	3.8	0.98
Codeína	10	2.4	3.4	0.97
6-monoacetilmorfina				
6-MAC	10	2.5	3.4	0.97
6-MAC-d3	10	2.6	3.4	0.97
6-MAC-d3	10	2.7	3.4	0.97
6-MAC-d3	10	2.8	3.4	0.97
Benzoilegonina				
BE	10	2.9	3.4	0.97
Metadona				
MET	10	3.0	3.4	0.97
EDDP				
EDDP	10	3.1	3.4	0.97

Tabla 4. Resultados de muestras obtenidas tras la administración de cocaína en distintos momentos

Muestra	Dosis (mg)	Tiempo (h)	COE (ng/ml)	BE (ng/ml)
1	3000	0h	100	23.2
2	3000	2h	80.8	128.4*
3	3000	4h	52.5	21.1
4	3000	6h	28.3	20.8
5	3000	8h	19.8	31.1
6	3000	24h	2.8	28.6

Tabla 5. Resultados de muestras obtenidas tras la administración de heroína

Muestra	Dosis (mg)	Tiempo (h)	6-MAC (ng/ml)	MORF (ng/ml)	Codeína (ng/ml)
1	250	2h	5.8	131.2	53.3
2	250	4h	10.8	161.7	110.7
3	250	6h	6.7	12.2	-
4	250	8h	3.4	10.8	33.4

Tabla 6. Resultados de muestras obtenidas tras la administración de metadona

Muestra	Dosis (mg)	Tiempo (h)	MET (ng/ml)	EDDP (ng/ml)
1	30	0h	2314**	25.3
2	30	2h	182.1*	7.7
3	30	4h	267.2**	17.8
4	30	6h	153.2**	14.8

* Datos obtenidos tras la administración de la dosis.

** Datos obtenidos tras la administración de la dosis.

- En la **Tabla 2** y en la **Figura 1** se presentan los compuestos analizados así como los derivados formados, los iones utilizados para la identificación y cuantificación y los tiempos de retención (TR) para cada uno de los compuestos.

- En la **Figura 2** se presenta el cromatograma de una muestra de control que contenía todos los compuestos objetivos del estudio.

- En la **Tabla 3** se presentan los resultados obtenidos en los ensayos de validación del procedimiento.

- La **Figura 3** muestra los resultados obtenidos después de la administración de codeína a voluntarios sanos. La concentración de codeína fue máxima una hora después de la administración y decreció, no detectándose en las salivas recogidas a las 24 h. La morfina no se detectó en ningún tiempo de los analizados.

- Los resultados obtenidos de las muestras procedentes de los pacientes de la Unidad de Toxicomanía de l'Hospital del Mar se presentan en las **Tablas 4, 5, y 6**. Se detectaron todas las drogas que los pacientes declararon haber consumido, excepto en un caso en el que se encontró cocaína cuando el paciente no había informado haberla consumido.

AGRADECIMIENTOS

- Los autores agradecen la colaboración del Dr. Miquel Farré de la Unidad de Farmacología por la realización del estudio de cocaína, y a la Dra. María Teresa y a la Dra. Francisca Ferrerías por proporcionar los muestras de saliva de los pacientes de la Unidad de Toxicomanía de l'Hospital del Mar.

REFERENCIAS

- Federal Register. Department of Health and Human Services. Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA).
- Wong WJ, Casero MG, Cole EJ. Simultaneous assay of cocaine, heroin and metabolites in hair plasma, saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Appl. 1995;735:179-205.
- Yoshida CA, Hester JC, Albanowski S. Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. J Chromatogr B Biomed Appl. August 1995;733(1):171-175.

Annex 2

Dades addicionals del treball:

Ventura M, Pichini S, Ventura R, Zuccaro P, Pacifici R, de la Torre R. Stability Studies of Principal Illicit Drugs in Oral Fluid: Preparation of Reference Materials for External Quality Assessment Schemes. Ther Drug Monit. 2007;29(5):662-665.

Taula 7.1. Resultats obtinguts per a amfetamina, metamfetamina, MDMA, MDA, cocaïna, benzoilecgonina, 6-monoacetil morfina (6MAM), morfina i codeïna en fluid oral després de conservar-lo durant 3 i 7 dies a 37°C. Mitjana i desviació estàndard (SD) de les concentracions de les 5 alíquotes guardades a cada condició de temps i temperatura. S'inclouen els percentatges de canvi (% canvi) respecte a les alíquotes guardades a -20°C.

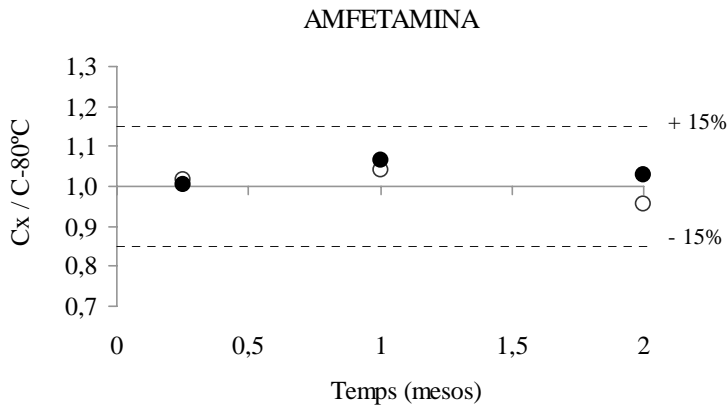
	-20°C	37°C – Dia 3		37°C – Dia 7	
	mitjana ± SD	mitjana ± SD	%canvi	mitjana ± SD	%canvi
Amfetamina	328.7 ± 5.1	326.5 ± 10.2	-0.7	321.0 ± 7.5	-2.3
Metamfetamina	295.1 ± 5.0	291.7 ± 4.1	-1.2	291.5 ± 3.9	-1.2
MDMA	322.7 ± 6.6	326.6 ± 3.4	1.2	323.3 ± 4.3	0.2
MDA	302.5 ± 8.6	305.9 ± 9.1	1.1	304.4 ± 11.8	0.6
Cocaïna	321.0 ± 7.7	63.6 ± 25.8	-80.2	0.9 ± 0.5	-99.7
Benzoilecgonina	236.7 ± 2.1	233.5 ± 1.9	-1.4	230.5 ± 1.7	-2.6
6MAM	262.3 ± 5.7	165.1 ± 39.5	-37.1	48.1 ± 43.2	-81.7
Morfina	304.7 ± 6.8	296.1 ± 3.8	-2.8	305.1 ± 3.0	0.1
Codeïna	303.6 ± 8.1	301.4 ± 9.3	-0.7	304.6 ± 1.2	0.3

Taula 7.2. Resultats obtinguts per a amfetamina, metamfetamina, MDMA, MDA, cocaïna, benzoilecgonina, 6-monoacetil morfina (6MAM), morfina i codeïna en fluid oral després de conservar-lo durant 7 dies a 25°C. Mitjana i desviació estàndard (SD) de les concentracions de les 5 alíquotes guardades a cada condició de temps i temperatura. S'inclouen els percentatges de canvi (% canvi) respecte a les alíquotes guardades a -20°C.

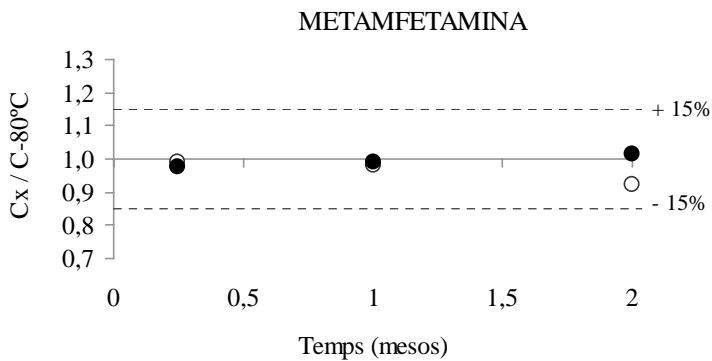
	-20°C	25°C – Dia 7	
	mitjana ± SD	mitjana ± SD	%canvi
Amfetamina	328.7 ± 5.1	323.7 ± 10.1	-1.5
Metamfetamina	295.1 ± 5.0	295.8 ± 7.4	0.2
MDMA	322.7 ± 6.6	325.0 ± 11.4	0.7
MDA	302.5 ± 8.6	303.4 ± 15.8	0.3
Cocaïna	321.0 ± 7.7	108.1 ± 57.7	-66.3
Benzoilecgonina	236.7 ± 2.1	232.5 ± 7.1	-1.8
6MAM	262.3 ± 5.7	207.9 ± 26.1	-20.7
Morfina	304.7 ± 6.8	292.7 ± 7.5	-3.9
Codeïna	303.6 ± 8.1	312.4 ± 7.7	2.9

Figura 7.1. Estabilitat a llarg termini d'amfetamina, metamfetamina, MDMA i MDA en fluid oral. Es presenten les relacions entre la mitjana de les concentracions (n=5) obtingudes a diferents condicions de conservació (Cx) i la mitjana dels valors de concentració (n=5) de les alíquotes guardades a -80°C. (○ 4°C, ● -20°C)

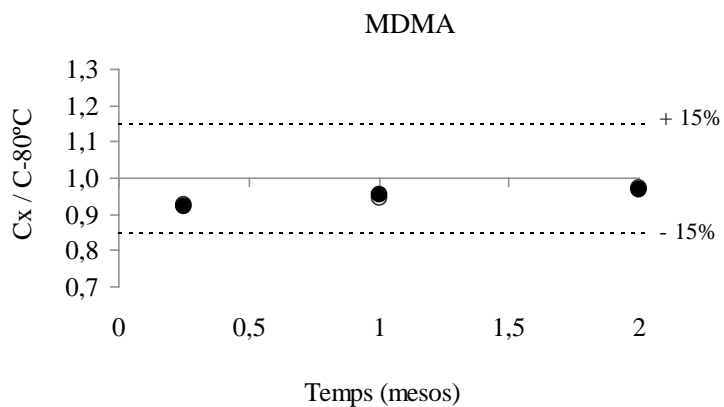
a) Amfetamina



b) Metamfetamina



c) 3,4-metilendioximetamfetamina (MDMA)



d) 3,4-metilendioxiamfetamina (MDA)

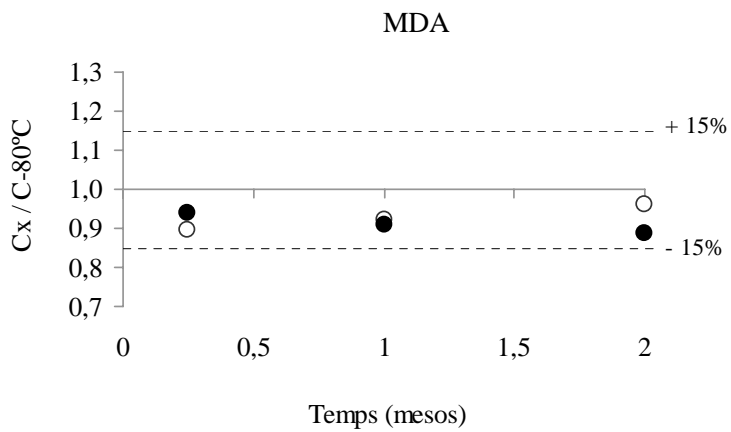
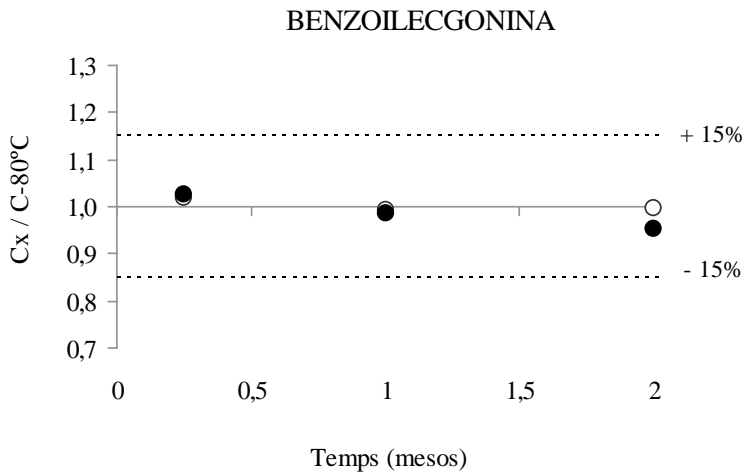
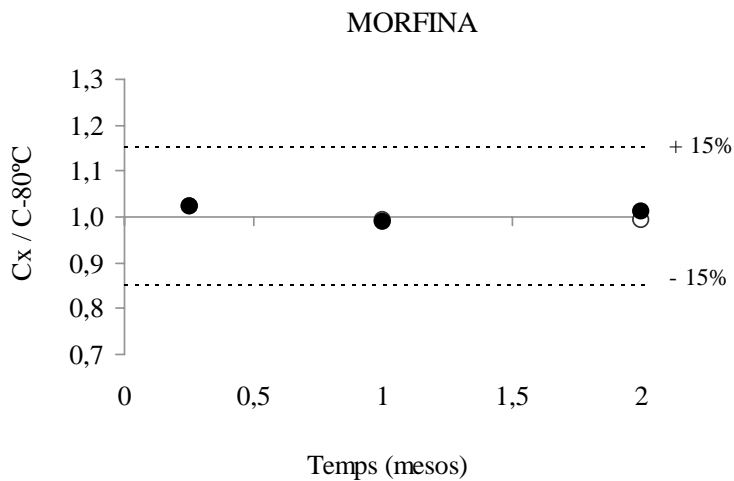


Figura 7.2. Estabilitat a llarg termini de benzoilecgonina, morfina i codeïna en fluid oral. Es presenten les relacions entre la mitjana de les concentracions ($n=5$) obtingudes a diferents condicions de conservació (C_x) i la mitjana dels valors de concentració ($n=5$) de les alïquotes guardades a -80°C . (\circ 4°C , \bullet -20°C)

a) Benzoilecgonina



b) Morfina



c) Codeïna

