



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ANA CAROLINA FURIOZO ARANTES

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE  
QUANTITATIVA DE ANTIDEPRESSIVOS, BENZODIAZEPÍNICOS E OPIOIDES EM  
FLUIDO ORAL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL

*DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD TO ANALYZE  
ANTIDEPRESSANTS, BENZODIAZEPINES AND OPIOIDS IN ORAL FLUID  
SAMPLES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY*

CAMPINAS

2020

ANA CAROLINA FURIOZO ARANTES

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE  
QUANTITATIVA DE ANTIDEPRESSIVOS, BENZODIAZEPÍNICOS E OPIOIDES EM  
FLUIDO ORAL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL

*DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD TO ANALYZE  
ANTIDEPRESSANTS, BENZODIAZEPINES AND OPIOIDS IN ORAL FLUID  
SAMPLES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Farmacologia.

Dissertation presented to the Faculty of Medical Sciences,  
University of Campinas, in partial fulfillment of the requirements  
for the Master degree in Pharmacology.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Luiz da Costa

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA ANA CAROLINA FURIOZO ARANTES, E ORIENTADA  
PELO PROF. DR. JOSÉ LUIZ DA COSTA.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Ar14d Arantes, Ana Carolina Furiozo, 1996-  
Desenvolvimento e validação de método para análise quantitativa de antidepressivos, benzodiazepínicos e opioides em fluido oral por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial / Ana Carolina Furiozo Arantes. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: José Luiz da Costa.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Saliva. 2. Toxicologia. 3. LC-MS/MS. 4. Espectrometria de massas. 5. Antidepressivos. 6. Opióides. 7. Benzodiazepinas. I. Costa, José Luiz da, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Informações para Biblioteca Digital**

**Título em outro idioma:** Development and validation of analytical method to analyze antidepressants, benzodiazepines and opioids in oral fluid samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry

**Palavras-chave em inglês:**

Saliva

Toxicology

LC-MS/MS

Mass spectrometry

Antidepressants

Opioids

Benzodiazepines

**Área de concentração:** Farmacologia

**Titulação:** Mestra em Farmacologia

**Banca examinadora:**

José Luiz da Costa [Orientador]

Bruno Spinosa De Martinis

Mauricio Yonamine

**Data de defesa:** 18-09-2020

**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-9848-4174>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1795754895384292>

# COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ANA CAROLINA FURIOZO ARANTES

---

**ORIENTADOR:** PROF. DR. JOSÉ LUIZ DA COSTA

---

## MEMBROS TITULARES:

1. Prof. Dr. José Luiz da Costa
  2. Prof. Dr. Maurício Yonamine
  3. Prof. Dr. Bruno Spinosa de Martinis
- 

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

**Data de Defesa: 18/09/2020**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Nilda e José, e minha irmã, Vitória, por entenderem minhas ausências em virtude da realização deste trabalho, ficando sempre ao meu lado e me dando todo suporte e amor que precisei.

À minha namorada, Marília, que por muitas e muitas vezes segurou minhas mãos, enxugou minhas lágrimas e me disse que tudo daria certo. Por ter sido meu porto seguro, auxílio para todas as horas, por me cuidar e me amar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Luiz da Costa, por todo conhecimento, confiança e carinho que teve comigo durante esse tempo. Bem como todo ensinamento e exemplo que pude ter de você, como professor, orientador e amigo.

Ao MSc Rafael Lanaro, que me apresentou a ciência a qual tenho paixão, a Toxicologia. Além de me frequentemente me co-orientar, me dar suporte e auxílio. Aprendi e aprendo muito com você, um grande exemplo.

Ao meu grupo de laboratório, Kelly, Taís, Marília, Ana C., Aline, Izabelly, Mariana, Leonardo, Kauê, Júlia, Letícia e João pelas risadas e momentos divertidos que nunca vou esquecer. Por tornar o trabalho mais leve e divertido.

Aos demais funcionários e colegas do Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Campinas (CIATox), Paula, Carla, Adriana, Márcia, por todo suporte me concedido durante o período de realização deste trabalho.

Às minhas amigas, Ana Luísa, Fernanda, Taísa, Bianca, Maria C., Laura, Loren, por me acompanharem nessa caminhada, por serem companhia para todas as horas, boas ou ruins. Amo vocês. Obrigada por tudo que compartilhamos juntas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

O fluido oral é a matriz biológica que surge como alternativa ao emprego de sangue e derivados. Dentre as vantagens do emprego desta matriz, estão a facilidade de coleta (não invasiva e pode ser realizada sob observação), difícil adulteração, fácil análise (quando comparada ao plasma, por exemplo) e a considerável correlação que pode ser traçada entre as concentrações salivares e plasmáticas de um fármaco. A validação é o ato de realizar ensaios experimentais visando evidenciar que o método funciona dentro de suas condições esperadas de emprego. No presente trabalho, um método foi desenvolvido, validado e aplicado na análise de amostras de fluido oral coletadas de voluntários presentes em festas de curta ou longa duração (festas de música eletrônica). O método permitiu a análise de 50 substâncias das classes dos antidepressivos, benzodiazepínicos e opioides. As amostras foram coletadas com o dispositivo de coleta Quantisal™ e extraídas empregando extração líquido-líquido com éter metil-terc-butílico, sendo posteriormente analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial. Durante a validação o método atendeu os critérios recomendados internacionalmente, apresentando limites inferiores de quantificação na ordem de 0,5 e 1,0 ng/mL e linearidade de 0,5 à 50,0 ng/mL para antidepressivos, de 0,5 à 25,0 ng/mL para benzodiazepínicos e 1,0 à 50,0 ng/mL para opioides. Os valores de inexatidão e imprecisão foram melhores que 16% e 20%, respectivamente, e os valores de efeitos matriz melhores que 25%. Nenhuma evidência de contaminação cruzada (*carryover*), interferência endógena ou exógena (considerando fármacos e drogas de abuso comuns no país) foi observada. Estudos de estabilidade demonstraram que quase todos os analitos foram estáveis à -20 °C por 60 dias (exceto por 7-aminoclonazepam, 7-aminoflunitrazepam, lorazepam, nordiazepam, naloxona, naltrexona e norsertralina), à 4 °C por 7 dias (exceto por nordiazepam, metadona e naltrexona) e à temperatura ambiente (25 °C) por 3 dias (exceto por sertralina e flunitrazepam). Em ciclos de congelamento e descongelamento, a grande maioria dos antidepressivos e opioides foram considerados estáveis, diferentemente foi observado para os benzodiazepínicos. A estabilidade pós processamento (em amostrador automático à 10 °C) garantiu estabilidade por 24 horas para todos os analitos empregados no método, exceto nitrazepam, 7-aminoclonazepam e 7-aminoflunitrazepam (estáveis por até 18 horas). Foram analisadas 38 amostras de fluido oral dentre elas, 13 foram positivas para 2

dos analitos investigados, 10 apresentaram apenas 1 analito e 1 amostra mostrou positividade para 5 analitos. O citalopram foi a substância mais comumente encontrada ( $n = 10$  amostras, 26,3%), com concentrações entre 1,4 e 150 ng/mL, seguido da venlafaxina ( $n = 9$  amostras, 23,7%) com concentrações entre 0,6 e > 500 ng/mL. Das 38 amostras, 4 possuíam bupropiona (10,5%) e 7 possuíam seu produto de biotransformação, hidroxibupropiona (18,4%) com concentrações entre 1,2-334 e 0,6-189 ng/mL, respectivamente. Clomipramina, duloxetina, mirtazapina, paroxetina e zolpidem foram encontradas em apenas 1 amostra positiva cada, com concentrações entre 0,5-14,1 ng/mL. Em conclusão, o método foi desenvolvido e validado seguindo parâmetros recomendados internacionalmente para 50 substâncias, além de ter sido aplicado para análise de amostras de fluido oral coletadas de voluntários em festas de curta ou longa duração.

Palavras-chave: Saliva; Toxicologia; LC-MS/MS; Espectrometria de massas; Antidepressivos; Opióides; Benzodiazepinas.

## ABSTRACT

Oral fluid is the biological matrix applied as alternative to the use of blood and its derivatives. Among the advantages of using this matrix are the ease of collection (non-invasive and can be performed under observation), difficult adulteration, easier analysis (when compared to plasma, for example) and the correlation between drug salivary and plasma concentrations. Method validation is the act of carrying out experimental tests in order to show that the method works within its expected conditions of employment. In the present work, a method was developed, validated and applied to the analysis of authentic oral fluid samples collected from volunteers attending university parties or electronic music festivals. The method allowed the analysis of 50 substances among antidepressants, benzodiazepines and opioids. The samples were collected using Quantisal™ collector device, extracted using liquid-liquid extraction with MTBE, and then analyzed using liquid chromatography tandem mass spectrometry. During validation, the developed method fulfilled internationally recommended criteria, with lower limits of quantification of 0.5 and 1.0 ng/mL and linearity within 0.5-50.0 and 1.0-50.0 ng/mL for antidepressants, 0.5-25.0 ng/mL for benzodiazepines and 1.0-50.0 ng/mL for opioids. Bias and imprecision values were better than 16% and 20%, respectively and matrix effects, better than 25%. Neither evidence of carryover nor endogenous and exogenous (considering most common pharmaceuticals and drugs of abuse) interference were found. Stability studies showed that almost all analytes were stable at -20 °C for 60 days (except for 7-aminoclonazepam, 7-aminoflunitrazepam, lorazepam, nordiazepam, naloxone, naltrexone and nortriptyline); at 4 °C for 7 days (except for nordiazepam, methadone and naltrexone) and at room temperature (25 °C) for 3 days (except for sertraline and flunitrazepam). In freeze and thaw cycles, almost all antidepressants and opioids were considered stable, but differently was seen for benzodiazepines. Processed sample stability (in auto sampler at 10 °C) guaranteed 24 hours stability for all analytes used in the method, except nitrazepam, 7-aminoclonazepam and 7-aminoflunitrazepam (stable for 18 hours). Thirty-eight authentic oral fluid samples were analyzed, among them, 13 were positive for 2 of the investigated analytes, 10 for only 1 analyte and 1 sample showed positivity for 5 analytes. Citalopram was the most found substance ( $n = 10$  samples, 26.3%), with concentrations within 1.4 to 150 ng/mL, followed by venlafaxine ( $n = 9$  samples, 23.7%) with concentrations between 0.6 to > 500 ng/ml.



Among 38 samples, 4 had bupropion (10.5%) and 7 had their metabolite, hydroxybupropion (18.4%) with concentrations between 1.2-334 and 0.6-189 ng/mL, respectively. Clomipramine, duloxetine, mirtazapine, paroxetine and zolpidem were found in only 1 positive sample each, with concentrations between 0.5-14.1 ng/mL. In conclusion, the method was validated following internationally recommended guidelines for 50 substances and applied analyzing authentic oral fluid samples collected from volunteers at parties and electronic music festivals.

Keywords: Saliva; LC-MS/MS; Mass spectrometry; Antidepressants; Opioids; Benzodiazepines.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**11-OH-THC** – 11-Hidroxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocanabinol

**DMT** – dimetiltriptamina

**GABA** – Ácido gama-aminobutírico (do inglês, *gamma-Aminobutyric acid*)

**LC-MS/MS** – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (do inglês, *liquid chromatography tandem mass spectrometry*)

**LSD** – dietilamida do ácido lisérgico (do alemão, *Lysergsäurediethylamid*)

**mCPP** – meta-clorofenilpiperazina

**MDA** – 3,4-metilenodioxianfetamina

**MDEA** – 3,4-metilenodioxi-N-etilanfetamina

**MDMA** – 3,4-metilenodioximetanfetamina

**MRM** – modo de reações múltiplas (do inglês, *multiple reaction monitoring*)

**MTBE** – Éter metil-terc-butílico (do inglês, *Methyl tert-butyl ether*)

**pCPP** – para-clorofenilpiperazina

**pKa** – Constante de acidez

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SWGTOX** – Grupo de Trabalho Científico para Toxicologia Forense (do inglês, *Scientific Working Group for Forensic Toxicology*)

**TFMPP** – 3- trifluorometilfenilpiperazina

**THC** –  $\Delta^9$ -tetrahydrocanabinol

**THC-COOH** – 11-Nor-9-carboxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocanabinol

**THH** – tetrahydroharmina

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1.	Objetivo geral.....	16
2.2.	Objetivos específicos.....	16
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODO.....</b>	<b>17</b>
3.1.	Reagentes.....	17
3.2.	Calibradores, controles e padrões internos.....	17
3.3.	Preparo de amostras adicionadas (calibradores e controles).....	18
3.4.	Amostras reais.....	18
3.5.	Preparo da amostra.....	19
3.6.	Parâmetros instrumentais.....	19
3.7.	Desenvolvimento do método.....	20
3.8.	Validação do método.....	21
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Na realização das análises toxicológicas, o sangue (ou seus derivados: soro e plasma) é o fluido biológico mais utilizado, pois os níveis sanguíneos de um fármaco geralmente possuem relação direta com os efeitos causados no organismo. Contudo, a coleta de amostras de sangue requer cuidados especiais, como ambiente asséptico e profissional especializado para punção venosa, a fim de minimizar riscos à saúde do paciente em função da coleta (1).

Como alternativa ao emprego do sangue, surge o fluido oral. Essa matriz biológica possui como principal vantagem a facilidade de coleta, que não é invasiva e pode ser realizada sob observação sem que haja constrangimento do paciente – característica é fundamental para viabilizar a coleta da amostra em situações de campo, como em festas e blitz de trânsito (2–4). Outra vantagem importante no uso do fluido oral em análises toxicológicas é a correlação que pode ser traçada entre as concentrações salivares e plasmáticas de um fármaco. Esta correlação permite, por exemplo, o uso do fluido oral em estudo de farmacocinética e em análises forenses e de emergência, por permitir correlacionar as concentrações obtidas com alterações comportamentais que possam eventualmente ser causadas pelo toxicante encontrado nesse fluido (5).

A passagem de fármacos da corrente sanguínea para a saliva (e conseqüentemente para o fluido oral) já havia sido sugerida desde a segunda metade da década de 1960 (6,7). Mesmo assim, a utilização desta como matriz biológica só veio aumentar significativamente na última década, principalmente em estudos de farmacocinética, monitorização terapêutica e na verificação do uso de drogas ilícitas (4,8–11).

A transferência de substâncias do sangue para o fluido oral normalmente acontece por difusão passiva pelas membranas celulares dos capilares sanguíneos. Entretanto, esse mecanismo limita-se a moléculas não ionizadas, não ligadas e de peso molecular inferior à 500 Da. Outras moléculas podem atravessar a membrana de diferentes formas, através de transporte ativo, por exemplo (12,13). Alguns dos fatores que podem influenciar essa passagem são: o pH do sangue e do fluido oral, o pKa, peso molecular, configuração espacial da molécula, taxa de ligação às proteínas plasmáticas e lipossolubilidade (12).

O fluido oral é composto principalmente por saliva, que contém 99% água, 0,7% proteínas (principalmente amilase) e 0,26% mucinas (13). A saliva origina-se das glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual), das glândulas salivares menores (presentes na língua, mucosa dos lábios e palato), e dos fluidos crevicular (gengiva) e da nasofaringe. Quando mecanicamente estimulada, a produção de saliva acontece principalmente pela parótida, conferindo uma característica mais serosa, rica em amilase e outras proteínas. Entretanto, quando não estimulada, a saliva possui uma característica mista (mucoserosa) e sua produção acontece principalmente na glândula submandibular (13,14).

Dentre as classes de fármacos empregadas nesse trabalho estão os benzodiazepínicos. Os fármacos dessa classe são agonistas seletivos dos receptores GABA presentes no Sistema Nervoso Central (SNC), sendo responsáveis por estimular a ligação do neurotransmissor inibitório  $\gamma$ -aminobutírico aos seus receptores endógenos do subtipo GABAA, potencializando os efeitos desse neurotransmissor (15).

Azevedo *et al.* (2016) observaram que alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam e lorazepam foram os benzodiazepínicos mais prescritos no Brasil entre 2010 e 2012 (16). Nos Estados Unidos, entre 1996 e 2013, a porcentagem de prescrições contendo benzodiazepínicos saltou de 4,1% para 5,6%. De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*), em 2018, 10.734 mortes envolviam benzodiazepínicos (17). Além disso, o número de prescrições contendo pelo menos 1 benzodiazepínico cresceu 67% entre 1996 e 2013, bem como a taxa de mortalidade por overdose envolvendo essa classe de fármacos passou de 0,58 para 3,07 (17,18).

Os opioides, assim como os benzodiazepínicos, são uma classe de medicamentos cuja prescrição em excesso tem sido considerada um problema de saúde pública. Em 2015 foram dispensadas 240 milhões de receitas contendo opioides apenas nos Estados Unidos, quase 1 prescrição para cada adulto na população geral (19). Como consequência, aproximadamente 90 americanos morrem por overdose todos os dias, passando de 33 mil mortes ao ano, ocasionadas por opioides prescritos e usados ilegalmente (20–22).

A classe farmacológica dos opioides é composta por substâncias psicoativas com ação analgésica, produzida pela interação destas substâncias com

receptores opioides ( $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ ) presentes no sistema nervoso. Os principais representantes deste grupo são a morfina e a codeína, substâncias de origem natural presentes no extrato do ópio (15). Entre os opioides sintéticos, destacam-se a meperidina, metadona, fentanil e seus análogos.

Os antidepressivos são medicamentos que ajudam na redução de sintomas dos transtornos depressivos pela alteração dos níveis de neurotransmissores, como serotonina, dopamina e noradrenalina nas fendas sinápticas dos neurônios. Dados de 27 países europeus mostram que a prevalência de 12 meses de uso dos antidepressivos é o dobro que o previsto em 2000, refletindo uma duplicação nas taxas de prescrição desses fármacos. Além disso, uma variação bem ampla entre taxas de uso desses fármacos foi reportada, reiterando que os países que investem mais em saúde possuem maior porcentagem de usuários regulares dessa classe de fármacos (23).

Nos Estados Unidos, o consumo de antidepressivos quase duplicou entre os anos de 1999 e 2014, emplacando esta classe dentre as três mais consumidas por toda a população (24). Este alto consumo reflete muitas vezes na prescrição *off-label* por parte dos médicos prescritores, com indicação de uso do fármaco sem embasamento científico, sendo os tricíclicos os mais empregados para tal finalidade (25).

Considerando a intensa prescrição, dispensação e uso das três classes de fármacos descritas, o emprego de técnicas para análise quantitativa tem sido amplamente difundido e vem ganhando certa importância, seja no monitoramento terapêutico (26–29), para estabelecer padrões de consumo (30,31) ou até mesmo identificar condutores de veículos sob efeito dessa classe de substâncias (32–34). Entretanto, necessita-se de mais estudos de administração controlada desses fármacos e métodos cada vez mais sensíveis que possibilitem essa quantificação permitindo a aplicação do emprego de fluido oral rotineiramente em hospitais e centros de saúde.

A validação é o ato de realizar ensaios experimentais visando evidenciar que o método funciona dentro de suas condições esperadas de emprego (35,36). Esse processo é essencial pois garante a efetividade do método em atender os requisitos específicos para seu uso, produzindo resultados confiáveis e precisos, além

de ser considerado um importante aspecto da garantia da qualidade de um laboratório (37–39).

Métodos previamente validados são empregados em inúmeros laboratórios ao redor do mundo e para diversas aplicações, seja para medir a qualidade da água potável ou dos alimentos, para auxiliar no diagnóstico, prevenção e tratamento na área da saúde e até mesmo para análises forenses em fluidos biológicos (40).

Alguns testes importantes que são realizados durante a validação são: precisão, exatidão, seletividade, limites de detecção e quantificação, recuperação, efeito matriz, estabilidade, dentre outros. Sendo alguns obrigatórios para certos guias e outros não (35,37,40).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é desenvolver e validar um método quantitativo para análise de fármacos antidepressivos, benzodiazepínicos e opioides em fluido oral por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

### 2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método analítico baseado em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial para análise de antidepressivos e seus produtos de biotransformação (amitriptilina, bupropiona, citalopram, clomipramina, desipramina, desmetilcitalopram, desmetilvenlafaxina, doxepina, duloxetina, fluoxetina, hidroxibupropiona, imipramina, mirtazapina, norfluoxetina, nortriptilina, nortriptilina, paroxetina, sertralina, trazodona, trimipramina e venlafaxina), benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação (alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam, flunitrazepam, lorazepam, midazolam, nitrazepam, nordiazepam, oxazepam, temazepam, zolpidem, 7-aminoclonazepam e 7-aminoflunitrazepam) e opioides e seus produtos de biotransformação (buprenorfina, codeína, fentanil, hidrocodona, hidromorfona, meperidina, metadona, morfina, naloxona, naltrexona, N-desmetil-tramadol, oxicodona, oximorfona e tramadol) em amostras de fluido oral;
- Aplicar o método desenvolvido na análise de amostras de fluido oral coletadas de participantes presentes em festas de curta ou longa duração (festas de música eletrônica).



### 3. MATERIAIS E MÉTODO

#### 3.1. Reagentes

Padrões analíticos certificados de amitriptilina, bupropiona, citalopram, desipramina, desmetilcitalopram, duloxetina, fluoxetina, imipramina, mirtazapina, nortriptilina, paroxetina, sertralina e trazodona foram adquiridos da LGC Standards (Teddington, Londres, Reino Unido), e de clomipramina, desmetilvenlafaxina, doxepina, hydroxibupropiona, norfluoxetina, norsertralina, trimipramina, venlafaxina, 7-aminoclonazepam, 7-aminoflunitrazepam, alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam, flunitrazepam, lorazepam, midazolam, nitrazepam, nordiazepam, oxazepam, temazepam, zolpidem, 6-monoacetilmorfina, N-desmetil-tramadol, buprenorfina, codeína, fentanil, hidrocodona, hidromorfona, meperidina, metadona, morfina, naloxona, naltrexona, oxicodona, oximorfona, tramadol, bupropiona-*d*<sub>9</sub>, citalopram-*d*<sub>6</sub>, clonazepam-*d*<sub>4</sub>, codeína-*d*<sub>3</sub>, diazepam-*d*<sub>5</sub>, duloxetina-*d*<sub>3</sub> e morfina-*d*<sub>3</sub> foram adquiridos da Cerilliant (Round Rock, TX, EUA). Metanol, acetonitrila, formiato de amônio e ácido fórmico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Água ultrapura foi obtida de equipamento Milli-Q™ da Millipore (Billerica, MA, EUA). Éter metil-terc-butílico (MTBE) foi obtido da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). Tetraborato de sódio foi adquirido da LS Chemicals (Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os dispositivos de coleta de fluido oral Quantisal™ e a solução tampão foram adquiridos na Immunalysis (Pomona, CA, EUA).

#### 3.2. Calibradores, controles e padrões internos

As soluções estoque das substâncias foram preparadas por diluição do padrão analítico certificado em metanol. Diluições foram feitas para criar soluções de trabalho dos calibradores a 2,5, 5, 25, 50, 100, 150, 250 ng/mL para amitriptilina, bupropiona, hidroxibupropiona, citalopram, desmetilcitalopram, desipramina, venlafaxina, desmetilvenlafaxina, doxepina, fluoxetina, imipramina, mirtazapina, nortriptilina, sertralina, trazodona, trimipramina, clomipramina, duloxetina, norfluoxetina, norsertralina e paroxetina (antidepressivos); à 2,5, 5, 25, 50, 75 e 125 ng/mL para 7-aminoclonazepam, 7-aminoflunitrazepam, alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam, flunitrazepam, lorazepam, midazolam, nitrazepam, nordiazepam, oxazepam, temazepam e zolpidem (benzodiazepínicos); e à 5, 25, 50,

100, 150 e 250 ng/mL para morfina, codeína, 6-monoacetilmorfina, buprenorfina, fentanil, hidrocodona, hidromorfona, meperidina, metadona, naloxona, naltrexona, N-desmetil-tramadol, oxicodona, oximorfona e tramadol (opioides).

Soluções de trabalho dos controles foram preparados em metanol (a partir de diluições das soluções estoque), sendo os controles baixos em concentrações de 15 ng/mL para opioides; 7,5 ng/mL para benzodiazepínicos; 7,5 ng/mL para amitriptilina, bupropiona, hidroxibupropiona, citalopram, desmetilcitalopram, desipramina, venlafaxina, desmetilvenlafaxina, doxepina, fluoxetina, imipramina, mirtazapina, nortriptilina, sertralina, trazodona, e trimipramina e 3 ng/mL de clomipramina, norfluoxetina, paroxetina, duloxetina e norsertralina. Os controles médios foram preparados à 125 ng/mL para antidepressivos e opioides e à 40 ng/mL para benzodiazepínicos. E os controles altos à 200 ng/mL para antidepressivos e opioides e a 100 ng/mL para benzodiazepínicos.

A solução de padrão interno foi feita a partir de diluições dos padrões analíticos certificados de fármacos isotopicamente marcados, em metanol, produzindo uma única solução de trabalho na concentração de 5 ng/mL para codeína- $d_3$ , morfina- $d_3$ , clonazepam- $d_4$  e diazepam- $d_5$  e 125 ng/mL para bupropiona- $d_9$ , citalopram- $d_6$  e duloxetina- $d_3$ .

### 3.3. Preparo de amostras adicionadas (calibradores e controles)

Para o desenvolvimento e validação do método, amostras branco de fluido oral (coletadas de indivíduos que não fazem uso dos fármacos investigados neste trabalho) foram misturadas com de tampão Quantisal™ simulando a mistura preconizada pelo fabricante do dispositivo de coleta (1 parte de fluido oral + 3 partes de tampão Quantisal™), e então adicionadas com solução de trabalho dos analitos de interesse. A mistura era homogeneizada, e uma alíquota de 500  $\mu$ L era submetida ao procedimento de extração descrito no item 3.5. abaixo.

### 3.4. Amostras reais

Amostras de fluido oral ( $n = 38$ ) foram coletadas em festas de curta ou longa duração (festas de música eletrônica) usando o dispositivo de coleta Quantisal™

(Immunoanalysis, Pomona, CA, EUA) para a realização das análises laboratoriais. Os critérios de inclusão de voluntários foram: idade superior à 18 anos e autorrelato de uso de substância psicoativa nas últimas 24 horas. A coleta das amostras foi realizada de forma anônima, e os procedimentos realizados neste estudo seguiram as normas éticas do Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP-CEP, CAAE 88770318.0.0000.5404), com os padrões éticos conforme Declaração de Helsinque de 1964 e suas emendas posteriores ou padrões éticos comparáveis.

### 3.5. Preparo da amostra

Para realizar a extração líquido-líquido, 500  $\mu\text{L}$  de amostra (fluido oral-solução tampão Quantisal™) e 25  $\mu\text{L}$  da solução de padrão interno foram transferidos para tubo de polipropileno de 5 mL. Adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de solução saturada de tetraborato de sódio e 1 mL de solvente orgânico (MTBE). A mistura foi agitada em vortex multi-tubos BenchMixer XL (Benchmark Scientific, Sayreville, EUA) à 2500 rpm por 2 minutos, e submetidas à centrifugação em centrífuga Heraeus Megafuge 16 Centrifuge (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) à 5000 rpm por 5 min. Após centrifugação, 700  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi evaporado até *secura* sob fluxo de nitrogênio à 40 °C utilizando um sistema de evaporação TurboVap (Biotage, Uppsala, Suécia). Em seguida, as amostras foram ressuspendidas com 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de água e metanol (80:20, v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico e 2 mmol/L de formiato de amônio, então, 1  $\mu\text{L}$  foi injetado no sistema LC-MS/MS.

### 3.6. Parâmetros instrumentais

A análise foi realizada em um sistema de cromatografia líquida de alta performance Nexera X2 acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo LCMS8060 (Shimadzu, Kyoto, Japão). A separação cromatográfica foi realizada em coluna com fase estacionária bifenil (Raptor, 100 mm x 2,1 mm x 2,7  $\mu\text{m}$ ; Restek, PA, EUA), mantida a 40 °C. A eluição dos analitos acontece por gradiente, com fase móvel composta por água ultrapura (A) contendo 0,1% de ácido fórmico e 2 mmol/L de formiato de amônio e acetonitrila (B). O gradiente de eluição inicia com 5% de B com aumento linear até 55% de B em 6 min, seguido de aumento linear novamente até 100% de B em 6,5 min. Esta condição mantém-se por 1,5 minutos

antes de retornar à condição inicial, totalizando uma corrida cromatográfica de 9,5 min. A vazão da fase móvel é de 0,4 mL/min.

O espectrômetro de massas foi equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* operando em modo positivo. As condições do espectrômetro de massas foram: temperatura de interface à 400 °C, temperatura da linha de dessolvatação à 350 °C, temperatura do bloco à 400 °C, fluxo do gás de secagem (N<sub>2</sub>) em 5 L/min, fluxo de gás de aquecimento (N<sub>2</sub>) em 15 L/min, fluxo de gás de nebulização (N<sub>2</sub>) em 3 L/min e pressão do gás de colisão (Ar) à 270 kPa.

A aquisição de dados foi realizada no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Para cada composto, duas transições MRM foram selecionadas, uma para quantificação e outra para qualificação (confirmação), exceto para tramadol (apenas 1 transição foi escolhida). Os dados foram adquiridos e processados usando o software LabSolutions 5.97 (Shimadzu, Kyoto, Japão).

### 3.7. Desenvolvimento do método

O solvente extrator foi escolhido após emprego de um delineamento experimental de misturas (41) com acetato de etila, MTBE e hexano, considerando uma revisão bibliográfica com os solventes comumente utilizados para tais analitos. Amostras fortificadas dos analitos de interesse à 50 ng/mL foram extraídas em duplicata e avaliou-se os solventes de maneira individual, ou na forma de misturas binárias e ternárias. As áreas absolutas obtidas de cada analito foram avaliadas por planejamento experimental do tipo centroide simplex, em software Unscrambler™ X 10.3 (CAMO Software AS, Oslo, Norway). Concluiu-se que o MTBE 100% seria o solvente ideal para obter máxima recuperação dos analitos.

Após determinação do solvente de extração, o volume de MTBE foi avaliado. Para isso, extraiu-se uma duplicata de amostras fortificadas dos analitos à 50 ng/mL empregando 1 e 2 mL de MTBE. Considerando-se os valores de área absolutos obtidos dos analitos, apenas 1 mL de MTBE foi empregado na validação do método, já que a extração com 2 mL não apresentou resultados consideravelmente superiores que justificassem seu emprego.

Para escolha do solvente de ressuspensão do extrato, testou-se o uso de metanol puro e uma mistura água e metanol (80:20, v/v) contendo 0,1% de ácido

fórmico e 2 mmol/L de formiato de amônio. Da mesma forma, amostras fortificadas dos analitos de interesse à 50 ng/mL foram extraídas em duplicata e ressuspensas empregando as diferentes soluções. A solução de água e metanol (80:20, v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico e 2 mmol/L de formiato de amônio foi a que apresentou melhor simetria de picos cromatográficos e, portanto, foi empregada na validação do método.

Durante a otimização do método cromatográfico, metanol e acetonitrila foram testados como fase móvel orgânica (B). Dentre ambos, a acetonitrila foi escolhida por melhorar a separação cromatográfica de analitos específicos, como morfina/hidromorfona, codeína/hidrocodona e desmetilvenlafaxina/tramadol. Além disso, o emprego da acetonitrila evitou interferências isobáricas da matriz semelhantes ao MRM do lorazepam.

A meperidina e o tramadol tiveram parâmetros instrumentais ajustados de forma diferente dos demais analitos, devido a sua grande sensibilidade na ionização por *electrospray*. Para evitar a saturação do detector e melhorar a linearidade, a resolução do terceiro quadrupolo foi definida como “*high*” ao invés de “*unit*”. Observou-se o mesmo comportamento para a metadona, embora a alteração da resolução do quadrupolo não tenha sido suficiente para evitar a saturação do detector. Para este analito, foram adotados os íons do isótopo menos abundante da metadona (311,2 ao invés de 310,2 *m/z*), o que permitiu a realização das análises com boa linearidade e sensibilidade adequada.

### 3.8. Validação do método

O método foi então validado de acordo com os parâmetros recomendados pelo *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX) para análises quantitativas em matrizes biológicas (35). Os critérios avaliados foram: linearidade, limite inferior de quantificação (LQ), estudos de interferente, inexatidão, imprecisão, efeito matriz, *carryover*, estabilidade, integridade de diluição e recuperação (eficiência de extração).

- Critérios de identificação

Para identificação dos analitos, considerou-se os seguintes critérios: (i) um pico cromatográfico simétrico cujo tempo de retenção demonstrasse variação limite de  $\pm 2\%$  a média de valores de tempo de retenção dos calibradores; (ii) razão sinal/ruído maior que 3 para íons qualificadores e quantificadores e (iii) variação de no máximo  $\pm 30\%$  entre a razão obtida e a razão estabelecida entre as transições dos calibradores, sendo a porcentagem de variação maior para transições de baixa intensidade (42).

- Linearidade

A linearidade foi avaliada com curvas de calibração de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 50,0 ng/mL para os antidepressivos (excetuando-se os seguintes: clomipramina, duloxetine, norfluoxetine, nortriptilina e paroxetina com linearidade de 1,0 à 50,0 ng/mL), de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 25,0 ng/mL para os benzodiazepínicos e de 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 50,0 ng/mL para os opioides. Realizou-se curvas de calibração de seis pontos ao longo de 5 dias, empregando o método de mínimos quadrados, com ponderação linear de  $1/x^2$  para todos os analitos. A curva era considerada linear quando os valores obtidos dos calibradores variassem no máximo  $\pm 20\%$  a concentração teórica e quando o coeficiente de correlação ( $r$ ) fosse maior que 0,99.

- Limite inferior de quantificação (LQ)

O LQ foi definido como a menor concentração da curva de calibração padrão que atendesse os critérios de identificação, com uma relação sinal/ruído maior que 10 e valores de inexatidão e imprecisão aceitáveis (inferiores à  $\pm 20\%$ ). Para tal, realizou-se uma triplicata da concentração por 3 dias com 3 diferentes fontes de matriz em branco. Neste trabalho, o limite de detecção (LD) foi administrativamente considerado igual ao LQ do método.

- Estudos de interferente

Amostras de fluido oral em branco foram fortificadas com 104 substâncias, dentre fármacos amplamente utilizados, drogas de abuso e seus produtos de biotransformação à 200 ng/mL, devidamente diluídas em tampão Quantisal™, extraídas e injetadas no LC-MS/MS. A Tabela 1 abaixo inclui todos as substâncias avaliadas como potenciais interferentes.

- Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado comparando às áreas dos picos dos analitos em dois diferentes modos de preparo. No primeiro, seis amostras de fluido oral em branco de diferentes fontes, devidamente diluídas em tampão Quantisal™, foram fortificadas com analitos após a extração em duas diferentes concentrações (baixa e alta). No segundo, apenas injetou-se uma sextuplicata de padrão puro em cada concentração, a fim de obter uma área média de pico. Comparou-se a média das áreas obtidas e os resultados foram expressos em porcentagem. Resultados negativos indicavam supressão de sinal pela matriz e resultados positivos indicavam aumento de sinal pela matriz.

- *Carryover*

O *carryover* foi avaliado analisando amostras de fluido oral em branco imediatamente após o ponto mais alto da curva de calibração por 3 dias. Foi considerado ausente se quaisquer picos dos analitos presentes estivessem abaixo dos valores de LQ.

**Tabela 1** – Lista das substâncias testadas à 200 ng/mL como potenciais interferentes exógenos.

<i>Classe</i>	<i>Analitos</i>
<i>Fármacos</i>	Ácido acetil-salicílico, ácido ritalínico, atenolol, atorvastatina, ácido valpróico, betametasona, captopril, carbamazepina, carisoprodol, celecoxibe, cetoprofeno, desloratadina, dexametasona, diclofenaco, diltiazem, dipirona, domperidona, etilfenidato, fenitoína, fenobarbital, furosemida, glibenclamida, haloperidol, hidroclorotiazida, hidroxizina, ibuprofeno, loratadina, meloxicam, metilfenidato, metoclopramida, nafazolina, ondansetrona, paracetamol, prednisolona, prometazina, propranolol, quetiapina, ranitidina, risperidona e salbutamol.
<i>Drogas de abuso e seus produtos de biotransformação</i>	25B-NBOMe, 25C-NBOMe, 25D-NBOMe, 25E-NBOMe, 25G-NBOMe, 25H-NBOMe, 25I-NBOMe, 25B-NBOH, 25C-NBOH, 25I-NBOH, 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), 3,4-metilenodioxi-N-etilanfetamina (MDEA), 3-trifluorometilfenilpiperazina (TFMPP), meta-clorofenilpiperazina (mCPP), para-clorofenilpiperazina (pCPP), dimetiltriptamina (DMT), tetrahydroharmina (THH), harmina, harmalina, dietilamida do ácido lisérgico (LSD), benzedrona, butilona, mefedrona, pentilona, $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), 11-Hidroxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (11-OH-THC), 11-Nor-9-carboxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC-COOH), ABFUBINACA, ABPINACA, APINACA (AKB48), MMBFUBINACA, AM2201, AM2233, CP47 497, HU-211, JWH-015, JWH-019, JWH-073, JWH-081, JWH-122, JWH-175, JWH-176, JWH-200, JWH-203, JWH-210, JWH-250, RCS4, RCS8, XLR11, cetamina, norcetamina, cocaína, anidroecgonina metil éster, ecgonina metil éster, metanfetamina, anfetamina, nicotina, cafeína, etizolam, fentermina e estricnina.



- Estabilidade

Todos os estudos de estabilidade foram conduzidos em duas concentrações (baixa e alta) em triplicata ( $n = 6$ ). Amostras de fluido oral em branco, devidamente diluídas em tampão Quantisal™, foram fortificadas com soluções de trabalho no tempo zero ( $t_0$ ), aliqüotadas em tubos de polipropileno de 5 mL e armazenadas a 25 °C (temperatura ambiente), 4 °C (geladeira) e -20 °C (freezer).

Após 3, 7, 15, 30 e 60 dias, alíquotas dessas amostras foram fortificadas com solução de padrão interno e quantificadas usando curvas de calibração preparadas no mesmo dia. A média das concentrações obtidas foram comparadas à média das concentrações das amostras em  $t_0$ , resultando em valores de porcentagem.

Para avaliar a estabilidade após ciclos de congelamento-descongelamento a -20 °C fortificou-se amostras em branco (devidamente diluídas em tampão Quantisal™) no  $t_0$  em 2 concentrações diferentes (baixa e alta). Estas amostras foram quantificadas e uma triplicata semelhante foi armazenada à -20 °C. Após três ciclos de congelamento-descongelamento (1 ciclo = 24 horas), a triplicata foi quantificada com uma nova curva de calibração.

Para avaliação da estabilidade no amostrador automático, uma curva foi extraída e usada para quantificar amostras em branco fortificadas em duas concentrações (baixa e alta). Os controles ficaram armazenados no amostrador automático à 10 °C e reinjetados após 12, 18 e 24 horas. As áreas obtidas dos picos dos controles armazenados foram comparadas às obtidas imediatamente.

Em todos os estudos de estabilidade, os analitos foram considerados estáveis se a variação da concentração obtida após armazenamento fosse inferior à  $\pm 20\%$  da concentração inicial.

- Integridade de diluição

Para estudos de integridade de diluição, uma triplicata de amostras de fluido oral em branco foi fortificada com bupropiona, citalopram, desmetilvenlafaxina, hidroxibupropiona e venlafaxina à 500 ng/mL e diluída 20x em uma mistura contendo fluido oral em branco e solução tampão Quantisal™. Se o valor da concentração

obtida multiplicada pelo fator de diluição estivesse dentro de  $\pm 20\%$  da concentração teórica, a integridade da diluição é estabelecida.

- Recuperação (eficiência de extração)

A recuperação foi avaliada comparando às áreas dos picos dos analitos em dois diferentes modos de preparo. O primeiro continha uma sextuplicata de amostras de fluido oral em branco (devidamente diluídas em tampão Quantisal™) fortificadas com analitos em 2 concentrações diferentes (baixa e alta), extraídas e injetadas no LC-MS/MS. O segundo modo, porém, continha uma sextuplicata de amostras em branco (também diluídas em tampão Quantisal™), extraídas pelo procedimento proposto, fortificadas com as soluções de trabalho em 2 concentrações diferentes (baixa e alta) e em seguida injetadas no LC-MS/MS. Assim, a área média dos picos das amostras preparadas do primeiro modo dividida pela média das amostras do segundo modo é multiplicada por 100, e obteve-se a porcentagem de eficiência de extração.

#### 4. RESULTADOS

Os resultados obtidos do desenvolvimento, validação e aplicação do método em questão serão submetidos para publicação na revista *Forensic Toxicology* (Online ISSN 1860-8973, fator de impacto 2.945). O texto do manuscrito está descrito a seguir:

**Development and validation of quantitative analytical method for 50 drugs of antidepressants, benzodiazepines and opioids in oral fluid samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry**

Ana Carolina Furiozo Arantes<sup>1,2</sup>; Kelly Francisco da Cunha<sup>1,2</sup>; Marília Santoro Cardoso<sup>1,2</sup>; Karina Diniz Oliveira<sup>1,2</sup>; Jose Luiz Costa<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP 13083-859, Brazil

<sup>2</sup>Campinas Poison Control Center, University of Campinas, Campinas, SP 13083-859, Brazil

<sup>3</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP 13083-871, Brazil

**\*Corresponding author:**

Prof. Dr. Jose Luiz Costa

jose.jlc@fcf.unicamp.br

Phone: +55 19 3521 7232

Fax: +55 19 3521 7592

## Abstract

*Purpose* We developed and validated a method for quantitative analysis of 50 psychoactive substances and metabolites (antidepressants, benzodiazepines and opioids) in oral fluid samples using simple liquid-liquid extraction procedure followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS).

*Method* Oral fluid samples were collected using Quantisal™ device and extracted by liquid-liquid extraction with 1.0 mL of methyl *tert*-butyl ether and then analyzed using LC–MS/MS.

*Results* The method attended method validation criteria, with limits of quantification as low as 0.5 and 1.0 ng/mL, and linearity between 0.5–50.0 for antidepressants, 0.5–25.0 ng/mL for benzodiazepines and 1.0–50.0 to opioids. During method validation, bias and imprecision values were not greater than 16 and 20%, respectively. Ionization suppression/enhancement bias results were not greater than 25%. No evidence of carryover was observed. Sample stability studies showed that almost all analytes were stable at 25 °C for 3 days and at 4 °C for 7 days. Freeze-thaw cycles stability showed that most of antidepressants and opioids were stable under these conditions. Autosampler stability study showed that all analytes were stable for 24 h, except for nitrazepam and 7-aminoclonazepam. Thirty-eight authentic oral fluid samples were analyzed; 36.8% of the samples were positive for 2 of the method's analytes. Citalopram was the most common drug found, followed by venlafaxine.

*Conclusions* The method was validated according to international recommendations for the 50 analytes, showing low limits of quantification, good imprecision and bias values, using simple liquid-liquid extraction, and was successfully applied to authentic oral fluid samples analysis.

**Keywords** Oral fluid; LC–MS/MS; Antidepressants; Benzodiazepines; Opioids; Quantitative mass analysis.

## Introduction

and Oral fluid is used as an alternative matrix for diagnostic in clinical and workplace applications; drug driving, drug monitoring and criminal justice settings have been increasing over the last 20 years [1–6]. This matrix is constituted by saliva and other fluids, from minor and major salivary glands and gingiva; its presence in oral cavity allows easy collection and application for monitoring therapeutic or illicit use of drugs and for pharmacokinetic studies [7].

As compared to other matrices, oral fluid excelled due to rapid, noninvasive and observed collection, difficult adulteration and simpler analysis (when considering plasma with high contents of lipids and proteins, for example). Oral fluid is also considered as an alternative matrix to blood due to the good correlation of concentration found in both matrices for most analytes. This characteristic has been further investigated, making oral fluid a priority for on-site collection [1, 2, 8, 9].

Oral fluid has arisen as primary option to access drug driving problems, considering the easy collection and possibility to access recent drug use without needing blood sampling. The Roadside Testing Assessment (ROSITA) study, which objective was accessing drug and alcohol driving problems in six countries in Europe and four American states, highly recommend the start of random drug testing for government officials [10]; oral fluid was considered the most relevant biological matrix applied for roadside testing situations [2]. This matrix is also useful to field sample collection, such as at parties and music festivals, which the main objective of which is to establish solid patterns into drug consumption [11]. Mohr et al. [12] evaluated the use of synthetic stimulants and hallucinogens in an electronic dance music festival, and concluded that among blood, urine and oral fluid, was the main sample of choice for monitoring these populations.

Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) is an effective tool for detection compounds from different classes, with distinct chemical structures and physicochemical properties, even at low concentrations. The aim of this work was to develop and validate an analytical method for simultaneous and quantitative analysis of 50 psychoactive drugs of antidepressants, benzodiazepines and opioids, which are widely circulating in the world, in oral fluid samples, using simple liquid-liquid extraction and LC–MS/MS. After validation, the method was successfully applied to the analysis of 38 authentic oral fluid samples collected from volunteers attending parties and electronic music festivals from different cities in Brazil.

## Materials and methods

### Standards and chemicals

Certified reference materials of amitriptyline, bupropion, citalopram, desipramine, desmethylcitalopram, duloxetine, fluoxetine, imipramine, mirtazapine, nortriptyline, paroxetine, sertraline and trazodone were purchased from LGC Standards (Teddington, London, UK); certified reference materials of

clomipramine, desmethylvenlafaxine, doxepin, hydroxybupropion, norfluoxetine, nortriptyline, trimipramine, venlafaxine, 7-aminoclonazepam, 7-aminoflunitrazepam, alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam, flunitrazepam, lorazepam, midazolam, nitrazepam, nordiazepam, oxazepam, temazepam, zolpidem, 6-monoacetylmorphine, *N*-desmethyltramadol, buprenorphine, codeine, fentanyl, hydrocodone, hydromorphone, meperidine, methadone, morphine, naloxone, naltrexone, oxycodone, oxymorphone, tramadol, bupropion-*d*<sub>8</sub>, citalopram-*d*<sub>6</sub>, clonazepam-*d*<sub>4</sub>, codeine-*d*<sub>3</sub>, diazepam-*d*<sub>5</sub>, duloxetine-*d*<sub>3</sub> and morphine-*d*<sub>3</sub> from Cerilliant (Round Rock, TX, USA); methanol, acetonitrile, ammonium formate and formic acid from Merck (Darmstadt, Germany); ultrapure deionized water was purified by Milli-Q from Millipore (Billerica, MA, USA). All solvents used in the extraction procedure were HPLC grade. Quantisal™ oral fluid collection devices and elution buffer were purchased from Immunalysis (Pomona, CA, USA).

### Calibrators, quality control, and internal standards

The stock solutions of the substances were prepared by dilution of the reference certified material in methanol. Dilutions of the stock solution in methanol were made to create calibrators at 2.5, 5, 25, 50, 100, 150, 250 ng/mL for amitriptyline, bupropion, hydroxybupropion, citalopram, desmethylcitalopram, desipramine, venlafaxine, desmethylvenlafaxine, doxepin, fluoxetine, imipramine, mirtazapine, nortriptyline, sertraline, trazodone, trimipramine, clomipramine, duloxetine, norfluoxetine, nortriptyline and paroxetine (antidepressants); at 2.5, 5, 25, 50, 75 and 125 ng/mL for 7-aminoclonazepam, 7-aminoflunitrazepam, alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam, flunitrazepam, lorazepam, midazolam, nitrazepam, nordiazepam, oxazepam, temazepam and zolpidem (benzodiazepines); and at 5, 25, 50, 100, 150 and 250 ng/mL for morphine, codeine, 6-monoacetylmorphine, buprenorphine, fentanyl, hydrocodone, hydromorphone, meperidine, methadone, naloxone, naltrexone, *N*-desmethyltramadol, oxycodone, oxymorphone and tramadol (opioids). In this work, zolpidem was reported as benzodiazepine, in order to embrace all method substances.

Quality control (QC) working solutions were prepared by another analyst (different from the individual preparing the calibrators). The low-quality control (LQC) solutions were prepared in methanol at concentrations of 15 ng/mL for opioids; 7.5 ng/mL for benzodiazepines; 7.5 ng/mL for amitriptyline, bupropion, hydroxybupropion, citalopram, desmethylcitalopram, desipramine, venlafaxine, desmethylvenlafaxine, doxepin, fluoxetine, imipramine, mirtazapine, nortriptyline, sertraline, trazodone and trimipramine and 15 ng/mL for clomipramine, norfluoxetine, paroxetine, duloxetine and nortriptyline. Medium-quality controls (MQC) solutions were prepared in methanol at 125 ng/mL for antidepressants and for opioids and at 40 ng/mL for benzodiazepines. High-quality control (HQC) solutions were prepared in methanol at 200 ng/mL for antidepressants and for opioids and at 100 ng/mL for benzodiazepines. More information about QC working solutions are summarized in Table 1.

Internal standard (IS) solutions were made from dilutions of the stock solutions of certified reference materials, to produce a single IS mixture working solution at the concentration of 5 ng/mL for codeine-

$d_3$ , morphine- $d_3$ , clonazepam- $d_4$  and diazepam- $d_5$ , and 125 ng/mL for bupropion- $d_9$ , citalopram- $d_6$  and duloxetine- $d_3$ . All solutions were prepared in methanol and stored in amber glass vials at -20 °C.

### Samples

Blank oral fluid samples were mixed with Quantisal™ elution buffer according to manufacturer's dilution (1:3, v/v), fortified with the working standard solutions and used for method development and validation.

To demonstrate that the analytical method was fit for purpose, oral fluid samples collected from volunteers participating in parties and electronic music festivals were analyzed ( $n = 38$ ). The inclusion criteria were age greater than 18 years old and self-report use of synthetic drug in the last 24 h. The sample collection was performed anonymously, and procedures performed in this study involving oral fluid samples from human volunteers were in accordance with the ethical standards of the University of Campinas committee (Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP—CEP, CAAE 88770318.0.0000.5404), and with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

### Extraction procedure

To perform the liquid-liquid extraction (LLE), 500  $\mu$ L of sample (oral fluid-Quantisal™ elution buffer) was transferred to a 5 mL polypropylene tube, followed by 25  $\mu$ L of IS solution, 500  $\mu$ L saturated solution of sodium tetraborate and 1 mL of methyl *tert*-butyl ether (MTBE). The mixture was vortexed using BenchMixer™ XL multi-tube vortexer (Benchmark Scientific, Sayreville, NJ, USA) for 2 min at 2500 rpm. After that, the samples were centrifuged at 987 *g* for 5 min and the organic layer (700  $\mu$ L) was transferred to a new 5 mL polypropylene tube and dried under nitrogen stream (10 psi/40°C) using a TurboVap evaporation system (Biotage, Uppsala, Sweden). The samples were resuspended with 100  $\mu$ L of a mixture solution (water and methanol, both containing 0.1 % formic acid and 2 mmol/L ammonium formate, 80:20, v/v) and 1  $\mu$ L was injected into LC–MS/MS system.

### Instrument parameters

The analysis was performed on a Nexera X2 ultra high-performance liquid chromatograph system coupled to an LCMS8060 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). The chromatographic separation was performed on a biphenyl column (Raptor, 100 x 2.1 mm, 2.7  $\mu$ m; Restek, Bellefonte, PA, USA), maintained at 40 °C. The mobile phase consisted of ultrapure water containing formic acid (0.1 %, v/v) and ammonium formate (2 mmol/L) (A) and acetonitrile (B). The flow rate was 0.4 mL/min, and the elution gradient initialized with 5 % B maintained for 0.5 min, followed by a linear increase to 55 % B in 5.5 min, and another linear increase to 100 % B in 0.5 min, holding at 100 % B for 1.5 min and returning to initial conditions over 0.2 min. The system was reequilibrated for 1.3 min before the next injection, with a total chromatographic run of 9.5 min.

The mass spectrometer was equipped with an electrospray ionization source operating in positive mode. The mass spectrometer conditions were: interface temperature at 400 °C, desolvation temperature at 350 °C, heat block temperature at 400 °C, drying gas (N<sub>2</sub>) flow at 5 L/min, heating gas flow (air) at 15 L/min, nebulizing gas (N<sub>2</sub>) flow at 3 L/min and collision-induced dissociation gas pressure (Ar) at 270 kPa. The analyses were performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode. For each compound, two MRM transitions were selected, one as quantifier and one qualifier for confirmative identification, except for tramadol (only one transition was chosen). Individual chromatographic retention times and MRM information were presented in Table 2. Data were acquired and processed using LabSolutions 5.97 software (Shimadzu).

### **Method validation**

Method validation was performed based on the Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) guidelines [13]. The parameters evaluated were limit of quantification (LOQ), linearity, interference studies, bias, imprecision, matrix effect, carryover, stability, dilution integrity and recovery.

### **Identification criteria**

Analytes identification criteria considered (i) a symmetrical chromatographic peak with retention time within  $\pm 2$  % of the average calibrator retention time, (ii) signal/noise ratio higher than 3 for both qualifier and quantifier ions and (iii) the ratios of the two transitions within a maximum of  $\pm 30$ % of those established by the calibrators, varying more for those with low intensity for the major transition [14].

### **Limit of quantitation**

The limit of quantitation (LOQ) was defined as the lowest concentration of the standard calibration curve that fulfilled identification criteria, with a signal-to-noise ratio of at least 10, acceptable bias and precision. The LOQ for all analytes was evaluated using three replicates per run, over three days with three different sources of blank matrix.

### **Linearity**

Linearity was evaluated with calibration range from 0.5 to 50.0 ng/mL for antidepressants (except clomipramine, duloxetine, norfluoxetine, nortriptyline, and paroxetine from 1.0 to 50.0 ng/mL), from 0.5 to 25.0 ng/mL for benzodiazepines and from 1.0 to 50.0 ng/mL for opioids. Linearity was evaluated with six-point calibration curves over 5 days, by linear least squares regression ( $1/x^2$  weighting) for all analytes. Calibrators were required to quantify within  $\pm 20$ % of each target concentration, with correlation coefficient ( $r$ ) greater than 0.99.



### **Interference studies**

Blank oral fluid samples were fortified with common pharmaceuticals and drugs of abuse/metabolites at 200 ng/mL, properly diluted in Quantisal™ elution buffer, extracted and injected into the LC-MS/MS. No peaks were visualized in each analyte's detection window that satisfied identification criteria. Supplementary Table 1 includes all pharmaceuticals evaluated as potential interferents (selectivity). Ten blank oral fluid samples from different sources were extracted and analyzed to evaluate possible endogenous interferences. Also, potential contribution of native ions present in commercial deuterated ISs was evaluated comparing the blank oral fluid pool with and without IS additions. No interfering peaks should be visualized that satisfied identification criteria.

### **Bias**

Bias was evaluated in triplicate analysis of fortified matrix samples, at three different concentrations (low, medium, and high) over five days. It was calculated considering the percentages of nominal deviation from the target concentration. The highest average acceptable bias from the target concentration was  $\pm 20\%$ . Results are presented in percentages.

### **Imprecision**

The imprecision was evaluated in triplicate analysis of fortified matrix samples, at three different concentrations (low, medium, and high) over five days. Both within-run and between-run imprecisions were calculated using the one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ) approach with the varied factor (run number) as the grouping variable [13]. Using this approach, imprecision is considered as relative standard deviation percentage (%RSD) within triplicate analysis in one day ( $n = 3$ ) and for 5 days ( $n = 15$ ) for each concentration. Imprecision values with %RSD less than 20% were considered acceptable.

### **Matrix effect**

Matrix effects were evaluated by comparison of target analyte peak areas in six blank oral fluid samples from different sources, properly diluted in Quantisal™ elution buffer, fortified with analytes after extraction (at low and high QC levels) and compared to the average target peak areas of a set of neat standards. These twelve samples were extracted according to the method described above. Results were expressed as percentages considering a negative result indicative of matrix suppression, and a positive result of matrix enhancement.

### **Carryover**

Carryover was assessed analyzing blank oral fluid samples immediately after the highest point of calibration curve over three days. It was considered absent if all analyte's peak were below LOQ values.

### **Stability**

All the stability studies were conducted at low and high QC concentrations ( $n = 6$ ) in triplicate. They were properly diluted in Quantisal™ elution buffer on day zero, aliquoted in 5 mL polypropylene tubes and stored at 25 °C (room temperature), 4 °C (refrigerator) and -20 °C (freezer). After 3, 7, 15, 30 and 60 days, aliquots of each QC were fortified with IS and quantified using freshly prepared calibration curves. These drug concentrations were compared to those of the initial QC samples.

Stability after three freeze-thaw cycles at -20 °C was evaluated by fortifying blank oral fluid samples (properly diluted in Quantisal™ elution buffer) on day zero, and after quantifying each concentration, the other triplicates were stored at -20 °C. After three freeze-thaw cycles (one cycle = 24 h), triplicates samples were quantified against a newly prepared calibration curve.

For evaluation of autosampler stability, low and high QCs and calibrator samples (properly diluted in Quantisal™ elution buffer) were extracted and analyzed immediately. These QCs were stored on the autosampler at 10 °C and re-injected after 12, 18 and 24h. The peak areas of these stored QCs were compared to those obtained immediately.

In all stability studies, analytes were considered stable if the concentration was within  $\pm 20\%$  of the initial concentration.

### **Dilution Integrity**

For dilution integrity studies, a triplicate of blank oral fluid samples was fortified with 500 ng/mL and diluted 20-fold in a mixture containing blank oral fluid and Quantisal™ buffer solution. If the measured concentration times the dilution factor is within  $\pm 20\%$  of the target concentration, the integrity of the dilution is established.

### **Recovery**

Recovery (extraction efficiency) was performed in two batches: the first using six replicates of blank oral fluid samples (properly diluted in Quantisal™ elution buffer) fortified with analytes at the low and high concentrations, extracted with the proposed procedure and injected into the LC-MS/MS; the second, using six replicates of blank oral fluid samples (properly diluted in Quantisal™ elution buffer) extracted by the proposed procedure and, the final extract was fortified with the analytes at low and high QC concentrations and injected into the LC-MS/MS. The average peak area of the samples fortified prior to extraction divided by the average peak area of the samples fortified after extraction is multiplied by 100 to give the percent extraction efficiency.

## Results

The solvent for the LLE was chosen by a mixture design of experiment [15]. Ethyl acetate, MTBE and hexane (contemplating the solvents to be most applied for these analytes by LLE) were evaluated individually as binary and ternary mixtures, using analytes' peak areas as the measure of response. The best results were achieved with MTBE as extraction solvent. Methanol was first option to reconstitute the dried extract but better chromatography peak symmetry was observed using water/methanol, both containing 0.1% formic acid and 2 mmol/L ammonium formate (80:20, v/v).

During chromatographic method optimization, methanol and acetonitrile were tested as organic mobile phase (B). Acetonitrile was chosen because it improved the chromatographic separation of specific analytes, such as morphine/hydromorphone, codeine/hydrocodone and desmethylvenlafaxine/tramadol, but it did not fully separate them when methanol was used. The use of acetonitrile also avoids interferences caused by similar isobaric interferences from matrix in lorazepam MRM.

Meperidine and tramadol had adjusted mass spectrometry conditions differently from other analytes, due to their great sensibility at electrospray ionization. To prevent detector saturation and enlarge linearity, the third quadrupole resolution was set to "high" instead of "unit". The same was observed for methadone, although changing quadrupole resolution did not solve the problem. For this analyte, we adopted the less abundant ions ( $m/z$  311.2 instead of 310.2), which allowed quantification and good linearity results.

The LOQ was defined as an administratively decision point concentration and established as 0.5 ng/mL for all benzodiazepines and for most part of antidepressants (amitriptyline, bupropion, hydroxybupropion, citalopram, desmethylcitalopram, desipramine, venlafaxine, desmethylvenlafaxine, doxepin, fluoxetine, imipramine, mirtazapine, nortriptyline, sertraline, trazodone and trimipramine) and as 1.0 ng/mL for all opioids and some antidepressants (clomipramine, duloxetine, norfluoxetine, nortriptyline, and paroxetine). Figure 1 is the combined MRM chromatogram of analytes at the LOQ levels.

Excellent performance and linearity were achieved with  $r > 0.99$ , fulfilling all identification parameters. No interference was observed among the ten different sources of blank oral fluid tested. The same was verified for evaluation of IS interferences and interferences from other commonly encountered pharmaceuticals and drugs of abuse. Calibration ranges, QC values and correlation coefficients are presented in Table 1.

The largest imprecision value in this validation was observed for norfluoxetine at low QC (3.0 ng/mL), with within-run imprecision of 20% and between-run imprecision of 19%. Bias was less than 16% for all analytes (Table 3).

The matrix effects biases were lower than 25% and no carryover was observed when analyzing blank samples immediately after the analysis of the highest point of calibration curve. Recovery values were obtained comparing two different sets of samples. Most analytes had very similar values among low and

high concentrations. Antidepressant extraction recovery values were not lower than 78%; opioids values ranged from 20 to 99%; and benzodiazepines values were not lower than 49%. The results for bias (accuracy) for each analyte are also shown in Table 3.

Stability results are presented on Tables 4-6, and showed that all antidepressants, benzodiazepines and opioids were stable in oral fluid collected with Quantisal™ device for at least 60 days at -20 °C, except 7-aminoclonazepam (-38 and -41%, low and high QC respectively), 7-aminoflunitrazepam (-33 and -38%), lorazepam (23 and 12%), nordiazepam (23 and 6%) naloxone (20 and 23%), naltrexone (25 and 12%) and nortriptyline (21 and 14%). All studied analytes were considered stable at 4 °C for 7 days except for nordiazepam (-23 and -1% at day 3) and methadone (21 and 11%) and at 25 °C for 3 days except for sertraline (-11 and -23%) and flunitrazepam (-21 and -19%). Most of antidepressants and opioids are stable after three freeze-thaw cycles, which tended not to be seen for benzodiazepines. Among 14 benzodiazepines, 6 presented great instability after freeze-thaw cycles, ranging from ±21 to 35%. Autosampler stability study at 10 °C showed that all antidepressants and opioids were stable for 24 h, with results better than 11% when peak areas of stored QCs were compared to those freshly prepared. Most of benzodiazepines remained stable in autosampler conditions after 24 h storage, except nitrazepam, 7-aminoflunitrazepam and 7-aminoclonazepam (relatively stable only for 18 h).

Dilution integrity studies were performed for all analytes which concentrations found in real samples were above upper limit of the calibration range. The average diluted concentrations were satisfactory within ±10.5, 8.9, 2.4, 4.3, 1.9% of the target concentration for bupropion, citalopram, desmethylvenlafaxine, hydroxybupropion and venlafaxine, respectively.

Among all oral fluid real samples (n = 38) (Table 7), citalopram was the most common drug found, in 10 samples (26.3%), with concentrations varying between 1.5 to 150 ng/mL. Citalopram's main metabolite, desmethylcitalopram, was also detected in 7 of these samples, with concentrations within 0.6 to 5.5 ng/mL. Venlafaxine was the second most frequently found drug in 9 samples (23.7%) whereas in 5 of these samples were also possible to detect desmethylvenlafaxine (its main metabolite) in concentrations ranging between 0.6 to < 500 and 0.6 to 257 ng/mL, respectively. Bupropion was detected in 4 samples (10.5%), but its metabolite hydroxybupropion was more commonly found in 7 samples (18.4%), with concentrations within 1.2-334 and 0.6-189 ng/mL, respectively. All samples that had positive results to sertraline (n = 2) also were positive to nortriptyline, at very low concentrations varying between 0.8 and 3.1 ng/mL. Clonazepam was found only in 2 samples (concentrations of 0.6 and 0.7 ng/mL) and among them only 1 was also positive to 7-aminoclonazepam (2.3 ng/mL). Clomipramine, duloxetine, mirtazapine, paroxetine and zolpidem had only 1 positive sample each and the concentrations found were between 0.5 and 14.1 ng/mL. Fourteen samples were positive for 2 of the investigated analytes, 10 samples had 1 analyte and only 1 sample showed positivity for 5 analytes (Fig. 2).

## Discussion

It is well known that psychoactive substances may affect brain functioning, altering attention, delaying reaction time, reducing alertness, which may lead to car injuries and fatalities [16, 17]. According to a

meta-analysis of experimental studies carried out by European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), an usual dose of antidepressant or anxiolytic can cause at least twice higher degree of impairment than THC smoking [18]. However, only a part of prescribed medicines and licit substances has been investigated in drivers across the world. In Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines (DRUID) project, which monitors 10,000 drivers per year in 18 countries in Europe, a list containing 25 substances without antidepressant drugs is embraced, containing only half of the 50 analytes in this method [18].

Several cutoff values for different substances are available for driving under the influence legislations in oral fluid samples [10, 18–20]. For benzodiazepines and opioids, analytical cutoff values vary between 1-480 ng/mL [21]. To the best of our knowledge, no specific cutoff values are available for antidepressants in oral fluid.

In this work, we established a fully LLE and LC-MS/MS method for determining antidepressants, benzodiazepines, opioids and some of their main metabolites in oral fluid. The developed method was validated according to SWGTOX guidelines and performing stability studies for up to 60 days. The LOQ values were determined administratively, below available cutoff values established by EMCDDA, DRUID and European Workplace Drug Testing Society (EWDTs). Calibration range was chosen based on previous articles which reported similar concentrations in oral fluid samples for benzodiazepines [22–24] and for opioids [25, 26]. For antidepressants, calibration range proposed by prior publications were from 5 to 20,000 ng/mL [27–30], which is greater than applied in this method. Although, a higher calibration range was firstly essayed, linearity could not be achieved due to the analytical sensibility implied by LC-MS/MS technique.

Solid-phase extraction (SPE) was presented as the extraction technique of the same analytes of this method in previously published papers [23–36]. Our results showed that LLE was cheaper and preferable alternative, providing great extraction efficiencies and adequate matrix effects, with low sample volume (500  $\mu$ L) and low extraction solvent volume (1 mL) consumption. Quintela et al [23] developed a method for 9 benzodiazepines using 500  $\mu$ L of sample, however adopting 6 mL of extraction solvent and 15  $\mu$ L injection volume. Kintz et al [24] incorporated 17 analytes (including benzodiazepines and hypnotics) using the same sample volume and 3 mL of extraction solvent instead. For antidepressant drugs, Coulter et al [29] and Shin et al [37] developed a method with 16 and 18 drugs, respectively, both using SPE technique and applying 1,000 and 500  $\mu$ L of oral fluid sample volumes.

Coulter et al [29] obtained an extraction recovery higher than 88% for antidepressants using Quantisal<sup>TM</sup> collection device. For benzodiazepines, Ngwa et al [36] presented extraction recovery better than 54% in two different concentrations and SPE. For opioids, Truver and Swortwood [37] applied a SPE technique and Quantisal<sup>TM</sup> collector device; morphine, 6-monoacetylmorphine and buprenorphine had recovery results better than 85% using LOQ values of 5 ng/mL. In our method, morphine presented recovery results better than 20%; however, we achieved an LOQ 5 times lower (1 ng/mL).

In fact, low limits of detection/quantification are required in oral fluid analysis. Morphine and codeine are often found in concentrations ranging within 1-25 ng/mL in oral fluid samples [38, 39]. Fentanyl and oxycodone whatsoever appear to have lower and higher concentrations in oral fluid samples, respectively, justifying the necessity of more oral fluid disposition studies with controlled drug administration [38]. Jang et al [40] reported very low concentrations for benzodiazepine drugs in oral fluid samples of chronic users. Alprazolam, clonazepam, diazepam and lorazepam concentrations ranged from 0.9 to 14.4 ng/mL supporting the need for more sensitive and selective techniques to analyze these drug classes. Even using LLE, our method had sensibility enough (or greater) than previously published methods.

In most recently articles, quantitative and qualitative analyses of novel synthetic opioids/ clandestine opioids have been published [37, 41], but the analytes are not described in this method. Additionally, a growing public need for opioid drug monitoring in oral fluid has been arising, as an important clinical tool to evaluate efficiency of opioid drug treatment in patients with cancer [42], during treatment for opioid addiction [43], and also for driving under the influence legislations [44, 45].

For benzodiazepines, bias and imprecision values of this method ranged from 0 to 16% and 3 to 14%, respectively, showing closer results to a previously method developed by Jang et al [40] which had values within 0 to -7.2 % and 3.0 to 8.6 %. Also similar values were obtained for antidepressants, with imprecision value average of 6% and bias average values of 5%, against 4.5 and 3.9%, respectively, in a previously published article by Shin et al [46].

Langel et al [47] reported good stability at -18 °C for morphine, codeine, diazepam and alprazolam for 28 days, using Quantisal™ as collector device. Grabenauer et al [48] similarly noted that for 6-monoacetylmorphine, codeine, hydromorphone, oxymorphone and morphine were stable in neat oral fluid at both refrigerator (8 °C) and freezer (-20 °C) temperatures for up to 4 weeks. Hydrocodone was reported by Grabenauer et al [48] to be unstable under refrigerator conditions for over 7 days, but our results ensured its stability for up to 15 days (Table 6), which assured Quantisal™ buffer efficiency in compound stability. In our results, 7-aminoclonazepam showed poor stability at -20°C for 7 days (Table 5), in accordance to the literature [49, 50]. Alprazolam, clonazepam, diazepam, nordiazepam and oxazepam, which were stable for 60 days in freezer conditions (Table 5), agreeing with the results by Lurd et al [50].

Our results showed that all antidepressants investigated in this method were stable under freezer conditions (-20 °C) for 60 days, at room temperature (25 °C) for 3 days and at refrigerator temperature (4 °C) for 7 days. Stability performed in autosampler (10 °C) demonstrated that all antidepressants remained stable for 24 h (Table 4), which is in accordance to the results of Coulter et al and Shin et al.

Among method limitations, the lack of stability under -20 °C of 7-amino metabolites (as 7-aminoclonazepam and 7-aminoflunitrazepam) appeared as a problem which Quantisal™ was unable to solve. Vindenes et al [51] reported that 7-amino metabolites are more commonly found in oral fluid than the parent drug, which implies that collection and process sample should be done as soon as possible. The similar phenomenon was observed for sertraline and nortriptyline at room temperature (25 °C) (Table 4) which appears to be a problem for on-site collection and storage during more than 3 days.

Another limitation of our method was the impossibility of distinguishing citalopram and escitalopram (optical isomers).

To prove that the developed method fit the purpose, 38 oral fluid samples were analyzed. All samples were collected from volunteers above 18 years old in parties and electronic music festivals. The incidence of the present drugs, which are psychoactive, is much higher than that so-called new psychoactive substances (NPS) in common human society [52]. This is the reason why we have presented the details of simple and sensitive analytical method for the 50 psychotropic drugs (largely prescription drugs) in this article.

## Conclusions

A sensitive method based on LLE and LC–MS/MS was developed to quantify 50 psychoactive drugs in oral fluid samples, with very low limits of quantification, adequate bias and imprecision. Besides the 50 analytes incorporated in the method, a fast chromatographic run was developed, allowing analysis below 10 min and using a very simple liquid-liquid extraction procedure.

Finally, very low concentrations of the studied analytes are found in many of authentic samples, in most cases below 5 ng/mL, which justifies the need of a sensitive and specific method for monitoring drugs in oral fluid.

### Acknowledgements

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, process number 2018/00432-1 and 2018/11849-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, process number 425814/2018-1) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil-CAPES (Finance Code 001) by the financial support.

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest associated with this manuscript.

**Ethical approval** All procedures performed in this study involving urine samples from human volunteers were in accordance with the ethical standards of the University of Campinas committee (Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP—CEP, CAAE 58187816.6.0000.5404), and with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

**Informed consent** Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

## References

1. Drummer OH (2006) Drug testing in oral fluid. *Clin Biochem Rev* 27:147–159 (PMID: 17268583) (open access article)
2. Choo RE, Huestis MA (2004) Oral fluid as a diagnostic tool. *Clin Chem Lab Med* 42:1273–1287. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2004.248>
3. Verstraete AG (2005) Oral fluid testing for driving under the influence of drugs: history, recent progress and remaining challenges. *Forensic Sci Int* 150:143–150. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.11.023>
4. De Giovanni N, Fucci N (2008) The state of the art on the use of oral fluid as alternative specimen in forensic toxicology. *Curr Pharm Anal* 4:258–273. <https://doi.org/10.2174/157341208786306180>
5. Pil K, Verstraete A (2008) Current developments in drug testing in oral fluid. *Ther Drug Monit* 30:196–202. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e318167d563>
6. Bosker WM, Huestis MA (2009) Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clin Chem* 55:1910–1931. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.108670> (open access article)
7. White RM, Moore CM (2018) Oral fluid pharmacokinetics. In: Thomas B (ed) *Detection of drugs and their metabolites in oral fluid*, 1st ed., Elsevier, Amsterdam, pp 11–39
8. White RM, Moore CM (2018) Concluding Remarks. In: Thomas B (ed) *Detection of drugs and their metabolites in oral fluid*, 1st ed. Amsterdam, pp 117–119
9. Kintz P, Samyn N (2002) Use of alternative specimens: drugs of abuse in saliva and doping agents in hair. *Ther Drug Monit* 24:239–246. <https://doi.org/10.1097/00007691-200204000-00006>
10. Verstraete AG, Raes E (2006) Rosita-2 project – final report. [https://ec.europa.eu/transport/road\\_safety/sites/roadsafety/files/pdf/projects\\_sources/rosita2\\_final\\_report.pdf](https://ec.europa.eu/transport/road_safety/sites/roadsafety/files/pdf/projects_sources/rosita2_final_report.pdf). Accessed 4 Aug 2020
11. da Cunha KF, Oliveira KD, Huestis MA, Costa JL (2020) Screening of 104 new psychoactive substances (NPS) and other drugs of abuse in oral fluid by LC–MS–MS. *J Anal Toxicol.* 44:699–707. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa089>
12. Mohr ALA, Friscia M, Yeakel JK, Logan BK (2018) Use of synthetic stimulants and hallucinogens in a cohort of electronic dance music festival attendees. *Forensic Sci Int* 282:168–178. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.11.017>
13. AAFS Standards Board (2019) Standard practices for method validation in forensic toxicology. [http://www.asbstandardsboard.org/wp-content/uploads/2019/11/036\\_Std\\_e1.pdf](http://www.asbstandardsboard.org/wp-content/uploads/2019/11/036_Std_e1.pdf). Accessed 28 Jul 2020
14. Society of Toxicological and Forensic Chemistry (2018) Guideline for quality control in forensic-toxicological analyses. <https://cutt.ly/wfhwFW8>. Accessed 1 Aug 2020
15. Jeirani Z, Mohamed Jan B, Si Ali B, Mohd. Noor I, Chun Hwa S, Saphanuchart W (2012) The optimal mixture design of experiments: alternative method in optimizing the aqueous phase composition of a microemulsion. *Chemometr Intell Lab Syst* 112:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2011.10.008>
16. World Health Organization - WHO (2016) Drug use and road safety: a policy brief. [https://www.who.int/substance\\_abuse/drug\\_use\\_road\\_safety/en/](https://www.who.int/substance_abuse/drug_use_road_safety/en/). Accessed 31 Jul 2020
17. Marillier M, Verstraete AG (2019) Driving under the influence of drugs. *WIREs Forensic Sci* 1:e1326. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1326>
18. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction - EMCDDA (2012) Driving under the influence of drugs, alcohol and medicines in Europe — findings from the DRUID project. [https://www.emcdda.europa.eu/publications/thematic-papers/druid\\_en](https://www.emcdda.europa.eu/publications/thematic-papers/druid_en). Accessed 02 Aug 2020
19. Verstraete A, Knoche A, Jantos R, Skopp G, Gjerde H, Vindenes V., Mørland J, Langel K, Lillsunde P (2011) Per se limits: methods of defining cut-off values for zero tolerance. *DRUID (Driving*



under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines). <https://biblio.ugent.be/publication/1988464>. Accessed 2 Aug 2020 (open access article)

20. Brcak M, Beck O, Bosch T, Carmichael D, Fucci N, George C, Piper M, Salomone A, Schielen W, Steinmeyer S, Taskinen S, Weinmann W (2018) European guidelines for workplace drug testing in oral fluid. *Drug Test Anal* 10:402–415. <https://doi.org/10.1002/dta.2229>

21. The United Nations Office on Drugs and Crime - UNODC (2014) Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and oral fluid. <https://www.unodc.org/unodc/en/scientists/guidelines-for-testing-drugs-under-international-control-in-hair-sweat-and-oral-fluid.html>. Accessed 2 Aug 2020

22. Moore C, Coulter C, Crompton K, Zumwalt M (2007) Determination of benzodiazepines in oral fluid using LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 31:596–600 <https://doi.org/10.1093/jat/31.9.596> (open access article)

23. Quintela O, Cruz A, de Castro A, Concheiro M, López-Rivadulla M (2005) Liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry for the determination of nine selected benzodiazepines in human plasma and oral fluid. *J Chromatogr B* 825:63–71. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.12.038>

24. Kintz P, Villain M, Concheiro M, Cirimele V (2005) Screening and confirmatory method for benzodiazepines and hypnotics in oral fluid by LC-MS/MS. *Forensic Sci Int* 150:213–220. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.12.040>

25. Tuyay J, Coulter C, Rodrigues W, Moore C (2012) Disposition of opioids in oral fluid: importance of chromatography and mass spectral transitions in LC-MS/MS. *Drug Test Anal* 4:395–401. <https://doi.org/10.1002/dta.1324>

26. Enders JR, McIntire GL (2015) A dilute-and-shoot LC-MS method for quantitating opioids in oral fluid. *J Anal Toxicol* 39:662–667. <https://doi.org/10.1093/jat/bkv087> (open access article)

27. Dziurkowska E, Wesolowski M (2017) Simultaneous quantification of citalopram and its main metabolite, desmethylcitalopram, in human saliva by UHPLC. *Curr Anal Chem* 14:554–561. <https://doi.org/10.2174/1573411013666171113144352> (open access article)

28. De Castro A, Concheiro M, Quintela Ó, Cruz A, López-Rivadulla M (2005) Detección de fluoxetina y su metabolito activo norfluoxetina mediante LC-MS en plasma y saliva. *Rev Toxicol* 22:142–149 (in Spanish with English abstract) (open access article)

29. Coulter C, Taruc M, Tuyay J, Moore C (2010) Antidepressant drugs in oral fluid using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 34:64–72. <https://doi.org/10.1093/jat/34.2.64> (open access article)

30. Uddin MN, Samanidou VF, Papadoyannis IN (2009) HPLC method for simultaneous determination of 1,4-benzodiazepines and tricyclic antidepressants in pharmaceutical formulations and saliva – a useful tool in medicinal chemistry. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 32:1475–1504. <https://doi.org/10.1080/10826070902901499>

31. Cone EJ, DePriest AZ, Heltsley R, Black DL, Mitchell JM, LoDico C, Flegel R (2015) Prescription opioids. III. Disposition of oxycodone in oral fluid and blood following controlled single-dose administration. *J Anal Toxicol* 39:192–202. <https://doi.org/10.1093/jat/bku176> (open access article)

32. Danaceau JP, Chambers EE, Fountain KJ (2013) Direct analysis of opioids and metabolites in oral fluid by mixed-mode  $\mu$ Elution SPE combined with UPLC-MS/MS for forensic toxicology.

(application report No. APNT134775979). [https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134775979&locale=pt\\_BR](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134775979&locale=pt_BR). Accessed 4 Aug 2020

33. Kim I, Barnes AJ, Oyler JM, Schepers R, Joseph RE Jr, Cone EJ, Lafko D, Moolchan ET, Huestis MA (2002) Plasma and oral fluid pharmacokinetics and pharmacodynamics after oral codeine administration. *Clin Chem* 48:1486–1496. <https://doi.org/10.1093/clinchem/48.9.1486> (open access article)

34. Rohrig TP, Moore C (2003) The determination of morphine in urine and oral fluid following ingestion of poppy seeds. *J Anal Toxicol* 27:449–452. <https://doi.org/10.1093/jat/27.7.449> (open access article)

35. de Castro A, Concheiro M, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M (2008) 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* 48:183–193. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.05.024>
36. Ngwa G, Fritch D, Blum K, Newland G (2007) Simultaneous analysis of 14 benzodiazepines in oral fluid by solid-phase extraction and LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 31:369–376. <https://doi.org/10.1093/jat/31.7.369> (open access article)
37. Truver MT, Swortwood MJ (2018) Quantitative analysis of novel synthetic opioids, morphine and buprenorphine in oral fluid by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 42:554–561. <https://doi.org/10.1093/jat/bky053>
38. Heiskanen T, Langel K, Gunnar T, Lillsunde P, Kalso EA (2015) Opioid concentrations in oral fluid and plasma in cancer patients with pain. *J Pain Symptom Manage* 50:524–532. <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2014.09.004>
39. Wille SMR, Raes E, Lillsunde P, Gunnar T, Laloup M, Samyn N, Christophersen AS, Moeller MR, Hammer KP, Verstraete AG (2009) Relationship between oral fluid and blood concentrations of drugs of abuse in drivers suspected of driving under the influence of drugs. *Ther Drug Monit* 31:511–519. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e3181ae46ea>
40. Jang M, Chang H, Yang W, Choi H, Kim E, Yu B-H, Oh Y, Chung H (2013) Development of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of 25 benzodiazepines and zolpidem in oral fluid and its application to authentic samples from regular drug users. *J Pharm Biomed Anal* 74:213–222. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.11.002>
41. Griswold MK, Chai PR, Krotulski AJ, Friscia M, Chapman BP, Varma N, Boyer EW, Logan BK, Babu KM (2017) A novel oral fluid assay (LC-QTOF-MS) for the detection of fentanyl and clandestine opioids in oral fluid after reported heroin overdose. *J Med Toxicol* 13:287–292. <https://doi.org/10.1007/s13181-017-0632-6>
42. Heiskanen T, Langel K, Gunnar T, Lillsunde P, Kalso EA (2015) Opioid concentrations in oral fluid and plasma in cancer patients with pain. *J Pain Symptom Manage* 50:524–532. <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2014.09.004> (open access article)
43. Kunkel F, Fey E, Borg D, Stripp R, Getto C (2015) Assessment of the use of oral fluid as a matrix for drug monitoring in patients undergoing treatment for opioid addiction. *J Opioid Manag* 11:435–442. <https://doi.org/10.5055/jom.2015.0293>
44. Herrera-Gómez F, García-Mingo M, Colás M, González-Luque JC, Álvarez FJ (2018) Opioids in oral fluid of Spanish drivers. *Drug Alcohol Depend* 187:35–39. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2018.02.016>
45. Fierro I, Colás M, González-Luque JC, Álvarez FJ (2017) Roadside opioid testing of drivers using oral fluid: the case of a country with a zero tolerance law, Spain. *Subst Abuse Treat Prev Policy* 12:1–7. <https://doi.org/10.1186/s13011-017-0108-3> (open access article)
46. Shin SS, Borg D, Stripp R (2020) Developing and validating a fast and accurate method to quantify 18 antidepressants in oral fluid samples using SPE and LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 610–617. <https://doi.org/10.1093/jat/bkz117>
47. Langel K, Engblom C, Pehrsson A, Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P (2008) Drug testing in oral fluid – evaluation of sample collection devices. *J Anal Toxicol* 32:393–401. <https://doi.org/10.1093/jat/32.6.393> (open access article)
48. Grabenauer M, Moore KN, Bynum ND, White RM, Mitchell JM, Hayes ED, Flegel R (2018) Development of a quantitative LC-MS-MS assay for codeine, morphine, 6-acetylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone and oxymorphone in neat oral fluid. *J Anal Toxicol* 42:392–399. <https://doi.org/10.1093/jat/bky021> (open access article)
49. Dahlin JL, Petrides AK (2018) Instability of 7-aminoclonazepam in frozen storage conditions. *Clin Mass Spectrom* 9:23–24. <https://doi.org/10.1016/j.clinms.2018.07.002> (open access article)
50. Lund HME, Øiestad EL, Gjerde H, Christophersen AS (2011) Drugs of abuse in oral fluid collected by two different sample kits – stability testing and validation using ultra performance tandem mass spectrometry analysis. *J Chromatogr B* 879:3367–3377. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.002>

51. Vindenes V, Strand DH, Koksæter P, Gjerde H (2016) Detection of nitrobenzodiazepines and their 7-amino metabolites in oral fluid. *J Anal Toxicol* 40:310–312. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw020> (open access article)
52. Pardi J, Toriello A, Cooper G (2020) Evaluation of 4-fluoroisobutyrylfentanyl in blood samples from 247 authentic cases submitted to the New York City Office of Chief Medical Examiner in 2017–2018. *Forensic Toxicol* 38:340–351. <https://doi.org/10.1007/s11419-019-00518-6>

**Table 1** Linearity parameters, quality control concentrations and correlation coefficients (*r*) for all 50 substances of analytical method

Analyte	Linearity (ng/mL)	LQC (ng/ml)	MQC (ng/ml)	HQC (ng/ml)	r <sup>2</sup>
Alprazolam	0.5 – 25.0	1.5	8.0	20.0	0.994
7-Aminoclonazepam	0.5 – 25.0	1.5	8.0	20.0	0.998
7-Aminoflunitrazepam	0.5 – 25.0	1.5	8.0	20.0	0.996
Amitriptyline	0.5 – 50.0	1.5	25.0	40.0	0.998
Bromazepam	0.5 – 25.0	1.5	8.0	20.0	0.999
Buprenorphine	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.998
Bupropion	0.5 – 50.0	1.5	25.0	40.0	0.998
Citalopram	0.5 – 50.0	1.5	25.0	40.0	0.997
Clomipramine	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.995
Clonazepam	0.5 – 25.0	1.5	8.0	20.0	0.999
Codeine	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.997
Desipramine	0.5 – 50.0	1.5	25.0	40.0	0.999
Desmethylcitalopram	0.5 – 50.0	1.5	25.0	40.0	0.997
<i>N</i> -Desmethyltramadol	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.998
Desmethylvenlafaxine	0.5 – 50.0	1.5	25.0	40.0	0.998
Diazepam	0.5 – 25.0	1.5	8.0	20.0	0.999
Doxepin	0.5 – 50.0	1.5	25.0	40.0	0.997
Duloxetine	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.992
Fentanyl	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.996
Flunitrazepam	0.5 – 25.0	1.5	8.0	20.0	0.996
Fluoxetine	0.5 – 50.0	1.5	25.0	40.0	0.993
Hydrocodone	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.996
Hydromorphone	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.997
Hydroxybupropion	0.5 – 50.0	1.5	25.0	40.0	0.999
Imipramine	0.5 – 50.0	1.5	25.0	40.0	0.994
Lorazepam	0.5 – 25.0	1.5	8.0	20.0	0.998
Meperidine	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.997
Methadone	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.993
Midazolam	0.5 – 25.0	1.5	8.0	20.0	0.999
Mirtazapine	0.5 – 50.0	1.5	25.0	40.0	0.997
6-Monoacetylmorphine	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.998
Morphine	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.998
Naloxone	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.998
Naltrexone	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.998
Nitrazepam	0.5 – 25.0	1.5	8.0	20.0	0.998
Nordiazepam	0.5 – 25.0	1.5	8.0	20.0	0.995
Norfluoxetine	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.993
Norsertaline	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.995
Nortriptyline	0.5 – 50.0	1.5	25.0	40.0	0.997
Oxazepam	0.5 – 25.0	1.5	8.0	20.0	0.997
Oxycodone	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.986
Oxymorphone	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.997
Paroxetine	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.999
Sertraline	0.5 – 50.0	1.5	25.0	40.0	0.992
Temazepam	0.5 – 25.0	1.5	8.0	20.0	0.998
Tramadol	1.0 – 50.0	3.0	25.0	40.0	0.996
Trazodone	0.5 – 50.0	1.5	25.0	40.0	0.996
Trimipramine	0.5 – 50.0	1.5	25.0	40.0	0.999
Venlafaxine	0.5 – 50.0	1.5	25.0	40.0	1.000

---

Zolpidem	0.5 – 25.0	1.5	8.0	20.0	0.998
----------	------------	-----	-----	------	-------

---

*LQC* low quality control, *MQC* medium quality control, *HQC* high quality control.

**Table 2** Mass spectrometer parameters, retention times and internal standards for analyses of 50 analytes (antidepressants, benzodiazepines and opioids) in oral fluid samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

Analyte	Retention time (min)	MRM transitions ( $m/z$ )	Dwell time (ms)	Q1 pre bias (V)	CE (eV)	Q3 pre bias (V)	Internal standard
Alprazolam	5.67	<u>309.2 &gt; 281.0</u>	10	-15	-27	-18	Diazepam- $d_5$
		309.2 > 205.1	10	-23	-45	-20	
7-Aminoclonazepam	3.79	<u>286.0 &gt; 222.0</u>	10	-20	-26	-23	Clonazepam- $d_4$
		286.0 > 250.0	10	-21	-21	-16	
7-Aminoflunitrazepam	4.23	<u>284.0 &gt; 135.0</u>	10	-20	-27	-13	Clonazepam- $d_4$
		284.0 > 227.0	10	-11	-26	-25	
Amitriptyline	5.37	<u>278.1 &gt; 233.1</u>	5	-30	-18	-15	Bupropion- $d_9$
		278.1 > 191.0	5	-14	-27	-12	
Bromazepam	4.64	<u>318.0 &gt; 182.1</u>	10	-12	-33	-18	Diazepam- $d_5$
		318.0 > 209.0	10	-16	-28	-20	
Buprenorphine	4.80	<u>468.3 &gt; 55.0</u>	30	-14	-54	-20	Codeine- $d_3$
		468.3 > 396.0	30	-14	-40	-26	
Bupropion	3.91	<u>240.1 &gt; 184.0</u>	5	-26	-13	-12	Bupropion- $d_9$
		240.1 > 166.0	5	-28	-19	-29	
Bupropion- $d_9$	3.90	249.1 > 185.1	5	-26	-13	-19	-
		249.1 > 131.1	5	-12	-28	-12	
Citalopram	4.74	<u>325.1 &gt; 262.0</u>	5	-17	-20	-17	Citalopram- $d_6$
		325.1 > 109.0	5	-17	-28	-21	
Citalopram- $d_6$	4.73	331.1 > 190.0	5	-16	-27	-19	-
		331.1 > 262.0	5	-16	-21	-17	
Clomipramine	6.00	<u>315.1 &gt; 270.1</u>	5	-10	-19	-30	Duloxetine- $d_3$
		315.1 > 242.0	5	-16	-27	-15	
Clonazepam	5.60	<u>316.0 &gt; 270.0</u>	10	-24	-26	-12	Clonazepam- $d_4$
		316.0 > 214.1	10	-23	-40	-22	
Clonazepam- $d_4$	5.58	320.0 > 274.0	10	-16	-27	-29	-
		320.0 > 218.0	10	-16	-39	-21	
Codeine	2.73	<u>300.2 &gt; 165.1</u>	30	-15	-35	-15	Codeine- $d_3$
		300.2 > 215.0	30	-15	-35	-15	
Codeine- $d_3$	2.72	303.0 > 165.0	30	-12	-40	-17	-
		303.0 > 199.0	30	-12	-30	-20	
Desipramine	5.10	<u>267.1 &gt; 208.0</u>	5	-30	-24	-22	Bupropion- $d_9$
		267.1 > 72.1	5	-29	-18	-12	
Desmethylocitalopram	4.64	<u>311.1 &gt; 262.0</u>	5	-16	-18	-17	Citalopram- $d_6$
		311.1 > 109.0	5	-16	-24	-10	
<i>N</i> -Desmethyltramadol	3.55	<u>250.2 &gt; 44.0</u>	5	-29	-13	-16	Codeine- $d_3$
		250.2 > 232.1	5	-28	-9	-15	
Desmethylvenlafaxine	3.17	<u>264.1 &gt; 58.0</u>	5	-29	-22	-22	Bupropion- $d_9$
		264.1 > 246.1	5	-29	-13	-25	
Diazepam	6.32	<u>285.0 &gt; 193.1</u>	10	-11	-27	-15	Diazepam- $d_5$
		285.0 > 154.0	10	-21	-33	-19	
Diazepam- $d_5$	6.29	290.0 > 198.0	10	-22	-34	-19	-
		290.0 > 154.0	10	-21	-28	-30	
Doxepin	4.86	<u>280.1 &gt; 107.0</u>	5	-30	-22	-10	Citalopram- $d_6$
		280.1 > 220.0	5	-14	-27	-14	
Duloxetine	5.30	<u>298.1 &gt; 44.0</u>	5	-14	-17	-17	Duloxetine- $d_3$
		298.1 > 154.1	5	-27	-9	-27	
Duloxetine- $d_3$	5.29	301.1 > 157.0	5	-25	-8	-25	-
		301.1 > 47.0	5	-15	-15	-17	
Fentanyl	4.66	<u>337.2 &gt; 105.0</u>	30	-17	-39	-18	Codeine- $d_3$
		337.2 > 188.0	30	-18	-24	-18	
Flunitrazepam	6.00	<u>314.2 &gt; 268.1</u>	10	-12	-26	-17	Diazepam- $d_5$

		314.2 > 239.1	10	-23	-35	-24	
Fluoxetine	5.25	<u>310.0 &gt; 148.1</u>	5	-15	-9	-15	Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>
		310.0 > 44.0	5	-15	-12	-15	
Hydrocodone	3.07	<u>300.1 &gt; 199.0</u>	30	-16	-31	-20	Codeine- <i>d</i> <sub>3</sub>
		300.1 > 171.0	30	-15	-39	-17	
Hydromorphone	2.27	<u>286.2 &gt; 184.9</u>	30	-18	-30	-18	Morphine- <i>d</i> <sub>3</sub>
		286.2 > 153.0	30	-15	-46	-27	
Hydroxybupropion	3.42	<u>256.0 &gt; 167.0</u>	5	-13	-22	-16	Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>
		256.0 > 238.0	5	-29	-13	-16	
Imipramine	5.23	<u>281.1 &gt; 208.0</u>	5	-30	-26	-13	Duloxetine- <i>d</i> <sub>3</sub>
		281.1 > 193.0	5	-14	-41	-12	
Lorazepam	5.31	<u>321.0 &gt; 275.0</u>	10	-23	-23	-12	Diazepam- <i>d</i> <sub>5</sub>
		321.0 > 229.0	10	-24	-29	-15	
Meperidine	3.83	<u>248.2 &gt; 220.1</u>	30	-12	-22	-22	Codeine- <i>d</i> <sub>3</sub>
		248.2 > 174.1	30	-10	-20	-17	
Methadone	5.40	<u>311.2 &gt; 266.0</u>	30	-25	-15	-17	Codeine- <i>d</i> <sub>3</sub>
		311.2 > 105.0	30	-23	-28	-18	
Midazolam	4.64	<u>326.0 &gt; 291.0</u>	10	-24	-28	-19	Clonazepam- <i>d</i> <sub>4</sub>
		326.0 > 249.2	10	-25	-39	-28	
Mirtazapine	3.74	<u>266.1 &gt; 195.1</u>	5	-13	-26	-12	Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>
		266.1 > 209.0	5	-28	-21	-21	
6-Monoacetylmorphine	2.89	<u>328.1 &gt; 165.2</u>	30	-24	-39	-16	Codeine- <i>d</i> <sub>3</sub>
		328.1 > 211.2	30	-16	-27	-13	
Morphine	1.95	<u>286.2 &gt; 152.1</u>	30	-18	-55	-30	Morphine- <i>d</i> <sub>3</sub>
		286.2 > 201.0	30	-10	-27	-20	
Morphine- <i>d</i> <sub>3</sub>	1.94	289.2 > 165.0	30	-15	-41	-29	-
		289.2 > 153.0	30	-21	-41	-29	
Naloxone	2.66	<u>328.1 &gt; 310.0</u>	30	-10	-20	-20	Codeine- <i>d</i> <sub>3</sub>
		328.1 > 268.0	30	-17	-27	-30	
Naltrexone	2.94	<u>342.1 &gt; 324.0</u>	30	-10	-22	-22	Codeine- <i>d</i> <sub>3</sub>
		342.1 > 282.0	30	-17	-28	-29	
Nitrazepam	5.38	<u>282.2 &gt; 236.2</u>	10	-14	-25	-15	Clonazepam- <i>d</i> <sub>4</sub>
		282.2 > 180.2	10	-14	-41	-17	
Nordiazepam	5.58	<u>271.2 &gt; 140.2</u>	30	-14	-29	-13	Diazepam- <i>d</i> <sub>5</sub>
		271.2 > 208.2	30	-30	-29	-23	
Norfluoxetine	5.12	<u>296.1 &gt; 30.0</u>	5	-20	-14	-27	Duloxetine- <i>d</i> <sub>3</sub>
		296.1 > 134.0	5	-15	-8	-29	
Norsertaline	5.37	<u>274.9 &gt; 158.9</u>	5	-20	-20	-16	Duloxetine- <i>d</i> <sub>3</sub>
		274.95 > 91.0	5	-13	-16	-16	
Nortriptyline	5.24	<u>264.1 &gt; 233.1</u>	5	-13	-15	-10	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>
		264.1 > 91.0	5	-13	-22	-16	
Oxazepam	5.21	<u>287.0 &gt; 241.0</u>	10	-30	-24	-26	Diazepam- <i>d</i> <sub>5</sub>
		287.0 > 104.1	10	-29	-36	-20	
Oxycodone	2.96	<u>316.1 &gt; 298.0</u>	30	-16	-20	-20	Codeine- <i>d</i> <sub>3</sub>
		316.1 > 241.0	30	-16	-29	-24	
Oxymorphone	2.10	<u>302.1 &gt; 284.0</u>	30	-16	-20	-19	Morphine- <i>d</i> <sub>3</sub>
		302.1 > 227.0	30	-15	-30	-22	
Paroxetine	5.09	<u>330.0 &gt; 192.1</u>	5	-17	-21	-20	Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>
		330.0 > 70.1	5	-17	-29	-12	
Sertraline	5.53	<u>306.2 &gt; 275.0</u>	5	-16	-13	-19	Duloxetine- <i>d</i> <sub>3</sub>
		306.2 > 158.9	5	-15	-27	-15	
Temazepam	5.82	<u>301.2 &gt; 255.0</u>	10	-15	-23	-11	Diazepam- <i>d</i> <sub>5</sub>
		301.2 > 177.1	10	-15	-40	-18	
Tramadol	3.55	<u>264.1 &gt; 58.0</u>	30	-13	-22	-22	Codeine- <i>d</i> <sub>3</sub>
		264.1 > 58.0	30	-13	-22	-22	
Trazodone	4.40	<u>372.1 &gt; 176.1</u>	5	-11	-25	-11	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>
		372.1 > 148.0	5	-18	-34	-29	
Trimipramine	5.46	<u>295.2 &gt; 100.1</u>	5	-15	-18	-19	Citalopram- <i>d</i> <sub>6</sub>
		295.2 > 58.0	5	-15	-33	-10	
Venlafaxine	4.01	<u>278.1 &gt; 260.1</u>	5	-14	-13	-12	Bupropion- <i>d</i> <sub>9</sub>
		278.1 > 58.0	5	-30	-22	-25	

Zolpidem	4.14	<u>308.1 &gt; 235.0</u>	10	-16	-35	-24	Clonazepam- <i>d</i> <sub>4</sub>
		<u>308.1 &gt; 92.0</u>	10	-17	-52	-16	

---

The quantifier multiple reaction monitoring (MRM) transitions are underlined. *CE* collision energy



**Table 3** Method validation results for within and between-run imprecisions, biases, matrix effects, and recoveries for analyses of 50 substances in oral fluid samples using LC-MS/MS

Analyte	Within-run imprecision (%RSD)			Between-run imprecision (%RSD)			Bias (%)			Matrix Effect (%)		Recovery (%)	
	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC
Alprazolam	11	8	12	10	7	10	6	4	9	-6	-8	56	55
7-Aminoclonazepam	9	8	11	9	7	10	9	10	9	-4	-25	72	49
7-Aminoflunitrazepam	8	9	6	7	7	6	7	6	4	-15	-20	55	57
Amitriptyline	7	8	7	6	7	6	6	-2	7	-1	-2	88	87
Bromazepam	9	11	14	8	9	11	6	6	9	-1	-1	74	67
Buprenorphine	8	3	8	7	3	7	1	0	2	3	10	99	88
Bupropion	8	3	3	6	2	3	7	-11	0	24	25	105	130
Citalopram	5	3	6	4	2	5	6	-10	4	-3	-3	92	84
Clomipramine	11	7	4	10	7	4	-2	-8	0	8	6	87	86
Clonazepam	5	8	4	5	7	4	3	4	2	-3	-3	72	77
Codeine	8	5	6	7	5	5	4	3	4	3	2	43	44
Desipramine	7	6	2	6	5	3	3	-2	1	-8	-8	93	82
Desmethylcitalopram	4	3	5	4	3	4	3	-9	2	-5	-4	85	78
<i>N</i> -Desmethyltramadol	11	7	6	10	6	5	-1	0	2	6	-2	65	63
Desmethylvenlafaxine	6	6	6	5	5	5	7	-5	6	-5	-6	83	79
Diazepam	5	5	3	4	4	3	3	1	4	-13	-13	81	79
Doxepin	7	3	5	6	3	4	5	-8	3	1	1	91	86
Duloxetine	8	6	2	8	6	3	-5	-5	1	0	-7	87	87
Fentanyl	5	6	7	4	5	7	-2	0	2	17	14	83	80
Flunitrazepam	5	5	4	5	4	3	0	-1	2	-6	-7	80	73
Fluoxetine	9	10	8	8	8	7	7	-4	6	-7	-9	92	84
Hydrocodone	7	13	11	6	11	10	2	2	5	5	5	48	48
Hydromorphone	8	5	11	7	5	9	8	4	4	7	7	23	23
Hydroxybupropion	7	7	8	6	6	6	8	-4	7	0	-1	86	85
Imipramine	4	6	7	5	6	6	4	-4	3	3	1	92	86
Lorazepam	12	9	9	10	8	7	16	15	16	-4	-4	76	73
Meperidine	10	11	14	9	9	12	-1	1	6	7	-3	86	83
Methadone	17	11	6	14	9	6	-1	2	1	11	1	86	83
Midazolam	7	6	11	7	5	9	13	11	10	-7	-7	80	76

Mirtazapine	6	7	4	5	6	4	8	-1	3	10	-4	85	86
6-Monoacetylmorphine	8	6	4	7	6	4	6	2	0	22	15	70	70
Morphine	5	7	10	4	7	8	7	4	2	7	6	20	21
Naloxone	8	18	16	7	14	14	7	13	9	-1	-1	73	76
Naltrexone	10	13	13	9	11	11	9	7	5	15	15	79	81
Nitrazepam	10	12	2	8	10	3	3	1	0	-1	-1	78	74
Nordiazepam	6	4	4	6	4	4	-3	-6	-3	-7	-8	79	73
Norfluoxetine	20	9	11	19	8	10	-5	-10	-4	6	-14	87	92
Norsertaline	13	11	10	11	10	9	-3	-13	-4	17	4	88	91
Nortriptyline	5	1	3	5	2	3	8	-5	-1	-6	-5	92	86
Oxazepam	13	14	9	11	11	7	16	14	14	-1	-2	75	71
Oxycodone	8	11	9	7	9	8	7	7	-1	6	5	59	59
Oxymorphone	11	13	16	9	11	13	13	10	10	8	6	32	35
Paroxetine	6	11	8	6	9	7	-3	-8	2	1	-3	85	85
Sertraline	13	8	7	11	7	7	7	-4	3	-18	-18	89	86
Temazepam	10	7	6	8	6	5	10	8	11	-7	-7	79	73
Tramadol	7	9	11	7	8	9	1	5	7	5	-3	82	81
Trazodone	8	3	4	6	3	3	7	-8	2	-3	-3	86	85
Trimipramine	5	3	1	5	3	1	4	-8	0	0	0	87	84
Venlafaxine	18	12	6	15	10	5	7	-3	7	-1	-2	86	83
Zolpidem	6	5	13	6	5	11	13	9	10	-4	-3	66	63

*LQC* low quality control, *MQC* medium quality control, *HQC* high quality control, *RSD* relative standard deviation

**Table 4** Antidepressant sample stability values expressed as percentage changes for autosampler (at 10 °C for 24 h), freeze/thaw cycles, room temperature (25 °C), refrigerator (4 °C) and freezer (-20 °C) after 3, 7, 15, 30 and 60 days, respectively

Analyte	Quality control concentration	Autosampler (10 °C)	R. Temp (25 °C)		Refrigerator (4 °C)			Freezer (-20 °C)					F/T cycles
		24 h	3 days	7 days	3 days	7 days	15 days	3 days	7 days	15 days	30 days	60 days	3 cycles
Amitriptyline	LQC	0	-2	3	-1	0	-12	-3	13	-8	9	-3	6
	HQC	0	-9	-7	-2	15	-4	-3	15	-1	10	9	-3
Bupropione	LQC	-7	-7	-14	-5	-6	-2	-6	-3	-8	-4	0	-8
	HQC	-1	-4	-19	-1	1	-6	-2	-10	-10	1	-1	-1
Citalopram	LQC	-1	-1	-1	1	-1	-2	-1	-2	-6	-1	-2	-4
	HQC	-1	1	-9	0	-1	-7	-2	-10	-10	0	-2	0
Clomipramine	LQC	-4	-15	-14	0	-1	-9	-11	-12	-11	9	-11	-13
	HQC	7	-14	-13	-6	-4	-9	-14	-14	-3	12	-6	-18
Desipramine	LQC	0	-7	7	-8	2	2	-10	10	-4	7	-3	6
	HQC	1	-9	1	-4	9	2	-4	10	-8	19	8	-6
Desmethylcitalopram	LQC	-2	2	-2	-2	-2	-3	-5	-3	-3	-4	-4	-2
	HQC	-2	2	-5	1	1	1	-1	-8	-4	2	1	0
Desmethylvenlafaxine	LQC	1	-1	15	-1	4	1	-2	10	-2	10	8	15
	HQC	0	-1	6	-1	6	0	-3	9	-1	14	9	-1
Doxepine	LQC	-1	-1	-6	-1	-2	-12	-2	-3	-9	-7	-6	-7
	HQC	0	-1	-11	0	1	-12	-1	-8	-14	-2	-6	-4
Duloxetine	LQC	0	0	-16	18	0	-14	-1	-9	-4	-8	6	-5
	HQC	0	-7	-7	-3	3	-15	-5	-10	-19	-4	-6	-8
Fluoxetine	LQC	3	18	24	-3	4	-19	0	4	-9	-3	-16	-5
	HQC	3	-8	-5	3	8	-13	-1	16	-1	14	1	-18
Hydroxybupropione	LQC	0	0	11	0	2	-1	-4	11	-1	10	9	10
	HQC	0	2	7	3	7	2	1	9	2	16	13	3
Imipramine	LQC	-3	-9	-1	-7	-10	-10	-6	-19	-4	-12	-8	-10
	HQC	4	0	-10	-3	-5	-3	-10	-17	-13	-8	-2	-10

Mirtazapine	LQC	0	1	16	2	7	0	-1	15	-3	6	5	14
	HQC	0	0	9	1	12	-3	0	12	-3	13	6	-1
Norfluoxetine	LQC	4	-17	-52	19	2	4	-1	-12	15	0	-17	36
	HQC	2	-15	-29	-8	-13	0	-13	-10	-17	3	0	-17
Norsertaline	LQC	1	-7	-79	11	-2	44	3	-21	49	4	21	10
	HQC	1	-5	-38	6	-8	15	-1	11	-2	12	14	-7
Nortriptyline	LQC	-1	2	0	-2	5	-1	2	-2	-5	4	-5	-8
	HQC	-1	-7	-12	-2	1	-6	-5	-8	-13	4	1	-5
Paroxetine	LQC	-3	-3	4	5	4	3	1	1	13	16	8	34
	HQC	0	-15	-10	-8	1	-9	-10	0	-5	13	2	-13
Sertraline	LQC	8	-11	-40	0	-5	-17	-2	-6	-15	-11	-11	-10
	HQC	9	-23	-49	-5	-10	-13	-11	-18	-11	-7	-7	-20
Trazodone	LQC	-1	1	-3	1	0	0	0	-1	1	-5	0	-7
	HQC	-1	1	-9	0	0	-4	-1	-8	-8	0	1	-10
Trimipramine	LQC	0	-5	-16	1	8	-10	0	9	-8	-7	-6	-13
	HQC	1	-9	-27	-1	6	-15	-4	0	-19	-6	-7	-5
Venlafaxine	LQC	2	-4	11	-3	2	-2	-5	8	-7	6	2	11
	HQC	0	-2	5	-2	6	-2	-4	6	-3	12	5	-2

R. Temp room temperature, F/T cycles freeze/thaw cycles. For LQC and HQC see Table 1.

**Table 5** Benzodiazepines sample stability values expressed as percentage change for autosampler (at 10 °C for 24 h), freeze/thaw cycles, room temperature (25 °C), refrigerator (4 °C) and freezer (-20 °C) for 3, 7, 15, 30 and 60 days, respectively

Analyte	Quality control concentration	Autosampler (10 °C)			R. Temp (25 °C)		Refrigerator (4 °C)			Freezer (-20 °C)					F/T cycles
		12 h	18 h	24 h	3 days	7 days	3 days	7 days	15 days	3 days	7 days	15 days	30 days	60 days	3 cycles
Alprazolam	LQC	-3	-4	0	-11	-23	4	-10	-4	5	-18	-5	-5	-7	6
	HQC	-5	-2	2	-9	-23	2	-16	-7	-1	-19	-15	-17	-7	-1
7-Aminoclonazepam	LQC	-19	-19	-33	12	-2	11	-12	-2	-5	-37	-40	-43	-38	18
	HQC	-18	-18	-26	11	-8	5	-16	-4	-6	-36	-40	-43	-41	8
7-Aminoflunitrazepam	LQC	-18	-20	-23	11	-5	13	-14	-11	-4	-32	-40	-40	-33	12
	HQC	-19	-17	-23	13	-11	4	-18	-12	-3	-33	-40	-40	-38	6
Bromazepam	LQC	-8	-3	-14	-5	-15	-6	0	-17	-16	0	-5	-8	18	-22
	HQC	-5	-1	-15	0	-6	-5	-1	-9	-9	-3	-8	-14	9	-20
Clonazepam	LQC	4	0	-2	-10	-24	3	1	3	1	4	6	10	13	1
	HQC	1	-1	-8	-17	-32	-8	-10	-3	-8	-10	-9	-6	-3	-10
Diazepam	LQC	-4	-5	-7	-7	-15	-4	0	0	-6	-5	2	3	-1	-2
	HQC	-10	-6	-14	-5	-8	-4	-5	-1	-8	-7	-1	-4	-4	-6
Flunitrazepam	LQC	1	2	4	-21	-27	-14	-5	-2	-12	-10	-3	0	1	-27
	HQC	-1	1	-2	-19	-17	-12	-5	1	-13	-5	-2	-9	-5	-17
Lorazepam	LQC	7	6	8	-11	-27	-1	-11	14	0	-9	0	2	23	-9
	HQC	2	0	1	-3	-15	0	-7	9	-4	-11	1	-5	12	-7
Midazolam	LQC	-1	-2	-1	17	-16	10	-11	-9	12	-20	-19	-13	-5	24
	HQC	-2	-3	-1	11	-12	10	-13	-3	11	-16	-13	-11	-4	21
Nitrazepam	LQC	-11	-11	-31	-5	-10	0	1	3	-10	8	15	10	10	-19
	HQC	-15	-16	-32	-10	-12	-11	0	-2	-18	3	-1	-3	-2	-27
Nordiazepam	LQC	8	5	8	-4	-23	-1	0	12	4	-3	15	9	23	-35
	HQC	7	3	5	2	-11	-23	3	-6	-13	-6	0	-4	6	-34
Oxazepam	LQC	4	5	5	-15	-22	-6	-6	-1	-9	-12	-4	1	17	-5

	HQC	1	1	0	0	-13	-1	-3	-1	-5	-14	-1	-7	4	-9
Temazepam	LQC	-2	-1	-1	-2	-9	-3	-2	9	-5	-15	-1	0	5	-4
	HQC	-2	0	-3	0	-2	0	-5	6	-5	-11	1	-4	0	-6
Zolpidem	LQC	-1	-4	0	13	-7	15	-9	0	16	-19	-11	-13	0	33
	HQC	1	-2	1	10	-13	6	-17	-2	9	-19	-15	-16	0	23

---

*R.* Temp room temperature, *FT* cycles freeze/thaw cycles. For LQC and HQC see Table 1.

**Table 6** Opioids sample stability values expressed as percentage changes for autosampler (at 10 °C for 24 h), freeze/thaw cycles, room temperature (25 °C), refrigerator (4 °C) and freezer (-20 °C) for 3, 7, 15, 30 and 60 days, respectively

Analyte	Quality control concentration	Autosampler (10 °C)	R. Temp (25 °C)		Refrigerator (4 °C)			Freezer (-20 °C)					F/T cycles
		24 h	3 days	7 days	3 days	7 days	15 days	3 days	7 days	15 days	30 days	60 days	3 cycles
Buprenorphine	LQC	2	5	9	7	16	10	-2	14	2	-5	15	-1
	HQC	7	-6	4	-7	8	0	-11	-2	-1	-13	6	-2
Codeine	LQC	4	8	11	11	13	6	8	12	8	10	10	-5
	HQC	2	1	6	-1	3	7	-1	0	7	3	3	1
<i>N</i> -Desmethyltramadol	LQC	4	2	5	6	11	9	0	12	9	7	6	-2
	HQC	11	-5	13	-5	13	10	-3	12	9	-6	-3	0
Fentanyl	LQC	1	0	0	6	10	7	-2	13	9	3	1	-8
	HQC	2	-6	12	-4	14	11	-7	4	13	0	1	-1
Hydrocodone	LQC	-1	2	-1	4	5	7	-1	8	8	9	-2	-2
	HQC	0	-3	10	-3	13	14	-2	0	15	2	-5	1
Hydromorphone	LQC	-1	2	4	10	4	14	9	5	17	19	-5	0
	HQC	4	0	5	3	6	12	0	5	12	13	-2	4
Meperidine	LQC	3	-10	3	-8	12	-6	-20	16	-4	-8	-13	-20
	HQC	2	-19	18	-17	17	0	-14	8	0	-8	-13	-18
Methadone	LQC	1	-1	5	8	21	15	5	17	8	8	-1	-4
	HQC	2	-12	6	-5	11	10	-5	1	9	-7	-4	0
6-Monoacetylmorphine	LQC	5	-1	-8	2	7	4	-2	6	5	4	4	-6
	HQC	9	-11	-8	-8	0	0	-7	0	3	-5	3	-3
Morphine	LQC	2	2	9	4	6	8	2	2	6	6	-3	-6
	HQC	1	0	16	1	8	11	1	7	8	8	-1	2
Naloxone	LQC	-1	2	11	-5	0	0	-11	-4	8	-9	20	-12
	HQC	3	2	2	-4	-1	11	-6	-4	17	4	23	-5
Naltrexone	LQC	0	7	23	8	19	11	0	13	13	10	25	-1

	HQC	-1	-6	0	-10	0	5	-8	-4	6	-4	12	-3
Oxycodone	LQC	1	-1	-1	2	5	5	-2	8	6	4	-1	-5
	HQC	-1	-3	15	-7	15	12	0	7	15	7	5	0
Oxymorphone	LQC	0	0	-1	9	18	16	6	13	17	15	4	-3
	HQC	0	-1	-3	3	15	15	3	13	17	17	6	0
Tramadol	LQC	1	0	-2	5	3	6	-7	4	8	3	1	-6
	HQC	0	-6	11	-4	10	16	-5	-1	18	0	-1	2

R. Temp room temperature, F/T cycles freeze/thaw cycles. For LQC and HQC see Table 1.

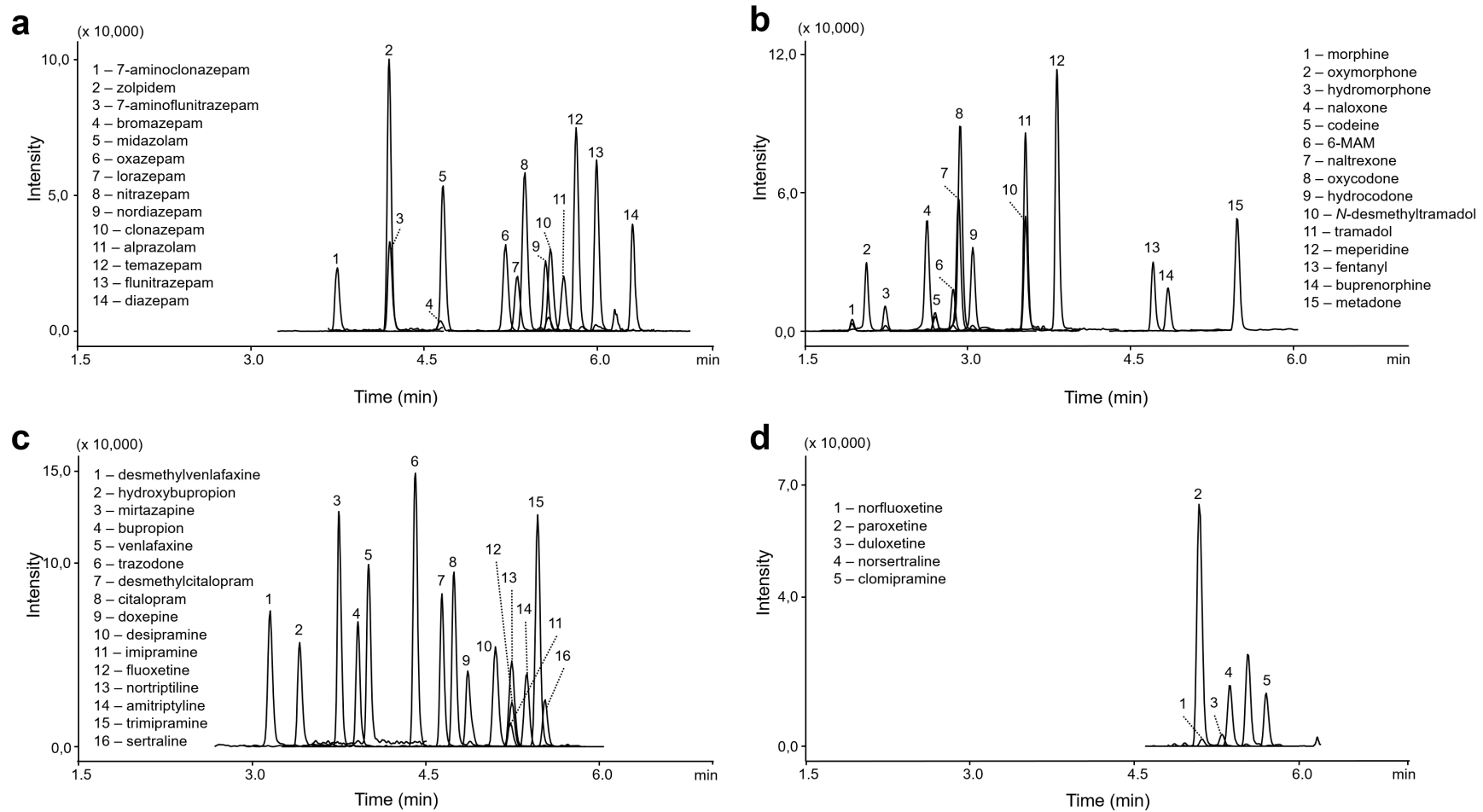


**Table 7** Results for 38 authentic oral fluid samples collected using Quantisal™ and analyzed using the developed method

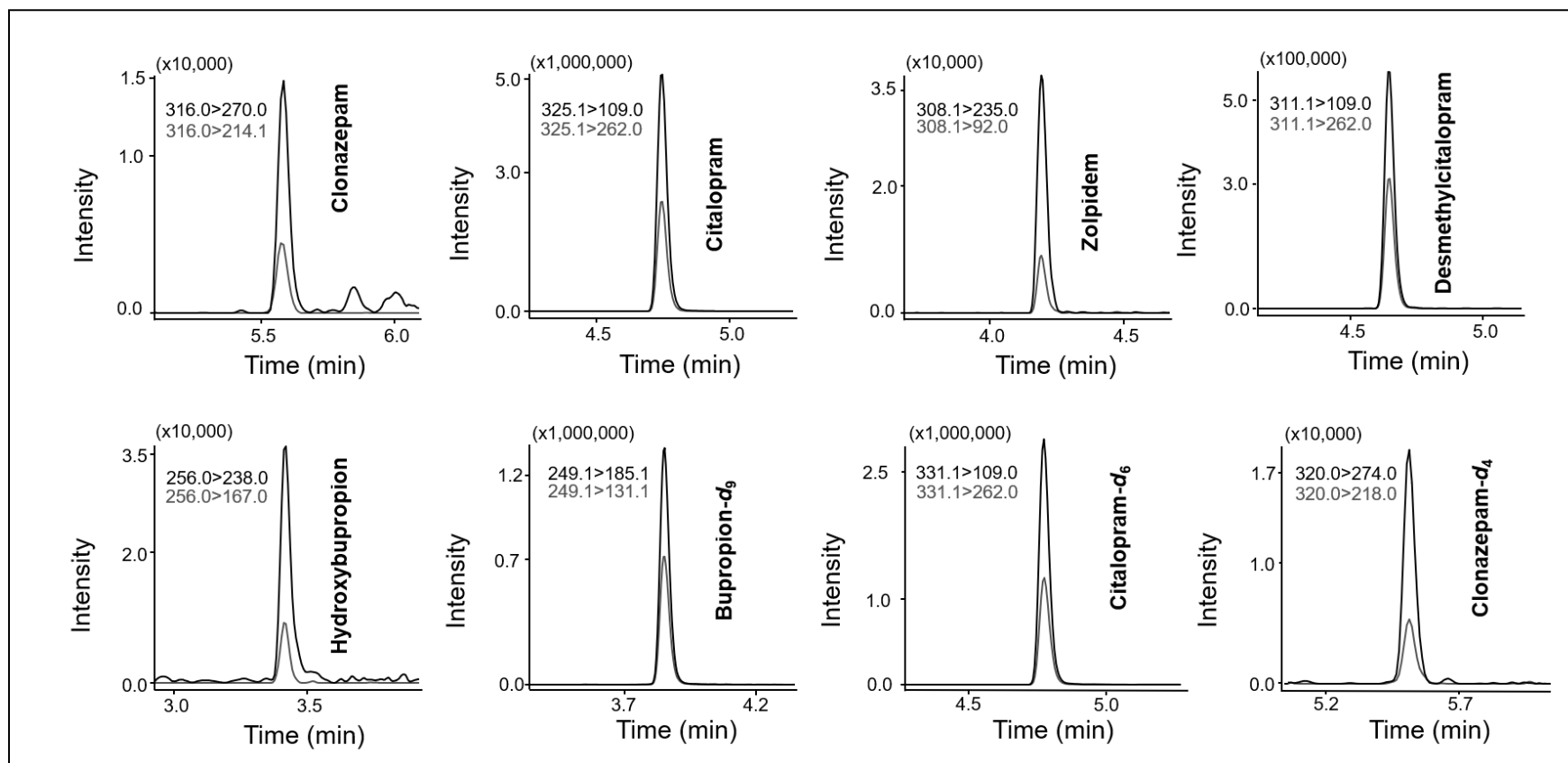
Sample number	Number of detected analytes in the sample	Analytes found	Concentration (ng/mL)
1	0	ND	< LOQ
2	0	ND	< LOQ
3	0	ND	< LOQ
4	0	ND	< LOQ
5	0	ND	< LOQ
6	0	ND	< LOQ
7	0	ND	< LOQ
8	0	ND	< LOQ
9	1	Mirtazapine	14.1
10	1	Paroxetine	5.8
11	1	Venlafaxine	0.9
12	1	Venlafaxine	0.6
13	1	Venlafaxine	0.7
14	1	Clomipramine	1.2
15	1	Duloxetine	1.5
16	1	Citalopram	15.6
17	1	Nitrazepam	2.5
18	1	Codeine	4.6
19	2	Venlafaxine Desmethylvenlafaxine	81.0 257
20	2	Desmethylcitalopram Citalopram	0.6 15.8
21	2	Hydroxybupropion Citalopram	4.1 1.5
22	2	Norsertaline Sertraline	1.5 0.8
23	2	Desmethylvenlafaxine Venlafaxine	0.6 3.6
24	2	Norsertaline Sertraline	3.1 2.2
25	2	Desmethylvenlafaxine Venlafaxine	27.0 17.0
26	2	Desmethylcitalopram Citalopram	4.4 150
27	2	Citalopram Nitrazepam	2.3 1.8
28	2	Desmethylcitalopram Citalopram	4.8 75.1
29	2	Desmethylcitalopram Citalopram	3.0 33.8
30	2	Hydroxybupropion Bupropion	5.0 1.2
31	2	Hydroxybupropion Bupropion	71.8 24.0
32	2	Desmethylvenlafaxine Venlafaxine	231 > 500
33	3	Desmethylvenlafaxine Hydroxybupropion Bupropion	474 189 334
34	3	Desmethylvenlafaxine	1.0

		Venlafaxine	2.3
		Codeine	12.0
35	3	7-Aminoclonazepam	2.3
		Nitrazepam	1.1
		Clonazepam	0.6
		Hydroxybupropion	0.9
36	4	Venlafaxine	2.1
		Citalopram	17.3
		Desmethylcitalopram	1.5
37	4	Desmethylcitalopram	2.3
		Hydroxybupropion	36.9
		Bupropion	11.1
		Citalopram	16.0
		Citalopram	38.2
38	5	Clonazepam	0.7
		Zolpidem	0.5
		Desmethylcitalopram	5.5
		Hydroxybupropion	0.6

*ND* not detected, *LOQ* limit of quantitation



**Fig. 1** Combined multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms of fortified oral fluid samples at limit of quantification (LOQ). **a** Fourteen benzodiazepines analyzed 0.5 ng/mL. **b** Fifteen opioids analyzed at 1.0 ng/mL. **c** Sixteen antidepressants analyzed at 0.5 ng/mL. **d** Five antidepressants analyzed at 1.0 ng/mL



**Fig. 2** MRM chromatograms of an authentic oral fluid sample (#38) with positive results for clonazepam (0.7 ng/mL), citalopram (38.2 ng/mL), zolpidem (0.5 ng/mL), desmethylicitalopram (5.5 ng/mL) and hydroxybupropion (0.6 ng/mL) with their respective internal standards

## 5. CONCLUSÕES

Em concordância com os objetivos apresentados, um método para análise quantitativa de fármacos antidepressivos, benzodiazepínicos e opioides em amostras de fluido oral foi desenvolvido e validado, apresentando baixos limites de limite de detecção/quantificação, além de valores de inexatidão, imprecisão e efeito matriz adequados para a aplicação em análises toxicológicas. Os resultados nos estudos de estabilidade favorecem o emprego futuro do fluido oral como matriz biológica para coleta em campo (festas, festivais, blitz de trânsito, entre outros).

O emprego do método na análise de amostras reais comprovou sua aplicabilidade, bem como corroborou a necessidade do uso de técnicas analíticas sensíveis, que permitam a detecção e quantificação de fármacos em baixas concentrações (menores que 1 ng/mL) na investigação da presença de fármacos psicoativos em amostras de fluido oral.

## 6. REFERÊNCIAS

1. Gallardo E, Queiroz JA. The role of alternative specimens in toxicological analysis. *Biomed Chromatogr.* 2008;22(8):795–821. doi: 10.1002/bmc.1009.
2. 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. doi: 10.1007/s00216-007-1245-8.
3. Scherer JN, Fiorentin TR, Sousa TRV, Limberger RP, Pechansky F. Oral Fluid Testing for Cocaine: Analytical Evaluation of Two Point-of-Collection Drug Screening Devices. *J Anal Toxicol.* 2017;41(5):392–8. doi: 10.1093/jat/bkx018.
4. Musshoff F, Hokamp EG, Bott U, Madea B. Performance evaluation of on-site oral fluid drug screening devices in normal police procedure in Germany. *Forensic Sci Int.* 2014;238:120–4. doi: 10.1016/j.forsciint.2014.02.005.
5. Toennes SW, Steinmeyer S, Maurer HJ, Moeller MR, Kauert GF. Screening for drugs of abuse in oral fluid - Correlation of analysis results with serum in forensic cases. *J Anal Toxicol.* 2005;29(1):22–7. doi: 10.1093/jat/29.1.22.
6. Pil K, Verstraete A. Current Developments in Drug Testing in Oral Fluid. *Ther Drug Monit.* 2008;30(2):196–202. doi: 10.1097/FTD.0b013e318167d563.
7. Bosker WM, Huestis MA. Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clin Chem.* 2009;55(11):1910–31. doi: 10.1373/clinchem.2008.108670.
8. Verstraete AG. Oral fluid testing for driving under the influence of drugs: history, recent progress and remaining challenges. *Forensic Sci Int.* 2005;150(2–3):143–50. doi: 10.1016/j.forsciint.2004.11.023.
9. Wille SMR, Raes E, Lillsunde P, Gunnar T, Laloup M, Samyn N, et al. 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. doi: 10.1097/FTD.0b013e3181ae46ea.
10. Van der Linden T, Wille SMR, Ramírez-Fernandez M, Verstraete AG, Samyn N. Roadside drug testing: Comparison of two legal approaches in Belgium. *Forensic Sci Int.* 2015;249:148–55. doi: 10.1016/j.forsciint.2015.01.034.
11. Gjerde H, Langel K, Favretto D, Verstraete AG. Detection of 4 Benzodiazepines

- in Oral Fluid as Biomarker for Presence in Blood. *Ther Drug Monit.* 2014;36(2):252–6. doi: 10.1097/FTD.0b013e3182a3ab42.
12. Choo RE, Huestis MA. Oral fluid as a diagnostic tool. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(11):1273–87. doi: 10.1515/CCLM.2004.248.
  13. Jenkins A. *Drug Testing in Alternate Biological Specimens.* 1st ed. Jenkins AJ, Caplan YH, editors. Drug Testing in Alternate Biological Specimens. Totowa: Humana Press; 2008.
  14. White RM, Moore CM. Introduction. In: Thomas BF, editor. *Detection of Drugs and Their Metabolites in Oral Fluid.* 1st ed. Amsterdam: Elsevier; 2018. p. 1–9.
  15. Laurence L. Brunton, Bruce A. Chabner BCK. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman.* 12th ed. New York: McGraw Hill; 2008.
  16. Azevedo ÂJP de, Araújo AA de, Ferreira MÂF. Consumo de ansiolíticos benzodiazepínicos: uma correlação entre dados do SNGPC e indicadores sociodemográficos nas capitais brasileiras. *Cien Saude Colet.* 2016;21(1):83–90. doi: 10.1590/1413-81232015211.15532014.
  17. Centers for Disease Control and Prevention. Prescription drug overdose data. 2018 [Acesso em: 2020 May 18]. Disponível em: <https://www.drugabuse.gov/related-topics/trends-statistics/overdose-death-rates>
  18. Bachhuber MA, Hennessy S, Cunningham CO, Starrels JL. Increasing Benzodiazepine Prescriptions and Overdose Mortality in the United States, 1996–2013. *Am J Public Health.* 2016;106(4):686–8. doi: 10.2105/AJPH.2016.303061.
  19. Makary MA, Overton HN, Wang P. Overprescribing is major contributor to opioid crisis. *BMJ.* 2017;359:1–2. doi: 10.1136/bmj.j4792.
  20. Rudd RA, Seth P, David F, Scholl L. Increases in drug and opioid-involved overdose deaths—United States, 2010–2015. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(50–51):1445–52.
  21. Volkow ND, Collins FS. The Role of Science in Addressing the Opioid Crisis. *N Engl J Med.* 2017;377(4):391–4. doi: 10.1056/NEJMs1706626.

22. Soelberg CD, Brown RE, Du Vivier D, Meyer JE, Ramachandran BK. The US Opioid Crisis. *Anesth Analg.* 2017;125(5):1675–81. doi: 10.1213/ANE.0000000000002403.
23. Lewer D, O'Reilly C, Mojtabai R, Evans-Lacko S. Antidepressant use in 27 European countries: Associations with sociodemographic, cultural and economic factors. *Br J Psychiatry.* 2015;207(3):221–6. doi: 10.1192/bjp.bp.114.156786.
24. National Center for Health Statistics. Health, United States, 2015: With Special Feature on Racial and Ethnic Health Disparities. Maryland; 2015.
25. Wong J, Motulsky A, Abrahamowicz M, Eguale T, Buckeridge DL, Tamblyn R. Off-label indications for antidepressants in primary care: descriptive study of prescriptions from an indication based electronic prescribing system. *BMJ.* 2017;j603. doi: 10.1136/bmj.j603.
26. Uddin MN, Samanidou VF, Papadoyannis IN. HPLC method for simultaneous determination of 1,4-benzodiazepines and tricyclic antidepressants in pharmaceutical formulations and saliva - A useful tool in medicinal chemistry. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2009;32(10):1475–504. doi: 10.1080/10826070902901499.
27. Kintz P, Villain M, Concheiro M, Cirimele V. Screening and confirmatory method for benzodiazepines and hypnotics in oral fluid by LC-MS/MS. *Forensic Sci Int.* 2004;150(2–3):213–20. doi: 10.1016/j.forsciint.2004.12.040.
28. Heiskanen T, Langel K, Gunnar T, Lillsunde P, Kalso EA. Opioid Concentrations in Oral Fluid and Plasma in Cancer Patients with Pain. *J Pain Symptom Manage.* 2015;50(4):524–32. doi: 10.1016/j.jpainsymman.2014.09.004.
29. Conermann T, Gosalia AR, Kabazie AJ, Moore C, Miller K, Fetsch M, et al. Utility of oral fluid in compliance monitoring of opioid medications. *Pain Physician.* 2014;17(1):63–70.
30. 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. doi: 10.1016/j.jpba.2008.05.024.



31. Petrides AK, Melanson SEF, Kantartjis M, Le RD, Demetriou CA, Flood JG. Monitoring opioid and benzodiazepine use and abuse: Is oral fluid or urine the preferred specimen type? *Clin Chim Acta*. 2018;481(February):75–82. doi: 10.1016/j.cca.2018.02.034.
32. Coutinho D, Vieira DN, Teixeira HM. Driving under the influence of benzodiazepines and antidepressants: prescription and abuse. *Acta Med Port*. 24(3):431–8.
33. Fierro I, Colás M, González-Luque JC, Álvarez FJ. Roadside opioid testing of drivers using oral fluid: The case of a country with a zero tolerance law, Spain. *Subst Abus Treat Prev Policy*. 2017;12(1):1–7. doi: 10.1186/s13011-017-0108-3.
34. Herrera-Gómez F, García-Mingo M, Colás M, González-Luque JC, Álvarez FJ. Opioids in oral fluid of Spanish drivers. *Drug Alcohol Depend*. 2018;187(February):35–9. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2018.02.016.
35. AAFS Standards Board. *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*. Colorado Springs; 2019.
36. Brasil. RDC n. 166, de 24 de Julho de 2017. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017; 2017.
37. Food and Drug Administration (FDA). *Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry*. Maryland; 2018.
38. European Network of Forensic Science Institutes. *Guidelines for the single laboratory Validation of Instrumental and Human Based Methods in Forensic Science*. Wiesbaden; 2014.
39. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). *Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens*. Vienna; 2009.
40. Eurachem Working Group. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Teddington; 2014.
41. Jeirani Z, Mohamed Jan B, Si Ali B, Mohd. Noor I, Chun Hwa S, Saphanuchart W. The optimal mixture design of experiments: Alternative method in optimizing the aqueous phase composition of a microemulsion. *Chemom Intell Lab Syst*.

- 2012;112(March 2018):1–7. doi: 10.1016/j.chemolab.2011.10.008.
42. Society of Toxicological and Forensic Chemistry. Guideline for quality control in forensic-toxicological analyses. Ulm; 2018.

## 7. ANEXOS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** A Toxicologia das Novas Substâncias Psicoativas (NSP): epidemiologia do consumo através da análise de amostras de fluido oral

**Pesquisador:** Kelly Francisco da Cunha

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 88770318.0.0000.5404

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.830.505

**Apresentação do Projeto:**

Introdução:

1.1 Novas substâncias psicoativas (NSP)

O uso de substâncias psicoativas com finalidade recreacional é um hábito que acompanha o homem desde o início dos tempos, mas foi a partir da segunda metade do século XX que este uso abusivo aumentou vertiginosamente. De acordo com o mais recente relatório do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (em inglês, United Nations Office for Drug and Crime, UNODC), 255 milhões de pessoas, ou 5,3% da população com idade entre 15 e 64 anos, utilizou alguma substância psicoativa ilícita durante o ano de 2015 (1). As Novas Substâncias Psicoativas (NSP), são substâncias ou misturas de substâncias psicoativas produzidas em laboratórios clandestinos, por síntese química a partir de substâncias precursoras encontradas ou não na natureza. Podem ser sintetizadas por pequenas modificações na estrutura de moléculas que já possuam atividade biológica conhecida (1, 2). As NSP são conhecidas popularmente como legal highs, termo que delinea uma característica importante deste grupo de drogas: proporcionar ao usuário efeitos semelhantes aos produzidos pelas drogas de abuso “tradicionais”, porém sem a classificação de substância ilícita ou controladas internacionalmente, como a cocaína, metanfetamina, 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) e dietilamida do ácido lisérgico (LSD) (2, 3). O termo “novas” não se refere necessariamente a substâncias recém inventadas, uma vez que muitas delas foram sintetizadas pela primeira vez a mais de 40 anos. De acordo com a UNODC,

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 2.830.505

são consideradas NSP as substâncias psicoativas usadas como drogas de abuso atualmente (representando ameaça à saúde pública) e que não são controladas pela Convenção Única de Entorpecentes (1961) ou pela Convenção de Substâncias Psicotrópicas (1971) (2). Uma vez que as substâncias ativas presentes nas NSP frequentemente não são controladas ou proibidas, estas drogas podem ser vendidas sem restrição em diversos locais, como lojas de conveniência e tabacarias. Contudo, a venda através da internet é a mais difundida, uma vez que as lojas online possuem maior flexibilidade para se adaptarem a mudanças no status legal das substâncias psicoativas presentes nos produtos, além da comodidade do usuário em poder adquirir a droga sem sair de casa (4). As NSP se tornaram um grave problema de saúde pública. Em todo o mundo, os relatos de hospitalizações e mortes de usuários após intoxicações graves por estes agentes são cada dia mais frequentes (3-12). Grande parte das intoxicações envolvendo essas substâncias se deve ao desconhecimento do usuário da substância utilizada. Isso porque usualmente a apresentação dessas substâncias é a mesma das drogas de abuso convencionais – comprimidos, cápsulas, selos - e, muitas vezes, são vendidas como se fossem essas substâncias. Acostumado a uma própria ideia de dose usual devido as experiências anteriores, somado à elevada potência inerente dessas novas substâncias e/ou mistura de substâncias em uma apresentação, o usuário tem aumentado o risco de apresentar um quadro de intoxicação (13-15). De acordo com o European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), mais de 450 NSP foram identificadas na Europa até 2015, sendo que entre 2008 e 2013 o número de apreensões deste tipo de drogas de abuso aumentou em 7 vezes (16). No ano de 2016, houve um aumento considerável no tráfico de drogas sintéticas, acompanhado da descoberta de mais 66 novas substâncias (1). Entre os principais grupos de NSP, destacam-se as catinonas sintéticas, os canabinóides sintéticos, os derivados da piperazina e as feniletilaminas. No Brasil, historicamente o consumo de NSP começou com a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, Ecstasy), identificada no país no final da década de 1990 (17). A MDMA continua sendo a principal droga de abuso sintética consumida no Brasil, porém os comprimidos de “Ecstasy” possuem atualmente composição química extremamente heterogênea, sendo que a MDMA está presente em aproximadamente 50% dos comprimidos apreendidos no estado de São Paulo (18). Após a MDMA, outras NSP foram surgindo gradativamente no mercado ilícito brasileiro, como a 2,5-dimetoxi-4-bromo-anfetamina (DOB) (19) e a meta-clorofenilpiperazina (mCPP) (20, 21) na primeira década deste século. Nos últimos 4 anos o número de novas NSP identificadas aumentou exponencialmente. Os estudos epidemiológicos no Brasil envolvendo drogas de abuso ainda são muito escassos (22, 23). Além disso, esses estudos acabam não englobamento as NSP. A ausência

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 2.830.505

desse tipo de informação vai além de conhecer possíveis novos padrões de consumo em relação às drogas de abuso, mas restringe também o preparo de profissionais envolvidos diretamente no atendimento a estes usuários, seja na abordagem para redução dos riscos, seja no próprio atendimento clínico, e de profissionais envolvidos na determinação do agente causador de um quadro de intoxicação, muitas vezes determinante para a conduta clínica a ser tomada (24).

#### 1.2 Análises toxicológicas em fluido oral

Na realização das análises toxicológicas, o sangue (ou seus derivados soro e plasma) é o fluido biológico mais utilizado, pois os níveis sanguíneos de um toxicante geralmente possuem relação direta com os efeitos causados no organismo. Contudo, a coleta de amostras de sangue requer cuidados especiais, com ambiente asséptico e profissional especializado para punção venosa, afim de minimizar riscos à saúde do paciente em função da coleta (25). A passagem de fármacos da corrente sanguínea para a saliva já havia sido sugerida desde a segunda metade da década de 1960 (26). Mesmo assim, a utilização desta como matriz biológica só veio aumentar significativamente na última década, principalmente em estudos de farmacocinética, monitorização terapêutica e na verificação do uso de drogas ilícitas, particularmente por agências que monitoram motoristas quanto ao uso de substâncias psicoativas (23, 26-29). A saliva é um fluido incolor, formada pelas secreções das células serosas e mucosas das glândulas salivares. É composta basicamente por água (99%), proteínas (0,3%), mucopolissacarídeos (0,3%) e eletrólitos (0,4%). Seu pH, quando coletada de forma não-estimulada, possui valores entre 6,2 e 7,4. O fluxo salivar pode variar de 0 a 10 mL/min com produção diária de cerca de 500 a 1500 mL. As glândulas salivares possuem elevada irrigação sanguínea, realizada principalmente pela artéria carótida. Substâncias circulando na forma livre no plasma (não-ligada às proteínas) podem atravessar as paredes dos capilares sanguíneos e as membranas das células epiteliais das glândulas para assim serem secretadas junto à saliva. Princípios físico-químicos como a solubilidade e grau de dissociação também influenciam a taxa e extensão desta passagem (30, 31). O termo fluído oral é o que melhor descreve as amostras habitualmente coletadas por expectoração ou dispositivos de coleta apropriados, isso porque o fluído presente na cavidade oral é a mistura da saliva proveniente das glândulas salivares com outros constituintes presentes na boca. A coleta estrita de saliva se torna inviável, pois dependeria da extração diretamente de uma das glândulas que a produz (32). Nas análises toxicológicas, o fluido oral possui como principal vantagem a facilidade de coleta, que não é invasiva e pode ser realizada sob observação sem que haja constrangimento do paciente – esta característica é fundamental para viabilizar a coleta da amostra em situações de campo, como em blitz de trânsito [28]. Outra vantagem importante no

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 2.830.505

uso da saliva em análises toxicológicas é a correlação que pode ser traçada entre as concentrações salivares e plasmáticas de um toxicante. Esta correlação permite, por exemplo, o uso da saliva em estudo de farmacocinética e em análises forenses e de emergência, por permitir correlacionar as concentrações obtidas com alterações comportamentais que possam eventualmente ser causadas pelo toxicante encontrado nesse fluido (31-34).

#### Hipótese:

Espera-se determinar se é verdadeira a hipótese de que o usuário de substância psicoativa nos dias de hoje não tem conhecimento da identificação exata da substância que está consumindo, aumentando o risco de quadros de intoxicação.

#### Metodologia Proposta:

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### Reagentes

Materiais de referência de NSP foram adquiridos das empresas Cerilliant (Round Rock, TX, EUA) e Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EUA), e já estão disponíveis no laboratório. Os reagentes para análise cromatográfica (grau HPLC) e para preparo de amostras (grau analítico) são adquiridos periodicamente da Scharlau (Barcelona, Espanha) e Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). Os dispositivos de coleta de fluido oral, Quantisal™, da Immunalysis (Pomona, CA, EUA).

#### Amostras biológicas

A coleta de amostras de fluido oral será realizada em festas destinadas ao público universitário, mais especificamente aos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no período de agosto à dezembro de 2018, de maneira às coletas atingirem uma festa organizada por cada diretoria acadêmica dos institutos/faculdades da universidade. Assim, 24 unidades de ensino levariam à 24 coletas. O número de amostra por festa estará vinculado à estimativa de participantes no dia, tendo em perspectiva a coleta de 10% de amostras em razão dessa estimativa ou o mínimo de 10 amostras/festa, totalizando 240 amostras. Para a coleta de amostras, será feita abordagem ativa dos frequentadores da festa, que receberão serão breve explicação sobre o projeto e seus objetivos e, se aceitarem participar, serão convidados a responder breve questionário (idade, sexo, orientação sexual, escolaridade, se utilizou alguma substância psicoativa naquela festa, qual substância psicoativa acredita ter utilizado e estimativa do intervalo de tempo que foi feito o uso) e em seguida fornecer amostra de fluido oral (Anexo I). A coleta de amostra de fluido oral será feita seguindo recomendações do fabricante do Quantisal™ (Figura 1): o participante deverá

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 2.830.505

segurar o dispositivo pelo cabo e colocar a parte de algodão embaixo da língua até o indicador apresentar cor azul, correspondendo ao volume correto de amostra coletada (máximo de 5 minutos). A coleta não é invasiva, já que apenas o fluido oral (saliva) é coletado, sem necessidade de inserção de agulhas ou de levar o voluntário para um local específico. Uma vez que assinar o termo de consentimento para alguns pode ser sinônimo de assumir que tinha em posse/usou substância psicoativa, que é caracterizado como um ato ilícito, passível de medidas legais (Art. 28 da Lei 11.343/2006), é solicitada a dispensa de assinatura do consentimento. Os voluntários receberão, em contrapartida, um cartão (Figura 2) contendo os números de atendimento do Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Campinas (CIATox), assim como endereço de site em desenvolvimento para o projeto de pesquisa na rede de domínio RedeHost e número e senha exclusivos de sua amostra para, no período de 7 dias, terem acesso ao resultado da análise toxicológica por cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massas. Estes dados serão usados unicamente para fins estatísticos e gerarão material a ser apresentado em congressos e publicações científicas e não acarretarão na identificação dos voluntários. A página inicial do site constará o nome do projeto, breve contextualização e objetivos do projeto, assim como a identificação dos responsáveis pela pesquisa. Ao final, um link devidamente identificado levará a uma página para adição do número da amostra e senha, de modo que apenas os voluntários, em posse do cartão recebido no ato da coleta, terão acesso exclusivamente ao seu resultado, sem necessidade de qualquer identificação.

#### Biorepositório

As amostras serão armazenadas em caixa térmica contendo gelo seco durante o período de coleta em campo e, no Laboratório de Análises Toxicológicas (LTA) do CIATox (sede do projeto), serão centrifugadas, transferidas para tubos plásticos de polipropileno identificados com o número da amostra e mantidos à -20 °C até o momento da análise.

#### Critério de Inclusão:

Para inclusão ao projeto, o sujeito deverá aceitar doar amostra de fluido oral e responder questionário anônimo voluntariamente, após ser apresentado aos objetivos, riscos e benefícios do projeto.

#### Critério de Exclusão:

Será excluído ao projeto, o sujeito que não aceitar doar amostra de fluido oral e responder questionário anônimo voluntariamente, após ser apresentado aos objetivos, riscos e benefícios do

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.830.505

projeto, assim como sujeito que apresente algum comportamento que possa indicar o não entendimento do projeto, assim como trazer algum risco para os responsáveis pela coleta.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

O objetivo deste projeto piloto é gerar os primeiros dados epidemiológicos referentes ao uso de novas substâncias psicoativas no estado de São Paulo, através da análise das amostras de fluido oral coletadas em festas destinadas ao público universitário, ambiente onde o uso dessas substâncias pode ocorrer.

Objetivo Secundário:

Espera-se ainda que estes dados possam servir de base para a organização de campanhas de prevenção e orientação de sintomas de alarme, visando a proteger o usuário caso use, inadvertidamente, alguma substância cujo componente seja potencialmente lesivo a sua integridade física.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo informações do pesquisador: "Riscos: A coleta não traz riscos ao voluntário, uma vez que não é invasiva, pois consiste na retirada de amostra de fluido oral (saliva) do participante, por meio de kit denominado Quantisal™. Uma vez que solicitamos a dispensa do TCLE, o voluntário também não possui qualquer risco referente à possíveis trâmites legais dispostos no Art. 28 da Lei 11.343/2006 referentes à posse de substâncias psicoativas. Benefícios: Salientamos que o sujeito será beneficiado com a participação na pesquisa uma vez que receberá número e senha exclusivos para em 7 dias checar a composição da(s) substância(s) psicoativa(s) utilizadas na ocasião da coleta do material (fluido oral)."

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Este protocolo se refere ao Projeto de Pesquisa intitulado "A Toxicologia das Novas Substâncias Psicoativas (NSP): epidemiologia do consumo através da análise de amostras de fluido oral e caracterização de seu metabolismo in vitro", cuja pesquisadora responsável é aluna de doutorado Kelly Francisco da Cunha. A pesquisa contará com a participação do orientador, Prof. Dr. José Luiz da Costa, e do pesquisador Pedro Henrique Piras Coser. A Instituição Proponente é a Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP. Segundo as Informações Básicas do Projeto, a pesquisa tem orçamento estimado em R\$ 2.500,00 (Dois mil e quinhentos reais) e o cronograma apresentado contempla início da coleta de dados para setembro de 2018, com término da coleta em dezembro de 2019. No estudo, serão colhidas amostras de fluido oral de no máximo 1000 participantes,

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 2.830.505

durante festas destinadas ao público universitário, com média de 10 participantes por festa. O objetivo da pesquisa é gerar os primeiros dados epidemiológicos referentes ao uso de novas substâncias psicoativas no estado de São Paulo. Serão analisados quais os componentes das substâncias psicoativas consumidas, e o resultado ficará disponível para consulta pelo participante, com o intuito de alertá-lo sobre a presença de componentes que sejam potencialmente lesivos a sua integridade física. Não será aplicado o TCLE, porque o documento pode ser uma prova de que houve posse e/ou uso de substância psicoativa, o que é caracterizado como um ato ilícito, passível de medidas legais (Art. 28 da Lei 11.343/2006). Em nenhum momento o participante será identificado, sendo utilizado um número de referência determinado pelos pesquisadores.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram analisados os seguintes documentos de apresentação obrigatória:

- 1 - Folha de Rosto Para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos: Foi apresentado o documento "Folhaderosto\_2\_cunha.pdf" devidamente preenchido, datado e assinado pelo diretor associado da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Adequado.
- 2 - Projeto de Pesquisa: Foram analisados os documentos "Projeto\_Piloto\_CEP\_JLC\_v3.pdf" e "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1087464.pdf" de 13/08/2018. Adequado.
- 3 - Orçamento financeiro e fontes de financiamento: Informações sobre orçamento financeiro incluídas no documento "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1087464.pdf" de 13/08/2018. De acordo com o pesquisador, a pesquisa será realizada com recursos próprios. Adequado.
- 4 - Cronograma: Informações sobre o cronograma incluídas nos documentos "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1087464.pdf" de 13/08/2018 e "Projeto\_Piloto\_CEP\_JLC\_v3.pdf". Adequado.
- 5 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Foi pedido dispensa de TCLE, mas foi apresentado o documento "TCLE\_DissAss\_v2.pdf", que será lido para os participantes da pesquisa. Adequado
- 6 - Currículo do pesquisador principal e demais colaboradores: Contemplados no documento

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



## UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.830.505

"PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1087464.pdf" de 13/08/2018.

7 - Outros documentos que acompanham o Protocolo de Pesquisa:

- Carta\_resposta\_CEP\_2.pdf
- biorrepositorioAssPiloto2.pdf

### **Recomendações:**

No arquivo "TCLE\_DissAss\_v2.pdf", seria importante adicionar, quando é falado que em 7 dias o participante terá acesso aos resultados, até quando que o resultado ficará disponível no site para consulta.

### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Todas as pendências foram devidamente respondidas, portanto o projeto foi aprovado. A previsão de início da coleta de dados foi alterada para setembro de 2018. No entanto, solicita-se que os pesquisadores realizem a modificação citada no item "Recomendações", presente acima, e enviem o documento alterado por meio de emenda na Plataforma Brasil.

### **Considerações Finais a critério do CEP:**

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 2.830.505

adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1087464.pdf	13/08/2018 17:18:19		Aceito
Outros	Carta_resposta_CEP_2.pdf	13/08/2018 17:17:59	Kelly Francisco da Cunha	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorrepositorioAssPiloto2.pdf	09/08/2018 17:45:08	Kelly Francisco da Cunha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Piloto_CEP_JLC_v3.pdf	09/08/2018 17:39:54	Kelly Francisco da Cunha	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_DissAss_v2.pdf	09/08/2018 17:07:08	Kelly Francisco da Cunha	Aceito

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 2.830.505

Folha de Rosto	Folhaderosto_2_cunha.pdf	09/08/2018 16:51:43	Kelly Francisco da Cunha	Aceito
Outros	AtestadoMatricula_Cunha.pdf	16/04/2018 15:17:05	Kelly Francisco da Cunha	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CAMPINAS, 20 de Agosto de 2018

---

**Assinado por:**  
**Renata Maria dos Santos Celeghini**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br