



FACULTAD DE MEDICINA Y  
ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE A.P. Y CIENCIAS  
FORENSES

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A  
LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM A LA  
DETERMINACIÓN DE ANTIDEPRESIVOS EN PLASMA Y  
FLUIDO ORAL

Memoria presentada por

**Ana de Castro Ríos**

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

**Santiago de Compostela, Noviembre 2006**





**FACULTAD DE MEDICINA Y  
ODONTOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE A.P. Y CIENCIAS  
FORENSES**

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

*Certifican:*

Que la presente memoria, titulada “APLICACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM A LA DETERMINACIÓN DE ANTIDEPRESIVOS EN PLASMA Y FLUIDO ORAL”, que presenta la licenciada **Ana de Castro Ríos** para optar al grado de Doctora ha sido realizada bajo su dirección en este Departamento y, a su juicio, reúne todos los requisitos exigidos por la normativa vigente para la elaboración y presentación de Tesis Doctorales.

Y para que así conste, firma el presente informe en Santiago de Compostela, a 20 de Noviembre de 2006.

M. López-Rivadulla

A. Cruz Landeira



*A todos los que están a mi lado*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer al profesor Manuel López-Rivadulla, director de esta tesis, por guiarme en el trabajo realizado durante estos años, por hacerme mirar siempre hacia delante con su optimismo y, sobre todo, por cuidarme y tratarme como a una hija. A la profesora Angelines Cruz, co-directora de la tesis, por apoyarme y confiar en mí, por su ayuda en la elaboración de esta tesis y por sus siempre prácticos consejos.

To Michelle Wood, from Micromass, Waters (Manchester), for teaching me with great patience, and for being my “older sister” during my first stage abroad, making things really easy for me. To Nele Samyn and Gert De Boeck, from the National Institute for Criminalistics and Criminology, in Brussels, for their warm welcome during my stage at their place, and for giving me the opportunity to work and learn with them and with their really nice team.

Al profesor Luís Concheiro, por contarnos sus anécdotas y, con ello, enseñarnos parte de la Historia de la Medicina Legal.

A las profesoras Ana Bermejo y Purificación Fernández, y a la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Tabernero, por la ayuda ofrecida durante estos años.

A Marta, con la que sin duda más horas compartí durante estos años, mi “tandem” en el laboratorio, las cañas, los conciertos...por ser mi AMIGA. A Oscarín, por traspasarnos lo que él aprendió peleándose con el LC-MS, y por sacarme una sonrisa todos los días.

A Rubén, por estar ahí, dispuesto a echar una mano en cualquier momento.

A Dani que, aunque a veces se pone un poco gruñón, es la “vidilla” del laboratorio; por ser mi amigo y, claro, por todos los “Picos Sacros” que disfruté (y disfrutaré) con él.

Al resto de mis compañeros del laboratorio, por hacer que el trabajo diario sea mucho más agradable. A Iván, por encargarse de que no nos dé un ataque de hipoglucemia por las mañanas; a Palitos, que siempre tiene una palabra para

alegrarte el día; a Cathy, Marta Lago, Martha, Patricia y Teresa. A José Manuel. Y, aunque no los tengamos aquí frecuentemente, no me olvido de los portugueses, Eugenia y Mario, y de todos los que han pasado por el departamento durante estos años.

Al Dr. Mario Páramo, por su ayuda con la recolección de muestras reales utilizadas en la elaboración de este trabajo.

A mis “Chicas Vinos”, con las que siempre disfruto de un jueves con risas. A Franci, la “nonna” de la casa.

A Chani, por su valiosísima ayuda en la corrección del inglés. A mi primo Kiko, por echarme una mano con el diseño de la portada.

A Ruth, a Vane y a Vir que, aunque las tengo más lejos de los que me gustaría, sé que están a mi lado.

A mi hermana María, mi amiga del alma, y a César, por todo lo que disfruto estando con ellos. A Maruja, mi viejita, por ser la más cariñosa del mundo.

A mis padres que, aunque en último lugar, están realmente en el primero. Por hacerme sentir que están siempre a mi lado. Porque lo más importante lo he aprendido de ellos.



# ÍNDICE GENERAL

<b>I. ASPECTOS GENERALES Y FARMACOLOGÍA DE LOS ANTIDEPRESIVOS.....</b>	<b>1</b>
1.1. Introducción a la depresión.....	3
1.2. Inicios de la farmacoterapia antidepresiva.....	5
1.3. Clasificación de los fármacos antidepresivos.....	7
1.4. Mecanismo de acción.....	8
1.4.1. Inhibidores de la recaptación de NA y 5-HT.....	9
1.4.2. Inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT (ISRS).....	10
1.5. Aplicaciones terapéuticas.....	11
1.5.1. Depresión.....	11
1.5.2. Ansiedad.....	12
1.5.3. Otras aplicaciones.....	13
1.6. Estructura.....	14
1.7. Farmacocinética.....	15
1.7.1. Absorción.....	15
1.7.2. Distribución.....	16
1.7.3. Metabolización.....	17
1.7.4. Eliminación y vida media.....	21

1.8. Toxicidad.....	23
1.8.1. Efectos secundarios.....	23
1.8.2. Interacciones.....	25
1.8.3. Intoxicación aguda.....	28
Bibliografía.....	33
<b>II. MONITORIZACIÓN TERAPÉUTICA DE LOS FÁRMACOS ANTIDEPRESIVOS.....</b>	<b>43</b>
2.1. Monitorización de los niveles plasmáticos de fármacos.....	45
2.2. Variabilidad en el aclaramiento plasmático de los antidepresivos.....	47
2.3. Niveles plasmáticos de los antidepresivos.....	50
2.3.1 Relación dosis/niveles plasmáticos.....	50
2.3.2. Relación niveles plasmáticos (C <sup>ss</sup> )/eficacia clínica.....	51
2.4. Utilidad de la TDM de los antidepresivos.....	53
2.5. Requisitos analíticos.....	55
Bibliografía.....	57
<b>III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>61</b>
3.1. Técnicas no cromatográficas.....	63
3.2. Técnicas cromatográficas.....	64
3.2.1. Cromatografía en capa fina (TLC).....	66

3.2.2. Cromatografía capilar micelar electrocinética (MEKC).....	67
3.2.3. Cromatografía gaseosa (CG).....	67
3.2.4. Cromatografía líquida de alta resolución (LC).....	69
3.2.5. Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS)...	70
Bibliografía.....	85
<b>IV. LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS.</b>	<b>97</b>
4.1. Introducción a LC-MS.....	99
4.2. Componentes de un sistema API-MS.....	101
4.2.1. Interfases de ionización a presión atmosférica (API).....	102
4.2.2. Analizadores de masas.....	110
4.2.3. Detectores.....	117
4.3 Aplicaciones de LC-API-MS en el campo de la toxicología.....	121
4.3.1. LC-API-MS como técnica de confirmación y cuantificación.....	118
4.3.2. LC-API-MS como técnica de screening general.....	121
Bibliografía.....	123
<b>V. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>131</b>
<b>VI. PARTE EXPERIMENTAL (1): DETERMINACIÓN DE ANTIDEPRESIVOS EN PLASMA Y FLUIDO ORAL MEDIANTE LC-MS/MS.....</b>	<b>137</b>

6.1. Instrumentación.....	139
6.1.1. Sistema cromatográfico.....	139
6.1.2. Sistema de detección.....	139
6.2.3 Sistema de extracción de muestras.....	140
6.1.4. Instrumentación adicional.....	141
6.1.5. Otra instrumentación.....	141
6.2 Material, disolventes y reactivos, sustancias patrón y disoluciones.....	142
6.2.1. Material de laboratorio.....	142
6.2.2. Disolventes y reactivos.....	142
6.2.3. Sustancias patrón.....	143
6.2.4. Disoluciones.....	144
6.2.4.1. Preparación de disolución tampón y disoluciones empleadas en la extracción.....	144
6.2.4.2. Preparación de las disoluciones madre.....	144
6.2.4.3. Preparación de las disoluciones de trabajo.....	144
6.3. Metodología analítica.....	145
6.3.1. Preparación de las muestras de plasma y saliva.....	145
6.3.2. Procedimiento de extracción.....	147
6.3.3 Condiciones cromatográficas.....	148
6.3.4. Condiciones del espectrómetro de masas.....	150
6.3.5. Estudio de validación del método analítico.....	152

6.3.5.1. Selectividad.....	153
6.3.5.2. Modelo de calibración (Linealidad).....	156
6.3.5.3. Precisión y exactitud.....	157
6.3.5.4. Límites.....	158
6.3.5.5. Rendimiento de la extracción.....	159
6.3.5.6. Intensidad relativa de los iones.....	159
6.3.5.7. Efecto matriz.....	160
6.3.5.8. Estabilidad.....	162
6.3.6. Aplicación a casos reales.....	165
6.4 Resultados y discusión.....	167
6.4.1. Separación cromatográfica.....	167
6.4.2. Detección mediante espectrometría de masas en tandem.....	171
6.4.3. Procedimiento de extracción.....	184
6.4.4. Estudio de validación del método analítico.....	186
6.4.4.1. Selectividad.....	186
6.4.4.2. Modelo de calibración (Linealidad).....	188
6.4.4.3. Precisión y exactitud.....	191
6.4.4.4. Límites.....	196
6.4.4.5. Rendimiento de la extracción.....	197
6.4.4.6. Intensidad relativa de los iones.....	197
6.4.4.7. Efecto matriz.....	198

6.4.4.8. Estabilidad.....	201
6.4.5. Aplicación de la metodología al análisis de muestras reales.....	202
6.4.5.1. Análisis de muestras clínicas y forenses.....	202
6.4.5.2. Estudio preliminar de la correlación entre los niveles de antidepresivos en plasma y en saliva.....	208
Bibliografía.....	213
<b>VII. EXPERIMENTAL PART (2): ON-LINE SPE-LC-MS/MS METHOD FOR THE DETERMINATION OR ANTIDEPRESSANTS IN PLASMA.....</b>	<b>219</b>
7.1. The improvement on high-throughput by means of on-line SPE techniques.....	221
7.2. Methodology description.....	224
7.2.1. Instrumentation.....	224
7.2.2. On-line SPE-LC-MS/MS.....	225
7.2.2.1. Sample extraction: on-line SPE.....	225
7.2.2.2. Chromatographic conditions.....	227
7.2.2.3. Tandem mass spectrometry.....	227
7.2.3. Method validation.....	229
7.2.3.1. Selectivity.....	229
7.2.3.2. Calibration model.....	229
7.2.3.3. Limit of quantitation.....	229
7.2.3.4. Precision and accuracy.....	230
7.2.3.5. Recovery.....	230

7.2.3.6. Assessment of matrix effect.....	233
7.2.3.7. Stability studies.....	234
7.2.4. Analysis of real cases.....	234
References.....	236
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>239</b>
<b>IX. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>243</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>247</b>





## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de acción responsable del efecto antidepresivo de los ADTs. El bloqueo de los receptores histaminérgicos, muscarínico-colinérgicos, así como el bloqueo de receptores $\alpha_1$ -adrenérgicos es responsable de sus efectos secundarios..	9
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de acción de la venlafaxina. Su mayor selectividad en el bloqueo de NA y 5-HT es responsable de su mayor seguridad y menor número de efectos adversos.....	10
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de acción de los ISRSs mediante el bloqueo selectivo de la recaptación de 5-HT.....	11
<b>Figura 4.</b> Estructura química de los antidepresivos en estudio.....	14
<b>Figura 5.</b> Principales vías metabólicas de imipramina, amitriptilina y clomipramina....	18
<b>Figura 6.</b> Representación de una interfase API en la que se produce la extracción ortogonal de los iones desde la región a presión atmosférica hasta la región de alto vacío del analizador (ZSpray de Micromass, Waters Corp).....	103
<b>Figura 7.</b> Proceso de evaporación/ionización mediante ESI.....	107
<b>Figura 8.</b> Proceso de evaporación e ionización mediante APCI.....	109
<b>Figura 9.</b> Dibujo esquemático del principio de funcionamiento de un cuadrupolo.....	112
<b>Figura 10.</b> Esquema de un espectrómetro de masas en tandem con triple cuadrupolo.....	115
<b>Figura 11.</b> Dibujo representativo del funcionamiento del multiplicador de electrones y del fotomultiplicador.....	118
<b>Figura 12.</b> Fotografía del equipo empleado en el desarrollo de la metodología analítica para la determinación de antidepresivos (cromatógrafo de líquidos y espectrómetro de masas en tandem).....	139

<b>Figura 13.</b> Sistema de SPE automático ASPEC XL (Gilson) empleado en la extracción de las muestras de plasma y saliva.....	140
<b>Figura 14.</b> a) Dispositivo para la recolección de saliva (Salivette®); b) Centrifugación del algodón empapado para la recuperación posterior de la muestra.....	146
<b>Figura 15.</b> Representación esquemática del sistema en “T” empleado para la optimización de los parámetros del espectrómetro de masas.....	150
<b>Figura 16.</b> Espectro de masas de los iones “hijos” de Nortriptilina (a) y Nortriptilina-d3 (b) a energías de colisión de 16 y 15eV, respectivamente. Ambos espectros difieren únicamente en el ion pseudomolecular, siendo los fragmentos resultantes en los dos casos los mismos.....	155
<b>Figura 17.</b> Ejemplar del consentimiento informado firmado por los pacientes participantes en el estudio y del formulario con la información acerca del tratamiento de cada paciente y la toma de muestras.....	166
<b>Figura 18.</b> Separación cromatográfica empleando columnas analíticas de diferentes dimensiones. a) Sunfire C18 IS (20x2.1mm, 3.5µm) y b) XBridge C18 (100x2.1mm, 3.5µm).....	168
<b>Figura 19.</b> Separación de los 13 antidepresivos bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas.....	169
<b>Figura 20.</b> Superposición de cromatogramas ( <i>Total ion current</i> , TIC) obtenidos tras la inyección de los compuestos disueltos en fase móvil aplicando un voltaje de capilar de 0.5kV (fondo negro) y de 3kV (fondo blanco).....	171
<b>Figura 21.</b> Espectro de masas de <b>Venlafaxina (A)</b> y <b>Citalopram (B)</b> . Para ambos compuestos, en el espectro superior se muestra el ion “padre” y el voltaje de cono seleccionado. En los dos espectros inferiores, los iones “hijos” y las energías de colisión con las que se obtuvo la señal más intensa para cada uno de ellos.....	173
<b>Figura 22.</b> Espectro de masas de <b>Desipramina (A)</b> e <b>Imipramina (B)</b> . Para ambos	

compuestos, en el espectro superior se muestra el ion “padre” y el voltaje de cono seleccionado. En los dos espectros inferiores, los iones “hijos” y las energías de colisión con las que se obtuvo la señal más intensa para cada uno de ellos..... 174

**Figura 23.** Espectro de masas de **Imipramina-d3 (A)** y **Paroxetina (B)**. Para ambos compuestos, en el espectro superior se muestra el ion “padre” y el voltaje de cono seleccionado. En el(los) espectro(s) inferior(es), el(los) ion(es) “hijo(s)” y la(s) energía(s) de colisión que dan lugar a la señal más intensa..... 175

**Figura 24.** Espectro de masas de **Paroxetina-d6 (A)** y **Fluvoxamina (B)**. Para ambos compuestos, en el espectro superior se muestra el ion “padre” y el voltaje de cono seleccionado. En el(los) espectro(s) inferior(es), el(los) ion(es) “hijo(s)” y la(s) energía(s) de colisión que dan lugar a la señal más intensa..... 176

**Figura 25.** Espectro de masas de **Amitriptilina (A)** e **Nortriptilina (B)**. Para ambos compuestos, en el espectro superior se muestra el ion “padre” y el voltaje de cono seleccionado. En los dos espectros inferiores, los iones “hijos” y las energías de colisión con las que se obtuvo la señal más intensa para cada uno de ellos..... 177

**Figura 26.** Espectro de masas de **Nortriptilina-d3 (A)** y **Sertralina (B)**. Para ambos compuestos, en el espectro superior se muestra el ion “padre” y el voltaje de cono seleccionado. En el(los) espectro(s) inferior(es), el(los) ion(es) “hijo(s)” y la(s) energía(s) de colisión que dan lugar a la señal más intensa..... 178

**Figura 27.** Espectro de masas de **Fluoxetina (A)** y **Fluoxetina-d6 (B)**. Para ambos compuestos, en el espectro superior se muestra el ion “padre” y el voltaje de cono seleccionado. En el(los) espectro(s) inferior(es), el(los) ion(es) “hijo(s)” y la(s) energía(s) de colisión que dan lugar a la señal más intensa..... 179

**Figura 28.** Espectro de masas de **Norfluoxetina (A)** y **Norfluoxetina-d6 (B)**. Para ambos compuestos, en el espectro superior se muestra el ion “padre” y el voltaje de cono seleccionado. En el(los) espectro(s) inferior(es), el(los) ion(es) “hijo(s)” y la(s) energía(s) de colisión que dan lugar a la señal más intensa..... 180

**Figura 29.** Espectro de masas de **Clomipramina (A)** y **Clomipramina-d3 (B)**. Para ambos compuestos, en el espectro superior se muestra el ion “padre” y el voltaje de 181

cono seleccionado. En el(los) espectro(s) inferior(es), el(los) ion(es) “hijo(s)” y la(s) energía(s) de colisión que dan lugar a la señal más intensa.....

**Figura 30.** Espectro de masas de **Norclomipramina**. En el espectro superior se muestra el ion “padre” y el voltaje de cono seleccionado. En los dos espectros inferiores, los iones “hijos” y las energías de colisión con las que se obtuvo la señal más intensa para cada uno de ellos..... 182

**Figura 31.** Cromatogramas de las transiciones cuantificadoras seleccionadas para cada uno de los antidepresivos incluidos en la metodología analítica obtenidos tras el análisis de una muestra blanco de plasma (A) y una muestra blanco de fluido oral (B)..... 187

**Figura 32.** Comparación de la aplicación del modelo lineal (A) y cuadrático (B) a los resultados obtenidos para la fluvoxamina..... 189

**Figura 33.** Cromatogramas superpuestos de las transiciones cuantificadoras de los antidepresivos en plasma a 2ng/mL (concentración correspondiente al LLOQ más bajo). 1:Venlafaxina, 2:Citalopram, 3:Desipramina, 4:Imipramina, 5:Paroxetina, 6:Nortriptilina, 7:Fluvoxamina, 8:Amitriptilina, 9:Norfluoxetina, 10:Sertralina, 11:Fluoxetina, 12:Norclomipramina, 13:Clomipramina..... 196

**Figura 34.** Cromatogramas superpuestos de las transiciones cuantificadoras de los antidepresivos en fluido oral a 2ng/mL (LLOQ). 1:Venlafaxina, 2:Citalopram, 3:Desipramina, 4:Imipramina, 5:Paroxetina, 6:Nortriptilina, 7:Fluvoxamina, 8:Amitriptilina, 9:Norfluoxetina, 10:Sertralina, 11:Fluoxetina, 12:Norclomipramina, 13:Clomipramina..... 197

**Figura 35.** Cromatogramas del TIC, es decir, conteniendo todas las transiciones monitorizadas, obtenidos tras la inyección de fase móvil (parte superior, en verde) y de una muestra blanco de plasma extraída (parte inferior, en rojo), simultánea a la infusión post-columna de los analitos. **A:** Cromatogramas del TIC de la primera función del MRM; **B:** cromatogramas del TIC de la función 2 de MRM; **C:** cromatogramas del TIC de la función 3 de MRM..... 199

**Figura 36.** Cromatogramas del TIC, es decir, conteniendo todas las transiciones

monitorizadas, obtenidos tras la inyección de fase móvil (parte superior, en verde) y de una muestra blanco de fluido oral extraída (parte inferior, en rojo), simultánea a la infusión post-columna de los analitos. <b>A:</b> Cromatogramas del TIC de la primera función del MRM; <b>B:</b> cromatogramas del TIC de la función 2 de MRM; <b>C:</b> cromatogramas del TIC de la función 3 de MRM.....	200
<b>Figura 37.</b> Número de casos en los que se encontró cada antidepresivo incluido en el método analítico utilizado.....	203
<b>Figura 38.</b> Caso 1036/06, que presentó concentraciones de sertralina= 68.3ng/mL, amitriptilina= 1176.6ng/mL y nortriptilina= 127.3ng/ml. En la imagen se muestran los cromatogramas de las dos transiciones monitorizadas para cada uno de estos compuestos obtenidos tras el análisis de la muestra.....	207
<b>Figura 39.</b> Caso 1848/06, que presentó concentraciones de paroxetina= 311ng/mL, imipramina= 205.93ng/mL y desipramina= 788.5ng/ml. En la imagen se muestran los cromatogramas de las dos transiciones monitorizadas para cada uno de estos compuestos obtenidos tras el análisis de la muestra.....	207
<b>Figura 40.</b> Caso 1352/06, que presentó concentraciones de venlafaxina= 236.14ng/mL, amitriptilina= 87.59ng/mL y nortriptilina= 125.33ng/ml. En la imagen se muestran los cromatogramas de las dos transiciones monitorizadas para cada uno de estos compuestos obtenidos tras el análisis de la muestra.....	208
<b>Figura 41.</b> Cromatogramas de las transiciones empleadas en la detección de venlafaxina, clomipramina y norclomipramina obtenidos tras el análisis de las muestras de plasma (A) y fluido oral (B) del paciente 1 la semana 1.....	211
<b>Figura 42.</b> Cromatogramas de las transiciones empleadas en la detección de venlafaxina, clomipramina y norclomipramina obtenidos tras el análisis de las muestras de plasma y fluido oral del paciente 1 la semana 2.....	212
<b>Figure 43.</b> Representation of the on-line SPE by means of an extraction support. In the column-switching configuration (B), the extraction support is moved in line with the analytical column when the clean-up has already finished (from [2]).....	222

**Figure 44.** On-line SPE Symbiosis Pharma System coupled to Quattro Premier tandem mass spectrometer..... 224

**Figure 45.** Scheme of the on-line SPE-LC system coupled to the MS/MS. (A) While loading the sample into the sample loop, the first SPE cartridge is being conditioned in the left clamp. (B) Loading of the sample onto the cartridge followed by the washing steps. (C) The cartridge is moved to the right clamp, where the sample is eluted; the analytes are subsequently retained on the focussing column. Simultaneously, a second sample is subjected to the initial procedure of extraction in the left clamp. (D) After the elution step, the MS valve is switched and the analytes are directed to the analytical column in connection to the MS/MS. Following the analysis of the first sample, the second SPE cartridge is transferred to the right clamp in order to be eluted and analysed..... 226

**Figure 46.** Chromatograms of the quantifying transitions for all the antidepressants at the LOQ= 10ng/mL..... 230

**Figure 47.** Chromatograms of the selected transitions for venlafaxine and trazodone after the analysis of case number 51026/792. Concentrations found for both compounds are specified in table 26..... 235

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales fármacos antidepresivos comercializados clasificados según su mecanismo de acción.....	7
<b>Tabla 2.</b> Principales enzimas implicadas en la metabolización de los antidepresivos.....	20
<b>Tabla 3.</b> Valores promedio de $t_{1/2}$ de los antidepresivos en estudio.....	22
<b>Tabla 4.</b> Isoenzimas del complejo P450 inhibidas por distintos antidepresivos y las posibles interacciones que pueden surgir en combinación con otros fármacos.....	27
<b>Tabla 5.</b> Valores promedio de $t_{1/2}$ e influencia de determinadas condiciones fisiológicas.....	48
<b>Tabla 6.</b> Rangos de concentraciones terapéuticas recogidos en el listado de la TIAFT.....	53
<b>Tabla 7.</b> Descripción de los métodos analíticos para la determinación de antidepresivos en los que se utilizó la técnica LC-MS(/MS).....	72
<b>Tabla 8.</b> Procedimiento de SPE aplicado a las muestras de plasma y saliva mediante la utilización del sistema automático de extracción ASPEC XL.....	148
<b>Tabla 9.</b> Distintas columnas analíticas ensayadas en la separación cromatográfica de los compuestos antidepresivos.....	149
<b>Tabla 10.</b> Método cromatográfico utilizado en la separación de los 13 antidepresivos en estudio.....	149
<b>Tabla 11.</b> Valores de los parámetros del espectrómetro de masas seleccionados...	151
<b>Tabla 12.</b> Criterios de aceptación en la intensidad relativa de iones publicados por la Agencia Mundial Antidoping [10].....	160
<b>Tabla 13.</b> Resumen de parámetros y experimentos llevados a cabo en el estudio de validación de la metodología analítica descrita.....	164

<b>Tabla 14.</b> Método MRM utilizado en la detección de los compuestos en estudio.....	183
<b>Tabla 15.</b> Ecuaciones de las rectas de calibración de los compuestos que siguieron un comportamiento lineal $y=a+bx$ ó cuadrático $y=a+bx^2+cx$ (fluvoxamina) en el rango de concentraciones estudiado en plasma (2 ó 4-1000ng/mL) y fluido oral (2-500ng/mL).....	190
<b>Tabla 16.</b> Principales parámetros de validación del método analítico en plasma. La precisión, exactitud y la intensidad relativa de iones se calcularon a LOQ (2 ó 4ng/mL), concentración baja (20ng/mL), concentración media (500ng/mL) y concentración alta (1000ng/ml) con respecto al rango estudiado. El rendimiento de la extracción se calculó a 20 y 800ng/mL.....	192
<b>Tabla 17.</b> Principales parámetros de validación del método analítico en fluido oral. La precisión, la exactitud y la intensidad relativa de iones se estudiaron al LOQ (2ng/mL), concentración baja (4ng/mL), concentración media (100ng/mL) y concentración alta (500ng/ml) con respecto al rango estudiado. El rendimiento de la extracción se calculó a 10 y 250ng/mL.....	194
<b>Tabla 18.</b> Resultados de la estabilidad de los antidepresivos en estudio en plasma al someter las muestras a tres ciclos de congelado/descongelado. Se muestran los valores de precisión (C.V.) y exactitud (M.R.E) con respecto a los resultados obtenidos para las muestras control.....	201
<b>Tabla 19.</b> Resultados de la estabilidad de los antidepresivos en estudio en fluido oral al someter las muestras a tres ciclos de congelado/descongelado. Se muestran los valores de precisión (C.V.) y exactitud (M.R.E) con respecto a los resultados obtenidos para las muestras control.....	202
<b>Tabla 20.</b> Casos positivos a antidepresivos durante los años 2005 y 2006.....	203
<b>Tabla 21.</b> Concentraciones de antidepresivos encontradas en plasma y saliva, así como la correlación de los niveles obtenidos en ambos medios en los casos en los que se dispuso de muestra en las dos semanas.....	210
<b>Table 22.</b> Selected MRM conditions, retention time and internal Standard used for	



each compound.....	228
<b>Table 23.</b> Main validation parameter results, including calibration model, matrix effect and intra and inter-assay precision and accuracy for all the compounds.....	231
<b>Table 24.</b> Results from real cases after the screening analysis and their confirmation and quantification after their analysis with the on-line SPE-LC-MS/MS method.....	235



## ABREVIATURAS

<b>5-HT</b>	5-hidroxitriptamina o serotonina
<b>ADT</b>	Antidepresivo tricíclico
<b>APCI</b>	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Ionización química a presión atmosférica)
<b>API</b>	Atmospheric Pressure Ionization (Interfases a presión atmosférica)
<b>CI</b>	Chemical Ionization (Ionización química)
<b>CID</b>	Collision Induced Dissociation (Ionización por colisión inducida)
<b>CV</b>	Coeficiente de Variación
<b>DAD</b>	Diode Array Detector (Detector de array de diodos)
<b>DLI</b>	Direct liquid introduction
<b>ECD</b>	Electron Capture Detector (Detector de captura electrónica)
<b>EI</b>	Electron Impact (Impacto electrónico)
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent assay
<b>EMIT</b>	Enzyme Multiplied ImmunoAssay
<b>ESI</b>	Electrospray Ionization (Ionización por electrospray)
<b>FAB</b>	Fast atom bombardement
<b>FID</b>	Flame Ionization Detector (Detector de ionización de llama)
<b>FT-ICR</b>	Fourrier transform-ion ciclotron resonante
<b>GC</b>	Gas chromatography (Cromatografía gaseosa)
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución)
<b>ISRS</b>	Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina
<b>IT</b>	Ion trap (Trampa de iones)
<b>LC</b>	Liquid Chromatography (Cromatografía líquida)
<b>LL</b>	(Extracción) Líquido-Líquido
<b>LLOQ</b>	Lower Limit Of Quantitation (límite inferior de cuantificación)
<b>LOD</b>	Limit Of Detection (Límite de detección)
<b>MB</b>	Moving Belt

<b>MEKC</b>	Micelar electrokinetic capilar chromatography (cromatografía capilar micelar electrocinética)
<b>MRE</b>	Mean Relative Error (error relativo medio)
<b>MRM</b>	Multiple Reaction Monitoring
<b>MS</b>	Mass Spectrometry (Espectrometría de masas)
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NPD</b>	Nitrogen Phosphorous Detector (Detector de nitrógeno fósforo)
<b>P450 (CYP)</b>	Citocromo P450
<b>PB</b>	Particle Beam (Haz de partículas)
<b>PI</b>	Patrón interno
<b>Q</b>	Quadrupole (Cuadrupolo)
<b>QqQ</b>	Triple Quadrupole (Triple cuadrupolo)
<b>RIA</b>	Radioinmunoassay
<b>SIM</b>	Selected Ion Monitoring (Modo de selección de ion)
<b>SNC/SNA</b>	Sistema Nervioso Central/Sistema Nervioso Autónomo
<b>SPE</b>	Solid-Phase Extraction (Extracción en fase sólida)
<b>SPME</b>	Solid-Phase Microextraction (Microextracción en fase sólida)
<b>SSI</b>	Sonic Spray Ionization
<b>TDM</b>	Therapeutic Drug Monitoring (Monitorización terapéutica de fármacos)
<b>TLC</b>	Thin Layer Chromatography (Cromatografía en capa fina)
<b>TSP</b>	Thermospray Probe (Sonda de termospray)
<b>TOF</b>	Time Of Flight (tiempo de vuelo)
<b>ULOQ</b>	Upper Limit Of Quantitation (Límite superior de cuantificación)
<b>UV</b>	Ultravioleta

# I. ASPECTOS GENERALES Y FARMACOLOGÍA DE LOS ANTIDEPRESIVOS



## 1.1. INTRODUCCIÓN A LA DEPRESIÓN

La depresión es un trastorno mental que afecta en la actualidad a aproximadamente 121 millones de personas [1]. El riesgo de sufrir esta enfermedad en algún momento de la vida se sitúa entorno al 5-10%, con alta probabilidad de recurrencia, siendo su frecuencia aproximadamente el doble en mujeres que en hombres [2].

Algunas conclusiones del estudio “Global Burden of Disease” (2000), conducido por la OMS, el Banco Mundial y la Universidad de Harvard, sitúan a la depresión mayor unipolar como la cuarta de las enfermedades en *Disability Adjusted Life Years* o *Años de Vida Ajustados por Discapacidad* (DALY o AVAD, respectivamente) en los países en desarrollo, y primera causa de incapacidad. DALY es la suma de los años de vida perdidos debido a la mortalidad prematura más los años perdidos por incapacidad producida por las condiciones de salud, y es una medida creada para permitir la comparación entre las diferentes enfermedades. Se calcula que para el 2020 la depresión se situará en segundo lugar después de la isquemia cardiaca [3]. Un aspecto particularmente trágico de la depresión es su elevada asociación al suicidio, ya que el 10-15% de los pacientes con depresión clínica severa, y hasta un 25% de los pacientes con trastorno bipolar presentan un comportamiento suicida en algún momento [4].

Generalmente, los profesionales médicos basan su diagnóstico en la presencia de ciertos síntomas listados en la 4ª edición de *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)*, publicado por la Asociación Americana de Psiquiatría (APA) [5], o la *Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10)*, de la que es responsable la Organización Mundial de la Salud (OMS). Entre estos síntomas se incluyen la aparición de tristeza, pérdida de interés por actividades que antes resultaban placenteras, sentimientos de culpabilidad y baja autoestima, alteración del sueño y del apetito, problemas de concentración y en la toma de decisiones; en el peor de los casos, pensamientos recurrentes de suicidio/ muerte [5,6,7].

De manera general, se considera que una persona está clínicamente deprimida si presenta al menos cinco de estos síntomas, y la incapacidad para llevar una vida con normalidad la mayoría de los días durante un período de dos semanas. Aún así, el diagnóstico de la depresión basado en esta lista de síntomas no es simple, de modo que debe apoyarse también en la historia clínica del paciente, los hallazgos de un completo examen físico, y los análisis de laboratorio con los que descartar la aparición de síntomas depresivos como consecuencia de otro problema médico [5].

A pesar de la utilización de criterios diagnósticos protocolizados por el empleo de las citadas guías, de la existencia de tratamientos nuevos y de mayor eficacia y, sobre todo, del mayor conocimiento de la neurobiología de la depresión, los estudios indican que aproximadamente un 30% de los casos pasan desapercibidos [5].

#### ❖ **Trastornos depresivos**

Se distinguen 3 tipos principales según su forma clínica [8,9]:

- Depresión severa (o trastorno depresivo grave), que se manifiesta con la presencia de al menos cinco de los síntomas listados en DSM-IV durante un periodo mínimo de dos semanas (se clasifica como depresión leve si son menos de cinco los síntomas presentes). Puede que se de en una única ocasión, pero lo más habitual es que se manifieste con varios episodios a lo largo de la vida.
- Distimia (o trastorno distímico), es un tipo de depresión menos severo que incluye la presencia de una sintomatología crónica que no incapacita tanto, pero que sin embargo interfiere en el funcionamiento y el bienestar del individuo. Muchas personas con distimia pueden experimentar episodios depresivos severos en algún momento de su vida.
- Trastorno bipolar (o *enfermedad maniaco-depresiva*), caracterizado por la aparición de cambios cíclicos entre estados depresivos y maníacos. Estos cambios de estado pueden ser drásticos, aunque graduales. La fase depresiva se puede presentar con la aparición de



alguno o todos los síntomas de la depresión. Durante la fase maníaca la persona puede estar hiperactiva, hablar excesivamente y tener una gran cantidad de energía; a menudo afecta a la forma de pensar, el juicio y la manera de relacionarse con los demás.

Las manifestaciones clínicas y tratamiento actual de los “trastornos del humor” se superponen con los de los trastornos de ansiedad (pánico-agorafobia, fobias graves, y trastorno de ansiedad generalizado, de ansiedad social, de estrés postraumático y obsesivo-compulsivo) [4].

## **1.2. INICIOS DE LA FARMACOTERAPIA ANTIDEPRESIVA [4,10]**

El inicio de la farmacoterapia aplicada a los trastornos afectivos tiene su origen en la década de 1950, con el descubrimiento fortuito de la presencia de acción antidepresiva en dos fármacos comercializados inicialmente con otros fines terapéuticos, la **iproniazida** y la **imipramina**.

### **Iproniazida**

En 1951 se desarrolla la isoniazida como potente antituberculoso. Continuando esta línea de investigación, se encuentra posteriormente un derivado isopropílico, la iproniazida, con mayor acción tuberculostática en humanos. Se observó, además, que los pacientes tuberculosos tratados con este fármaco desarrollaban efectos elevadores del humor. En 1952, Zeller y col. realizan un descubrimiento crucial para la caracterización de la acción antidepresiva de este fármaco, con la descripción de la acción inhibidora de la iproniazida sobre la monoaminoxidasa (MAO), no encontrada en su precursor isoniazida. En 1957, durante la Reunión de la American Psychiatric Association (APA), Crane comunica los primeros datos sobre el efecto antidepresivo de la iproniazida en pacientes con tuberculosis. Posteriormente, Kline y col. fueron los primeros en valorar la eficacia antidepresiva en pacientes no tuberculosos. Siguiendo esta línea de investigación, la iproniazida (Marsilid) se convirtió en el primer antidepresivo utilizado clínicamente.

## **Imipramina**

A finales de la década de 1940, Häfliger y Schindler sintetizan una serie de derivados iminodibenzílicos para ensayar su uso con distintas finalidades terapéuticas. Uno de estos compuestos fue la imipramina, una dibenzazepina inicialmente evaluada como agente antihistamínico. Su similitud estructural a las fenotiazinas, y la comercialización de la clorpromacina para su uso en el ámbito psiquiátrico en 1952, llevan a pensar en su posible uso como agente antipsicótico. De esta manera, en 1956, R. Kuhn lleva a cabo un ensayo clínico en el que detecta, en contra de lo esperado, su ineffectividad para calmar a los pacientes psicóticos agitados pero, sin embargo, un remarcable efecto en pacientes deprimidos. Así, en 1958, la compañía farmacéutica Geigy lanza al mercado este fármaco con el nombre de Tofranil, convirtiéndose en el primer representante de una nueva familia de fármacos, conocida como antidepresivos imipramínicos o tricíclicos.

### 1.3. CLASIFICACIÓN DE FÁRMACOS ANTIDEPRESIVOS

Tradicionalmente, los antidepresivos se han clasificado combinando criterios químicos y funcionales. Sin embargo, dada su diversidad estructural, hoy en día tiende a utilizarse el mecanismo de acción como criterio de clasificación [11].

En la Tabla 1 se recogen los principales grupos de fármacos antidepresivos siguiendo este criterio. De todos ellos, los antidepresivos tricíclicos (ADTs), los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRSs) y la Venlafaxina constituyen el 90% de los fármacos empleados actualmente en el tratamiento de la depresión.

**Tabla 1.** Principales fármacos antidepresivos comercializados clasificados según su mecanismo de acción

MECANISMO DE ACCIÓN		PRINCIPALES REPRESENTANTES
Inhibición de la monoamino oxidasa (IMAO)	Irreversibles de MAO A y B	iproniazida, fenelcina, tranilcipromida
	Irreversibles selectivos de MAO A	clorgilina
	Reversibles selectivos de MAO A (RIMA)	moclobemida
Inhibición recaptación NA y 5-HT	No selectivos (Heterocíclicos)	Tricíclicos: amitriptilina, imipramina, clomipramina, trimipramina, doxepina, protiptilina Tetracíclicos: amoxapina, maprotilina
	Selectivos (IRSNA)	venlafaxina
Inhibición selectiva recaptación de 5-HT (ISRS)		fluoxetina, paroxetina, fluvoxamina, citalopram, sertralina
Inhibición selectiva recaptación NA (ISNA)		reboxetina
Inhibición de la recaptación de DA (y NA)		Bupropión (e hidroxibupropión)
Antagonismo de receptores 5-HT y NA (ASSNA)		mirtazapina
Inhibición recaptación 5-HT y antagonismo 5-HT		trazodona, nefazodona

#### 1.4. MECANISMO DE ACCIÓN

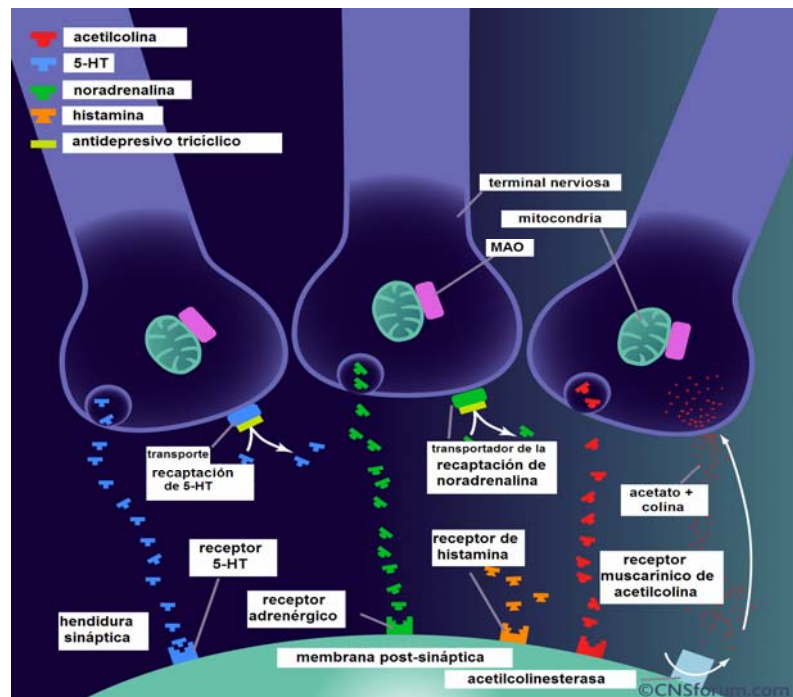
Todavía no están claros los mecanismos por los que los fármacos antidepresivos ejercen su acción, hecho limitado a su vez por la falta de una teoría única en la etiología de la depresión. Sin embargo, la implicación de los neurotransmisores monoaminérgicos parece clara ya que, además de la existencia de numerosos datos experimentales que apoyan esta afirmación, los estudios en pacientes deprimidos demuestran la importancia del correcto funcionamiento de los sistemas monoaminérgicos para combatir la depresión.

De esta manera, todos los antidepresivos comercializados hasta el momento realizan su efecto sobre estos sistemas de neurotransmisión mediante su actuación sobre tres posibles procesos diferentes: la degradación de los neurotransmisores, su recaptación neuronal o sus receptores [12].

La mayoría de ellos ejercen su acción mediante la inhibición de la recaptación de los neurotransmisores monoaminérgicos. Según la hipótesis catecolaminérgica y serotoninérgica, la acción inhibitoria sobre la recaptación de noradrenalina (NA) y serotonina (5-HT) conduciría, finalmente, al incremento de estas aminas en el espacio sináptico, cuyos niveles se encuentran disminuidos en el enfermo depresivo. La acción no es inmediata, como cabría esperar dado la rápida elevación de los neurotransmisores, sino que los efectos antidepresivos tienen un periodo de latencia de 2 a 4 semanas. Este hecho dio lugar a nuevas teorías que sugieren que el aumento inicial de las monoaminas en el espacio sináptico conduce inicialmente a la hiperactivación de los autorreceptores presinápticos  $\alpha_2$ -adrenérgicos y/o 5-HT<sub>1A</sub>, con la consiguiente retroalimentación negativa sobre la síntesis y liberación de NA y/o 5-HT, respectivamente. Tras el tratamiento durante 1 ó 2 semanas se produce como consecuencia la desensibilización o disminución de los autorreceptores, con el consiguiente aumento de la transmisión de los neurotransmisores [3,13].

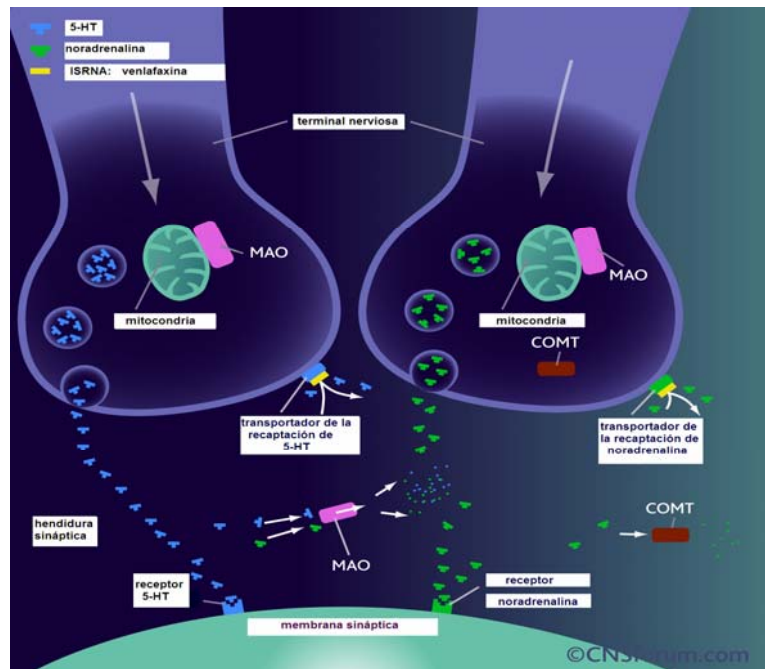
### 1.4.1. Inhibidores de la recaptación de NA y 5-HT

Los **antidepresivos tricíclicos (ADTs)** ejercen su acción antidepresiva mediante el bloqueo de la bomba recaptadora de NA y 5-HT, aumentando la transmisión de estos neurotransmisores monoaminérgicos. Los compuestos con cadenas laterales de aminas secundarias (desipramina, norclomipramina, nortriptilina) son relativamente selectivos sobre el transporte noradrenérgico. Además de esta acción, responsable del efecto antidepresivo, los fármacos pertenecientes a este grupo se comportan como antagonistas de los receptores colinérgico-muscarínicos, histaminérgicos  $H_1$  y adrenérgicos  $\alpha_1$ , acción que da lugar a la aparición de sus principales efectos secundarios [12,13,14].



**Figura 1.** Mecanismo de acción responsable del efecto antidepresivo de los ADTs. El bloqueo de los receptores histaminérgicos, muscarínico-colinérgicos, así como el bloqueo de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos es responsable de sus efectos secundarios.

La **Venlafaxina** es un potente inhibidor de la recaptación neuronal de NA y 5-HT y, de forma más débil, de dopamina (DA). Presenta muy poca afinidad por receptores colinérgicos muscarínicos,  $\alpha_1$ -adrenérgicos e histaminérgicos  $H_1$ .

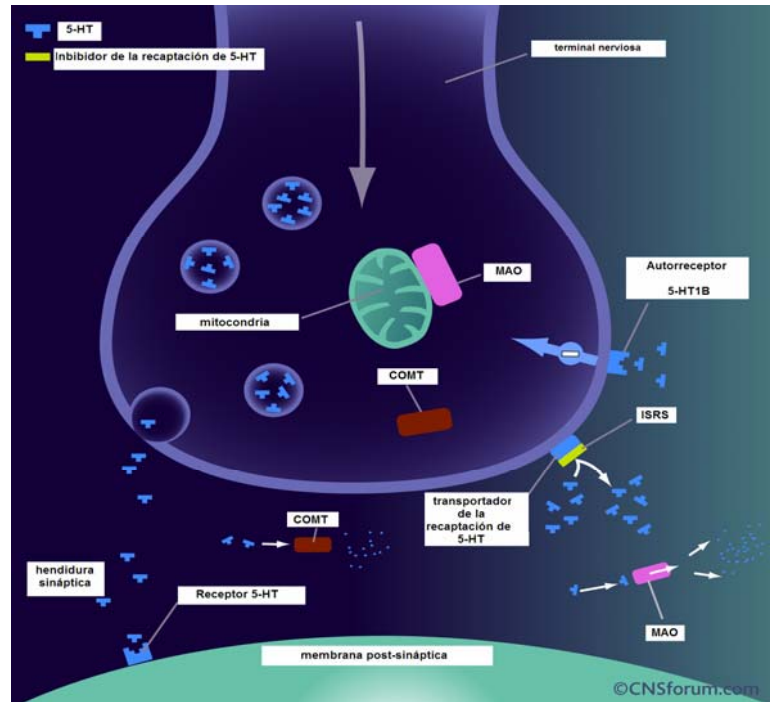


**Figura 2.** Mecanismo de acción de la venlafaxina. Su mayor selectividad en el bloqueo de NA y 5-HT es responsable de su mayor seguridad y menor número de efectos adversos.

#### 1.4.2. Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS)

Este grupo de fármacos actúa facilitando la transmisión serotoninérgica mediante la inhibición selectiva de la recaptación de 5-HT en la sinapsis [15]. Presentan baja actividad sobre la recaptación de NA, y muy baja afinidad por los receptores sobre los que actúan estos neurotransmisores [16].

Los ISRS constituyen la primera clase de psicofármacos diseñados racionalmente. La mayor selectividad de los ISRS sobre la recaptación de 5-HT, y su inapreciable influencia sobre otros receptores, permitió la obtención de fármacos más seguros y mejor tolerados que los ADTs. Además, la experiencia con este grupo de fármacos sugiere que su aplicación es bastante más amplia, ya que pueden ser utilizados en pacientes con otras condiciones patológicas frecuentemente asociadas a la depresión, como el trastorno de ansiedad, obsesivo-compulsivo, pánico o agorafobia. Sin embargo, existe la percepción general de que presentan menor efectividad en los casos de depresión más severos [17,18,19], en parte debido a la carencia de efecto sobre NA, por lo que los ADTs siguen siendo los fármacos de elección en determinadas situaciones.



**Figura 3.** Mecanismo de acción de los ISRS mediante el bloqueo selectivo de la recaptación de 5-HT.

## 1.5. APLICACIONES TERAPÉUTICAS [4,13]

### 1.5.1. Depresión

No todos los tipos de depresión requieren tratamiento médico. Los antidepresivos se reservan generalmente para las enfermedades depresivas más graves e incapacitantes, apoyado por el hecho de que los resultados más satisfactorios se observan en pacientes con cuadros moderadamente graves con características melancólicas, y sin rasgos psicóticos.

La evaluación del tratamiento antidepresivo es complicada ya que, aproximadamente, el 30-40% de los pacientes responden al placebo y un 40% incumple el tratamiento prescrito. Generalmente, en la evaluación de la eficacia antidepresiva se emplean escalas validadas, entre las que destacan la Escala de Depresión de Hamilton y la Escala de Depresión de Montgomery-Åsberg, con las que se decide cuándo un paciente ha respondido o cuándo ha remitido

su trastorno. A partir de los resultados obtenidos en ensayos clínicos bien diseñados, se estima que el 45-65% de los pacientes responde al tratamiento, aunque sólo el 40% alcanza la remisión al final del estudio.

Los antidepresivos son menos eficaces en niños y ancianos, en la depresión bipolar y en los casos graves, crónicos o psicóticos. A pesar de que el empleo de antidepresivos en la infancia y en la adolescencia se ha adelantado a la obtención de resultados definitivos que demuestren su eficacia, se considera que su prescripción en determinados casos de depresión es razonable, ya que ésta se asocia a un incremento de la morbilidad y la mortalidad, y con frecuencia, la depresión persiste en la edad adulta. En cualquier caso, estudios recientes desaconsejan el uso de algunos ISRSs (paroxetina) en niños, ya que se ha asociado a un incremento del riesgo de suicidio [20-23].

En cuanto a la selección del antidepresivo, los ADTs han sido sustituidos en gran medida por nuevos agentes menos tóxicos como los ISRSs, considerándose los fármacos de primera elección en esta indicación. Aún así, los ADTs siguen teniendo utilidad en las formas más graves y en la depresión refractaria [24].

El riesgo de recaída es elevado en los primeros meses tras la remisión del estado depresivo. Por esta razón, suele prescribirse un tratamiento depresivo de continuación de 6 a 12 meses de duración. En determinados casos de mala evolución puede que sea necesario seguir con el antidepresivo una vez terminada la fase de continuación.

### **1.5.2. Ansiedad**

La ansiedad es un síntoma muy común de muchos trastornos psiquiátricos. Los síntomas de ansiedad concurren a menudo con depresión y, en especial, con el trastorno distímico (depresión crónica y de gravedad moderada), pánico, agorafobia y otras fobias específicas, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno del estrés postraumático, alteraciones de la alimentación y muchos trastornos de la personalidad. En estas situaciones, las



benzodiazepinas y los antidepresivos del grupo de los ISRSs son los fármacos de primera línea. En el tratamiento de los trastornos de pánico y en el síndrome del estrés postraumático, aunque los ISRSs pueden ser eficaces, se emplean generalmente ADTs, así como benzodiazepinas de alta potencia, que son eficaces en el bloqueo de la expresión de pánico en el sistema nervioso autónomo.

### 1.5.3. Otras aplicaciones

Además de las mencionadas anteriormente, las indicaciones de los antidepresivos han ido aumentando, sobre todo a partir de la introducción de nuevos agentes menos tóxicos y mejor aceptados por médicos y pacientes.

Entre estas aplicaciones se incluye:

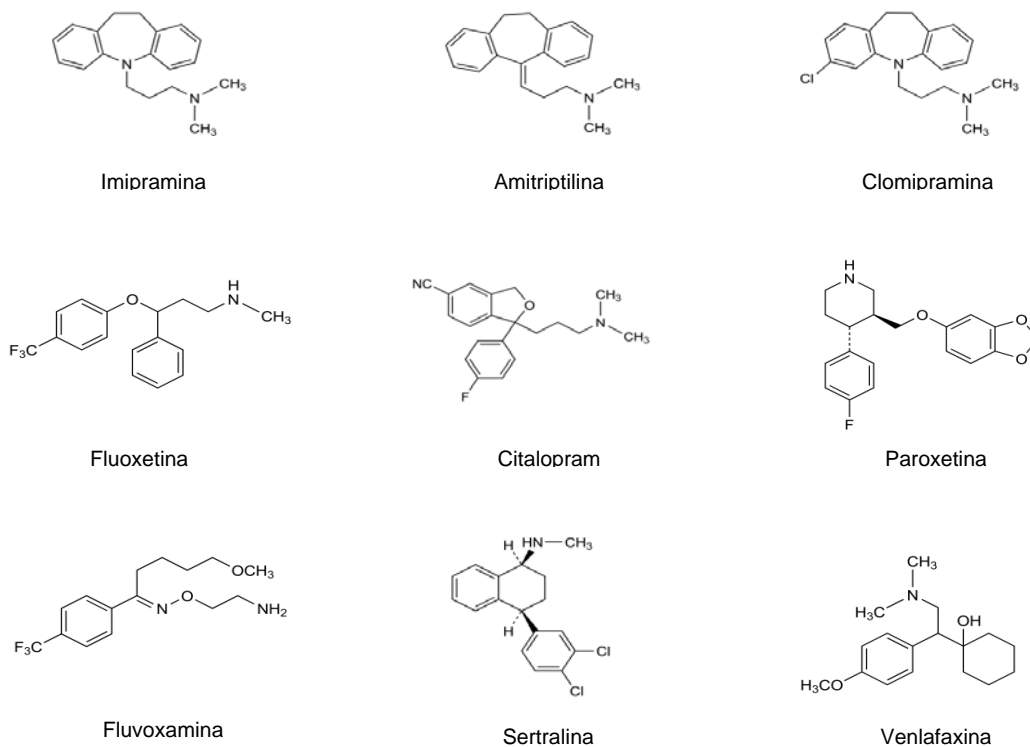
- Supresión rápida, pero temporal de la *eneuresis nocturna* en niños y ancianos. Los fármacos empleados son ADTs a bajas dosis, antes de acostarse. A pesar de su eficacia, muchos autores desaconsejan su uso en niños menores de 6 años debido al riesgo de intoxicaciones accidentales [26].
- *Trastorno de déficit de atención con hiperactividad* en niños y adultos. Generalmente se emplean ADTs como imipramina, desipramina y nortriptilina. Los antidepresivos tienden a producir una mejoría más sostenida de los síntomas característicos de este trastorno que los estimulantes, y no inducen tics u otros movimientos anormales que con frecuencia conlleva el uso de estos últimos [26].
- Pueden mejorar, al menos parcialmente, algunos *trastornos de tipo psicósomático*: cuadros de dolor crónico (síndromes de neuropatía diabética o periférica de otro tipo), fibromialgia, úlcera péptica y síndrome de colon irritable, bochornos de la menopausia, síndrome de fatiga crónica, cataplejía, tics, migraña y apnea del sueño [27,28,29].

## 1.6. ESTRUCTURA

Como ya se comentó, los fármacos antidepresivos difieren de forma importante en su estructura química.

Los ADTs presentan como base común en su estructura un grupo tricíclico. El primer ADTs fue la imipramina, que presenta un anillo imidindobencilo como estructura base y una pequeña cadena lateral amino terciaria. Ligeras modificaciones en su cadena lateral y/o en su anillo central dio lugar al resto de los fármacos de este grupo. La principal diferencia en la estructura química que tendrá efecto sobre la selectividad y potencia de acción se encuentra en la cadena lateral. Así, los ADTs con una amina secundaria en su cadena lateral presentan una mayor selectividad por inhibición de la recaptación de NA.

Los ISRSs comparten un mismo mecanismo de acción antidepresivo relativamente específico en el bloqueo presináptico de 5-HT, pero constituyen un grupo muy heterogéneo en cuanto a su estructura química.



**Figura 4.** Estructura química de los fármacos antidepresivos en estudio.

Un aspecto estructural importante en cuanto a la potencia de acción y de la farmacocinética es que todos los ISRSs, excepto la fluvoxamina, presentan uno o más carbonos asimétricos que van a dar lugar a la existencia de distintos enantiómeros.

En el caso de la paroxetina y la sertralina, las formulaciones comercializadas contienen sólo uno de los enantiómeros. Sin embargo, la fluoxetina y la venlafaxina están comercializados como mezcla racémica (mezcla en un 50% de sus dos enantiómeros), y el citalopram se encuentra comercializado tanto como mezcla racémica, como conteniendo sólo el isómero S, escitalopram. La importancia de este hecho radica en que los distintos enantiómeros pueden presentar importantes diferencias desde el punto de vista farmacológico y farmacocinético. Se posee cierta información sobre este aspecto, aunque puede que existan diferencias importantes que todavía se desconocen [30].

## **1.7. FARMACOCINÉTICA**

Debido a su bajo grado de similitud estructural, los distintos grupos de fármacos antidepresivos presentan importantes diferencias en su farmacocinética.

### **1.7.1. Absorción**

En general, todos los antidepresivos presentan buena absorción tras la administración oral. A pesar de ello, la mayoría de los ADTs sufre un importante efecto de primer paso hepático, reduciendo su biodisponibilidad, que varía entre un 50-80%. Es menos notable en el caso de la Venlafaxina y los ISRSs, con una biodisponibilidad entre al 80-100%, excepto para fluvoxamina y paroxetina, que se encuentra entorno al 50% [31,32]

Se absorben de forma rápida, entre 1-3 horas la venlafaxina y los ADTs que son aminas terciarias, y algo más lentamente los ADTs aminas

secundarias [21] y los ISRSs, que alcanzan las concentraciones plasmáticas máximas a la 3-8 horas [31,33].

La ingesta de alimentos produce escasas o nulas modificaciones en la absorción [34], salvo para la sertralina, cuya biodisponibilidad se ve ligeramente incrementada [35,36] como consecuencia de una disminución del metabolismo de primer paso por el aumento de la circulación portal. En el caso de la fluoxetina, la absorción se ralentiza, aunque la fracción de fármaco absorbido no se ve alterada.

### **1.7.2. Distribución**

Se unen altamente a proteínas plasmáticas (90-95%), exceptuando a fluvoxamina, citalopram y venlafaxina, cuya unión es aproximadamente de un 70%, un 50% y un 30%, respectivamente [4,32,37]. La elevada unión a proteínas plasmáticas aumenta el riesgo de interacción por desplazamiento de otras sustancias que presenten también un alto porcentaje de unión a proteínas. Sin embargo, este tipo de interacción es poco probable, posiblemente debido a que se unen preferentemente al ácido de la  $\alpha_1$ -glicoproteína.

Todos los antidepresivos son fármacos altamente lipofílicos, por lo que se distribuyen ampliamente por todo el organismo, y atraviesan la barrera hematoencefálica.

Los elevados volúmenes de distribución reflejan una tendencia importante a su acumulación en tejidos. Los volúmenes de distribución de los ADTs varían entre 10-50L/kg [4], y entre 12-25L/kg en el caso de SSRIs. La fluoxetina presenta un valor especialmente elevado y variable, en torno a 14-100L/kg [31].

Los ADTs atraviesan la barrera placentaria. Además, tanto los ADTs como los ISRSs se excretan a través de la leche materna, llegando a alcanzar concentraciones similares a las plasmáticas en el caso de la paroxetina [32]. Por ello, el uso de estos fármacos durante el embarazo y la lactancia debe evitarse.

Un aspecto importante en cuanto a la distribución de los ADTs, dado su perfil de toxicidad, es su tendencia y la de sus metabolitos de anillo hidroxilo a acumularse en el tejido cardíaco, lo que incrementa su riesgo de cardiotoxicidad [4].

### **1.7.3. Metabolización**

Los ADTs tienen, además de un perfil farmacológico similar, una estructura base común, por lo que sus vías metabólicas siguen un patrón parecido.

Sin embargo, los ISRSs, como se comentó previamente, comparten como grupo el mecanismo de acción antidepresivo, pero estructuralmente son compuestos muy diferentes. Esto da lugar a importantes diferencias farmacocinéticas, fundamentalmente en la biotransformación. Concretamente, estas diferencias consisten en la existencia o no de metabolitos activos, en las principales enzimas responsables de su metabolización, en el tipo de cinética de eliminación y en los valores de  $t_{1/2}$ .

Todos ellos se metabolizan fundamentalmente por acción de distintas isoenzimas pertenecientes al sistema enzimático P450.

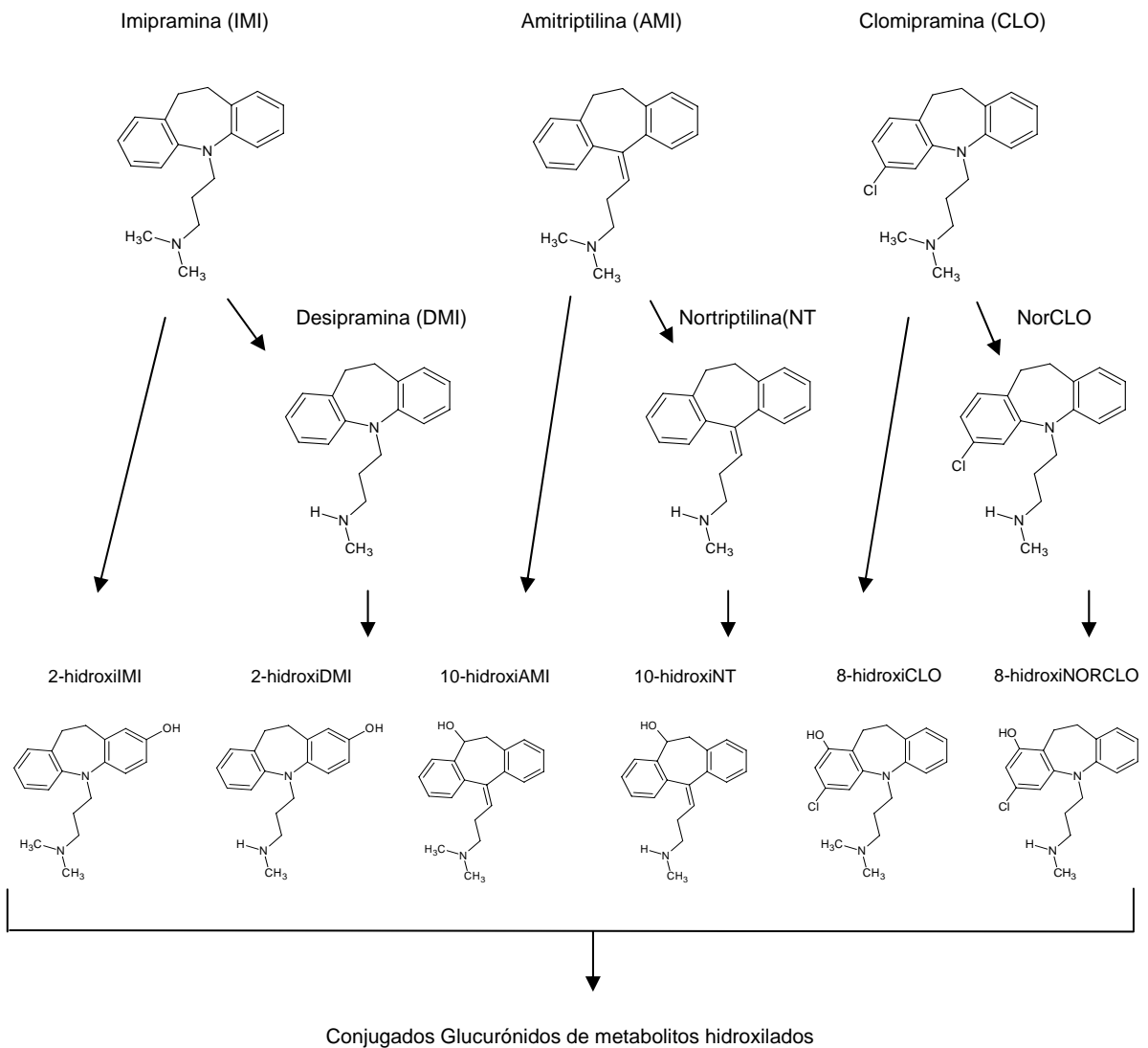
### **Antidepresivos tricíclicos**

Se metabolizan fundamentalmente en el hígado mediante reacciones de oxidación, y posterior conjugación con ácido glucurónico. Las bacterias gastrointestinales también pueden contribuir a su metabolización, participando en la importante variabilidad observada en sus concentraciones plasmáticas [38].

Las aminas terciarias sufren N-desmetilación de la cadena lateral para dar lugar a aminas secundarias, sus principales metabolitos activos. Una segunda desmetilación conduce a la formación de metabolitos inactivos.

Tanto las aminas terciarias como las secundarias se metabolizan posteriormente mediante hidroxilación. En el caso de la imipramina y la

desipramina, la hidroxilación se produce preferentemente en la posición 2 del anillo aromático, mientras que amitriptilina y nortriptilina, así como clomipramina y norclomipramina, lo hacen en el anillo alifático, en posiciones 10 y 8, respectivamente [39,40,41]. Se asumió durante bastante tiempo la inactividad de los metabolitos hidroxilados. Sin embargo, las altas concentraciones plasmáticas presentes en los pacientes a tratamiento motivaron el estudio de su posible actividad farmacológica, actualmente demostrada, y probablemente contribuyen en cierta medida al efecto clínico del fármaco. Su unión a receptores mucarínicos de la acetilcolina es más débil que la de sus precursores, lo que sugiere un menor efecto anticolinérgico [40,42,43].



**Figura 5.** Principales vías metabólicas de imipramina, amitriptilina y clomipramina.

Los procesos de biotransformación son catalizados por isoenzimas del citocromo P450. La desmetilación es llevada a cabo principalmente por CYP2C19 y la hidroxilación por CYP2D6, lo que confiere a esta última isoenzima un papel predominante en la inactivación [44]. Otras isoenzimas de P450 participan también en menor medida.

### **Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina**

Todos ellos se metabolizan mayoritariamente a nivel hepático.

La principal vía metabólica de *fluoxetina*, *citalopram* y *sertralina* es la desmetilación para dar lugar a sus nor-derivados. Tanto sertralina como norsestralina son transformados posteriormente a cetonas y derivados hidroxilados [45]. El citalopram sufre una segunda N-desmetilación a didesmetilcitalopram [46].

En cuanto a la actividad de los metabolitos, fluoxetina da lugar a norfluoxetina, su principal metabolito activo. A pesar de que no hay diferencia importante en la potencia farmacológica de los dos enantiómeros de la fluoxetina, sí es significativa en el caso de la norfluoxetina, cuyo enantiómero S presenta una potencia 20 veces mayor en el bloqueo de la recaptación de serotonina [31,47], contribuyendo de forma significativa al efecto terapéutico. En cuanto a la biotransformación, el isómero S se metaboliza más rápidamente, y su potencia inhibidora sobre CYP2D6 es mayor [47,48]. El citalopram da lugar a desmetilcitalopram y didesmetilcitalopram. Los enantiómeros S son potentes inhibidores de la recaptación de serotonina, mientras que los R son relativamente inactivos [49], lo que dificulta la interpretación de los niveles plasmáticos de este fármaco. En el equilibrio, la concentración del isómero S representa una tercera parte de la concentración total [50]; sin embargo, existe variabilidad en esta proporción entre diferentes individuos, que puede deberse a diferencias genéticas en la expresión del enzima CYP2C19, principal responsable de su metabolismo. El principal metabolito de la sertralina, norsestralina, conserva sólo un 5-10% de la actividad farmacológica, considerándose clínicamente inactivo [34].

La *paroxetina* se oxida a nivel del puente metilendioxi para dar lugar a un catecol inestable, que sufre posteriormente metilación en posición meta o para por acción de O-metiltransferasas. Posteriormente son conjugados con ácido sulfúrico o glucurónico. Ninguno de sus metabolitos es activo [31].

La *fluvoxamina* se metaboliza mediante desmetilación y desaminación oxidativa. Se han identificado 11 metabolitos. Ninguno de ellos contribuye al efecto terapéutico del fármaco original [51].

### Venlafaxina [52]

La O-desmetilación de su mezcla racémica es la ruta predominante, dando lugar a O-desmetilvenlafaxina. Su formación está catalizada por la isoenzima CYP2D6. Otras vías importantes son la N-desmetilación de la cadena alquil, catalizada por CYP3A6, así como la pérdida del grupo O-metil, para dar lugar a la N,O-desmetilvenlafaxina. Entre los metabolitos de la venlafaxina, O-desmetilvenlafaxina es el único con actividad farmacológica relevante desde el punto de vista clínico. Hasta el momento, no se ha estudiado la farmacocinética de cada uno de los isómeros por separado [48].

**Tabla 2.** Principales enzimas implicadas en la metabolización de los antidepresivos

ANTIDEPRESIVO		ISOENZIMA CYP	
ISRS	Fluoxetina	2D6 (N-desmetilación), <sup>a</sup> parcialmente responsable	
	Citalopram	2C19 (1 <sup>a</sup> desmetilación), 2D6 (2 <sup>a</sup> desmetilación). 3A4 ( <i>in vitro</i> , N-desmetilación)	
	Fluvoxamina	No establecido (faltan datos). Posible implicación de 2D6 y 1A4	
	Paroxetina	2D6 <sup>b</sup>	
	Sertralina	3A3/4 (desmetilación) <sup>c</sup>	
Venlafaxina		2D6 (O-desmetilación) y 3A4 (N-desmetilación)	
ADT	Amitriptilina	1A2 (N-desmetilación) y 2D6 (hidroxilación)	2C9/19
	Imipramina		3A4
	Clomipramina		2C19
<p>a: Otras enzimas metabolizan el 70% (posiblemente, 2C9, 2C19, 3A3/4); b: Otras enzimas responsables del 25% de su metabolización; posible implicación de 3A4; c: Faltan datos sobre otras enzimas que pudiesen estar involucradas</p>			



#### 1.7.4. Eliminación y vida media.

Todos ellos se eliminan fundamentalmente por vía renal, encontrándose en orina como máximo un 10% de la dosis absorbida como fármaco inalterado.

Los ADTs se excretan principalmente en forma de los metabolitos hidroxilados de sus nor-derivados, en forma libre o como conjugados glucurónidos. Menos del 20% se elimina a través de las heces [32].

En cuanto a los ISRSs, la fluoxetina se elimina en un 80% por vía renal, menos de un 30-35% en forma fluoxetina, norfluoxetina y sus glucurónidos, lo que sugiere la formación de otros metabolitos desconocidos hasta el momento [35]. Sertralina y nortsertralina son metabolizados posteriormente a cetonas y derivados hidroxilados, que son eliminados en forma libre o conjugados con ácido glucurónico en orina y heces en proporciones similares [45]. La paroxetina se elimina prácticamente en su totalidad en forma de sus metabolitos, un 64% por vía renal y un 36% en las heces [31,36]. La fluvoxamina se elimina principalmente por vía renal (94% de la dosis administrada), menos de un 4% como fármaco original [36].

La venlafaxina se elimina fundamentalmente a través de la orina, un 30% en forma de O-desmetilvenlafaxina como tal o como glucurónido. También se encuentra en la orina N,O-didesmetilvenlafaxina (9-16%) y, en menor proporción, N-desmetilvenlafaxina [32].

La **duración de la acción** de un fármaco se mide a través de los valores de vida media ( $t_{1/2}$ ), parámetro que representa el tiempo necesario para eliminar el 50% del fármaco de la circulación plasmática. Este parámetro farmacocinético determina tres aspectos clínicos a tener en cuenta: el cumplimiento del tratamiento, el tiempo necesario para alcanzar la respuesta terapéutica y el tiempo que tarda en eliminarse el fármaco del organismo tras el cese de su administración.

Una  $t_{1/2}$  mucho menor a 24 horas dificulta el cumplimiento del tratamiento, ya que requiere la administración de múltiples dosis diarias; además, valores muy cortos dan lugar a una mayor tendencia a la aparición de síntomas de

abstinencia. Por otro lado, valores significativamente superiores a las 24 horas alargan el tiempo necesario para alcanzar las concentraciones de equilibrio y, de esta manera, el tiempo necesario para obtener una respuesta terapéutica. Otro inconveniente de una  $t_{1/2}$  demasiado larga es que se requieren mayor tiempo de espera antes de realizar una sustitución en el tratamiento.

Los ADTs, presentan valores de  $t_{1/2}$  muy variables, con una media de aproximadamente 24 horas, algo superior en el caso de la clomipramina y su metabolito. Entre los ISRSs existe un amplio rango de valores de  $t_{1/2}$ , que varía desde valores inferiores a 24h (paroxetina, fluvoxamina) a los 2-4 días (fluoxetina). La venlafaxina presenta una  $t_{1/2}$  muy corta, lo que puede estar relacionado con la rapidez con la que aparecen los efectos secundarios.

**Tabla 3.** Valores promedio de  $t_{1/2}$  de los antidepresivos en estudio.

Antidepresivo	$t_{1/2}$ (horas)
Amitriptilina	9-36
Nortriptilina	15-90
Imipramina	8-16
Desipramina	17-28
Clomipramina	24-48
Norclomipramina	48-72
Fluoxetina	2-4 días
Norfluoxetina	7-15 días
Paroxetina	10-24
Sertralina	24
Fluvoxamina	12-24
Citalopram	36
Venlafaxina	2.7-3.8

## 1.8. Toxicidad

### 1.8.1. Efectos adversos

La introducción de las nuevas generaciones de antidepresivos no ha supuesto tanto una mejora en cuanto a la eficacia antidepresiva, sino que su principal ventaja es su mayor seguridad y mejor tolerancia debido a una mayor especificidad en su mecanismo de acción [53].

#### Antidepresivos tricíclicos

La mayoría de sus efectos secundarios, así como su toxicidad, se asocian con su acción poco selectiva sobre la inhibición del transporte monoaminérgico, y la alta afinidad sobre receptores colinérgico-muscarínicos, histaminérgicos H<sub>1</sub> y  $\alpha_1$ -adrenérgicos a nivel periférico [4,39,54]. Además, las aminas terciarias se transforman en metabolitos que son también potentes inhibidores de la recaptación de NA, con la consiguiente contribución a los efectos adversos [24].

Por su acción poco específica sobre estos receptores, los ADTs originan:

- *Efectos anticolinérgicos*, como sequedad de boca, sabor metálico, molestias epigástricas, estreñimiento, mareos, taquicardia, palpitaciones, visión borrosa y retención urinaria.
- *Efectos antihistamínicos*, siendo el más frecuente la sedación, aunque se suele generar tolerancia a este efecto, y la acomodación es relativamente fácil si la dosis se va incrementando gradualmente. Otro efecto que podría estar mediado por una acción antihistamínica es el aumento de peso.
- *Efectos antiadrenérgicos  $\alpha_1$* , siendo los más graves los cardiovasculares, entre los que se incluye anormalidades electrocardiográficas (cambios en la onda T, cambios en el complejo QRS, retrasos en la conducción intraventricular), arritmias, palpitaciones, taquicardia e hipotensión ortostática. Estos efectos, sobre todo los relacionados con defectos en la conducción cardiaca, se han correlacionado con concentraciones

plasmáticas superiores a las incluidas en el rango de niveles terapéuticos de referencia.

Otros efectos secundarios menos frecuentes son reacciones alérgicas, actividad de enzimas séricas alterada, anormalidades hematológicas y efectos en el sistema nervioso central como temblores, trastornos convulsivos, discinesia tardía.

### **Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina [55]**

Los ISRSs, debido a la mayor selectividad de su mecanismo de acción, presentan una considerable menor incidencia de efectos adversos mediados por el bloqueo de neuroreceptores específicos como los colinérgico-muscarínicos y  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Así, sus efectos adversos más frecuentes son los derivados de aumento excesivo de los niveles de 5-HT, mediados por su propio mecanismo de acción antidepresivo.

Sus efectos secundarios característicos provienen de la estimulación de receptores postsinápticos como 5-HT<sub>2A</sub>, originando disfunción sexual y efectos neurológicos, o de receptores 5-HT<sub>3</sub>, responsables de los efectos a nivel gastrointestinal (24).

Los síntomas que se observan con mayor frecuencia son:

- *Gastrointestinales*: vómitos y náuseas, trastornos diarreicos (más frecuentes con fluoxetina, citalopram y sertralina), estreñimiento (paroxetina y fluvoxamina) [4].
- *Disfunción sexual* [4]: disminución de la libido, eyaculación retardada, incapacidad para eyacular, anorgasmia u orgasmo retardado.
- *Neurológicos*: insomnio, nerviosismo, cefalea, somnolencia, temblor y ansiedad. Se han comunicado efectos extrapiramidales por lo que, a pesar de su baja incidencia, debe administrarse con precaución en pacientes con enfermedad de Parkinson y cuando se asocian a neurolépticos [13].
- *Endocrinos*: se ha descrito la aparición de anorexia con pérdida de peso asociada, así como aumento de peso. También se han asociado al

síndrome de secreción alterada de hormona antidiurética, que se manifiesta a través de una secreción alterada de agua con hiponatremia e hipoosmolaridad asociadas, que conducen a un estado de letargia, anorexia, náuseas, vómitos, calambres musculares, convulsiones y coma [56].

- *Cardiovasculares*: a pesar de ser poco frecuentes y no producir cardiotoxicidad severa, se ha descrito la aparición de palpitaciones, vasodilatación, sofocos, hipotensión ortostática, hipertensión, síncope, taquicardia y angina [53].

### **Venlafaxina [57,58]**

Al igual que los ISRSs, presenta baja afinidad por receptores muscarínicos-colinérgicos, histaminérgicos y  $\alpha$ -adrenérgicos, por lo que sus efectos secundarios derivan de su propio mecanismo de acción antidepresivo.

Los efectos adversos comunicados con más frecuencia son náuseas, mareos, pérdida de peso, somnolencia, insomnio, disfunción sexual, sudoración y sequedad de boca. En algunos pacientes se ha observado hipertensión sostenida, que parece ser dosis dependiente.

### **1.8.2. Interacciones**

- **Farmacodinámicas**

Se producen cuando hay un efecto aditivo en el sistema afectado debido a la coadministración de otra sustancia con efecto sobre el mismo sistema.

En el caso de los antidepresivos tricíclicos, pueden desencadenarse efectos anticolinérgicos. Los ISRSs, en combinación con otras sustancias que aumenten los niveles de 5-HT, pueden conducir al desarrollo de un síndrome serotoninérgico.

- **Farmacocinéticas**

Las interacciones farmacocinéticas más importantes son las que afectan al citocromo P450. Las isoenzimas 1A2, 2C9/19, 2D6 y 3A4 son las principales implicadas en el metabolismo de los antidepresivos y de muchos otros medicamentos. Según la información disponible, el 50% de las drogas que sufren oxidación en su metabolización, lo hacen por acción de 3A4, y el 30% por acción de 2D6 [59].

Estas interacciones son especialmente importantes en el caso de algunos ISRSs que, además de actuar como sustrato, producen la inhibición de distintas isoenzimas de P450, estando sujetos de esta forma a un mecanismo de autoinhibición de su propio metabolismo (fluoxetina y paroxetina) o el de otras sustancias coadministradas. Este hecho puede afectar a la respuesta terapéutica al ralentizar su eliminación y la del fármaco cuyo metabolismo está inhibido, e incrementar las concentraciones por encima de los niveles generalmente asociados con los niveles terapéuticos óptimos [24,60]. La repercusión clínica de estas interacciones dependerá fundamentalmente del margen terapéutico del fármaco cuyo metabolismo resulte afectado y de su toxicidad, así como de las dosis administradas y la frecuencia de asociación con fármacos con los que interaccionan (los ISRSs se administran frecuentemente a pacientes sometidos a tratamiento con otros fármacos: otras clases de antidepresivos, benzodiazepinas, antiepilépticos...). La inhibición producida es dosis dependiente y reversible, de forma que remite cuando el fármaco es eliminado.

En ocasiones, estas interacciones han sido utilizadas con fines terapéuticos para mejorar la respuesta o reducir efectos adversos, como en el caso de la administración conjunta de fluvoxamina y olanzapina, haloperidol, clomipramina o metadona [31].

Existen diferencias importantes en la capacidad de inhibición de los distintos ISRSs. A pesar de que se han llevado a cabo numerosas investigaciones en este campo, la información es todavía limitada. Sin embargo, puede obtenerse una serie de conclusiones con la información más

relevante [31]. De todos los ISRSs, paroxetina, fluoxetina y fluvoxamina son los que dan lugar a las principales interacciones desde el punto de vista clínico. De ellos, la paroxetina es la menos problemática, ya que a pesar de ser el inhibidor más potente de CYP2D6 (también su metabolito inactivo), apenas produce inhibición de otras isoenzimas. Así, la magnitud y duración de la inhibición producida por la paroxetina es más fácil de manejar clínicamente que en el caso de la fluvoxamina, cuya capacidad inhibitoria es menos selectiva, o de la fluoxetina, por a su elevada vida media y la de su metabolito activo norfluoxetina, tan potente como la droga original en la inhibición de CYP2D6, e incluso más en la inhibición de CYP3A4 [24].

**Tabla 4.** Isoenzimas del complejo P450 inhibidas por distintos antidepresivos y las posibles interacciones que pueden surgir en combinación con otros fármacos [31,59,60].

Isoenzima	Inhibidor	Posibles interacciones
<b>2D6</b>	paroxetina, fluoxetina <sup>a</sup> sertralina <sup>b</sup> , citalopram <sup>b,c</sup> , fluvoxamina <sup>b,c</sup>	neurolépticos, $\beta$ -bloqueantes, antiarrítmicos 1C, otros antidepresivos (ADTs amina terciaria, paroxetina, fluoxetina, venlafaxina, citalopram)
<b>1A2</b>	fluvoxamina, venlafaxina <sup>c</sup>	ADTs, warfarina, teofilina, fenacetina, haloperidol, clozapina, propranolol
<b>3A4</b>	fluvoxamina, norfluoxetina Sertralina <sup>b,c</sup> , paroxetina <sup>b,c</sup> fluoxetina <sup>b</sup> , venlafaxina <sup>b</sup>	BZD (triazoloBZD: alprazolam, midazolam, triazolam), carbameceptina, terfenadina, astemizol, ketoconazol, cimetidina, eritromicina, otros antidepresivos (ADTs, fluoxetina, sertralina, venlafaxina)
<b>2C19</b>	fluvoxamina fluoxetina <sup>b,c</sup> , sertralina <sup>b,c</sup>	diazepam, propranolol, warfarina, tolbutamida, fenitoína, otro antidepresivos (ADTs, citalopram)
<b>2C9</b>	fluoxetina <sup>d</sup>	Fenitoína, warfarina, tolbutamida

**a:** fluoxetina es inhibidor moderado, pero norfluoxetina es potente inhibidor; **b:** Inhibición débil, no importante repercusión clínica; **c:** *in vitro*, pero no confirmado *in vivo*; **d:** controversia.

### 1.8.3. Intoxicación aguda

#### Antidepresivos tricíclicos [61,62]

Presentan un estrecho margen terapéutico, y los índices de toxicidad fatal asociados a este grupo de antidepresivos son elevados, encontrándose entre los fármacos que aparecen con mayor frecuencia en casos de intoxicación asociada a muerte, especialmente en suicidios [63,64,65]. Es más probable que se produzcan efectos tóxicos a concentraciones plasmáticas superiores a 1µg/mL, aunque se ha observado cardiotoxicidad a concentraciones inferiores [66].

Las manifestaciones tóxicas más graves que sobrevienen a la intoxicación aguda por ADTs se producen a través de varios mecanismos:

- 1- Toxicidad directa sobre SNC por acción de los neurotransmisores cuya recaptación está inhibida.
- 2- Intensificación de sus efectos anticolinérgicos y antiadrenérgicos- $\alpha_1$ .
- 3- Cardiotoxicidad directa, secundaria al bloqueo de canales rápidos de sodio, que da lugar a alteraciones en la repolarización y en la conducción (efecto antiarrítmico tipo Quinidina).

En el cuadro clínico típico de la intoxicación aguda se producen los siguientes efectos:

- Efectos en el Sistema Nervioso:
  - Manifestaciones a nivel del SNA periférico que, por sí mismas, no producen morbilidad seria.
  - En SNC las complicaciones son mucho más graves, produciéndose alteración del estado mental (delirio, agitación, alucinaciones, varios grados de inconsciencia hasta el coma), mioclono y coreo-atetosis, ataques epilépticos (generalmente breves; su prolongación da lugar a acidosis e hipoxia, que pueden potenciar la cardiotoxicidad y producir hipertermia).



- Efectos cardiovasculares:
  - Hipotensión, que puede ser secundaria a una vasodilatación por bloqueo de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, depresión miocárdica directa tipo quinidina o depleción de las reservas noradrenérgicas presinápticas.
  - Alteraciones en el ECG y retrasos en la conducción: ensanchamiento del complejo QRS, prolongación del intervalo QTc y PR, e importante bloqueo atrioventricular.
  - La taquicardia sinusal debido a la actividad anticolinérgica y bloqueo de NA es la arritmia más común, y puede durar de horas a días. También puede producirse bradiarritmia (por bloqueo atrioventricular) y taquiarritmia (supraventricular y ventricular) [67]. La taquicardia ventricular polimórfica (torsade de pointes) puede ocurrir a dosis terapéuticas, pero es poco frecuente en sobredosis [68]. La arritmia secundaria al bloqueo de los canales rápidos de sodio es la consecuencia más peligrosa en las sobredosis, junto con las alteraciones en la conducción [68].
  
- Efectos respiratorios: en las intoxicaciones más severas, puede producirse depresión respiratoria e hipoxia como consecuencia de la depresión del SNC.
  
- Efectos anticolinérgicos: son frecuentes y no dan lugar a problemas clínicos serios. Producen sedación, miosis, sequedad de piel y mucosas, disminución o ausencia de motilidad intestinal y retención urinaria [69].

El nivel de consciencia es el signo de mayor utilidad como indicador de complicaciones serias [67,70]. La mayoría de las manifestaciones tóxicas no se correlacionan con los niveles plasmáticos, excepto las alteraciones en el electrocardiograma debidas a la modificación en la duración del intervalo QRS, siendo igual o superior a 100msec en pacientes con concentraciones plasmáticas de ADT superiores a 1 $\mu$ g/mL [71].

## **Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina [24]**

Los nuevos antidepresivos presentan un amplio margen terapéutico y son mucho más seguros que los antidepresivos clásicos en caso de sobredosis [65,66,72], dando lugar a un curso clínico más suave y un menor número de casos de intoxicación con muerte asociada [73]. Así, los índices de toxicidad fatal de los antidepresivos se han reducido de forma significativa con la introducción estos fármacos [74].

Generalmente, las sobredosis por este tipo de compuestos presentan una evolución favorable, y en los casos en los que se produjo la muerte, además de encontrarse concentraciones de ISRSs muy por encima del rango terapéutico (reflejando la intencionalidad suicida) [24,75,76], se detectó la presencia de otras sustancias, atribuyéndose la muerte a la intoxicación por acción de múltiples drogas, donde el ISRS actuó como factor contribuyente [49,50,52,53]. Es muy raro que se produzca la muerte por intoxicación por la acción exclusiva de un fármaco de este grupo.

La mayoría de las intoxicaciones por ISRSs son generalmente poco específicas, dando lugar a la aparición de náuseas, vómitos, fatiga, somnolencia, cefaleas, taquicardia sinusal y/o hipertensión arterial diastólica. Normalmente, estos síntomas son de evolución favorable en 24 horas [77].

A pesar de su relativa seguridad, pueden desencadenar intoxicaciones graves en combinación con otras sustancias. Los principales mecanismos responsables de su toxicidad y potencial efecto letal son las interacciones farmacocinéticas por inhibición del sistema enzimático P450, o las farmacodinámicas, que pueden desencadenar la aparición de un síndrome serotoninérgico. En las complicaciones más severas pueden aparecer además efectos cardiovasculares o sangrado.

- Síndrome serotoninérgico: se produce por una excesiva acumulación de los niveles de 5-HT. Puede desencadenarse en caso de sobredosis con un ISRS, por combinación con otras drogas con propiedades serotoninérgicas similares (otros ISRSs, ADTs, anfetaminas, cocaína,...),

así como la presencia de otras sustancias que inhiban su metabolismo (anfetaminas, IMAOs, L-triptófano,...), incluso a concentraciones terapéuticas. Se caracteriza por un estatus mental alterado, disfunciones autónomas e hiperactividad neuromuscular. La aparición de hipertermia  $>40^{\circ}\text{C}$  es indicativo del desarrollo de un proceso severo, potencialmente letal. Sternbach ha propuesto que para su diagnóstico deben estar presentes al menos tres de los siguientes síntomas: agitación, cambios en el estatus mental, diaforesis, mioclono, diarrea, fiebre, hiperreflexia, temblor o incoordinación. Este síndrome es el efecto adverso más peligroso en caso de sobredosis pura con un ISRS [78].

- Efectos cardiovasculares: la elevación de los niveles de 5-HT por inducción farmacológica puede ser un factor de riesgo importante en pacientes con enfermedad cardíaca preexistente como la aterosclerosis cardiovascular, debido a la compleja acción de la serotonina en el tono de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos, produciendo la contracción de ciertos vasos y la dilatación de otros.
- Inhibición del metabolismo de CYP 450, que puede dar lugar al aumento de los efectos tóxicos de las sustancias cuyo metabolismo depende de este complejo enzimático, a pesar de que los niveles se encuentren dentro de los márgenes terapéuticos, así como del propio antidepresivo en caso de sobredosis.

### **Venlafaxina**

Presenta también una amplia ventana terapéutica. A pesar de presentar una toxicidad significativamente superior al de los ISRSs [74,79], la mayoría de las intoxicaciones son de evolución favorable en el plazo de 24 horas [77]. En la mayoría de los casos con final fatal, la muerte se atribuyó a la combinación con otras sustancias.

Dado su mecanismo de acción, el perfil de la intoxicación por venlafaxina es un híbrido entre el producido por los ADTs y el de los ISRSs. Manifestaciones de toxicidad clínica incluyen ansiedad, nerviosismo e insomnio [80]. En caso de sobredosis, es común la aparición de la toxicidad serotoninérgica típica de los ISRSs, así como reacciones adversas propias de

los ADTs, como cambios menores en el complejo QRS y ataques epilépticos, pero apenas se produce sedación o efectos anticolinérgicos. El perfil de toxicidad en caso de sobredosis por venlafaxina es menos grave que el de los ADTs, a pesar de producir cambios similares en el ECG, ya que es menos probable el desarrollo de coma [73]. En caso de sobredosis, la muerte puede sobrevenir por la inducción de ataques epilépticos como consecuencia de la estimulación adrenérgica, disrritmias cardíacas, hipertensión o hipotensión.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Organización Mundial de la Salud (OMS). Fact sheet N°265, diciembre 2001. <http://www.who.int/mediacentre/factsheet/fs265/en/print.html>
- [2] A. García Delgado, Capítulo 9: Fármacos antidepresivos y antimaníacos, en: Manual de Farmacoterapia (L. Bravo Díaz, Elisa Marhuenda Requena). Ed. Elsevier España, S.A., Madrid, 2005.
- [3] Organización Mundial de la Salud (OMS). The World Health Report 2001. Mental Health: new understanding. New hope. <http://www.who.int/whr/2001/en/whr01-en>
- [4] R.J. Baldessarini, Capítulo 17: Farmacoterapia de la depresión y de los trastornos de ansiedad, en: Goodman and Gilman's. Las bases farmacológicas de la terapéutica (Laurence L. Bunton, John S. Lazo, Keith L. Parker). Ed. McGraw-Hill Interamericana, México, 2005, 11<sup>a</sup> edición.
- [5] L. Nordenberg. Dealing with depths of depression. U.S. Food and Drug Administration (US FDA). FDA Consumer Magazine, July-August 1998; vol. 32, N° 4. [http://www.fda.gov/fdac/features/1998/498\\_dep.html](http://www.fda.gov/fdac/features/1998/498_dep.html)
- [6] National Institute of Mental Health (NIMH). Real men. Real depression. "Depression: a treatable illness". NIH Publication No. 03-5299. [http://www.menanddepression.nimh.nih.gov/clientfiles/NIMH317.406\\_F\\_TSH\\_treatable.pdf](http://www.menanddepression.nimh.nih.gov/clientfiles/NIMH317.406_F_TSH_treatable.pdf)
- [7] C. Lewis. The lowdown on depression. U.S. Food and Drug Administration (US FDA). FDA Consumer Magazine. January-February 2005; vol. 37, N°1. [http://www.fda.gov/fdac/features/2003/103\\_dep.html](http://www.fda.gov/fdac/features/2003/103_dep.html)
- [8] National Institute of Mental Health (NIMH). NIH Publication N° SP 04-3561. <http://www.nimh.nih.gov/publicat/spdep3561>
- [9] A. Doris, K. Ebmeier. P Shajahan. Depressive illness. Lancet, 1999; 354: 1369-1375.

- [10] F. López-Muñoz, C. Álamo, E. Cuenca. La “Decada de Oro” de la psicofarmacología (1950-1960): trascendencia histórica de la introducción clínica de los psicofármacos clásicos. Congreso virtual de psiquiatría, 1 febrero-15 marzo 2000([citado: 25/05/06]; conferencia 34-CI-C: [41 pantallas]). Disponible en: <http://www.psiquiatria.com/congreso/mesas/mesa34/conferencias/34-ci-c.htm>
- [11] A.F. Schartzberg. Pharmacological principles of antidepressant efficacy. *Psychopharmacol.*, 2002; 17: 17-22
- [12] S.E. To, R.A. Zepf, A.G. Woods. The symptoms, neurobiology and current pharmacological treatment of depression. *J. Neurosci. Nurs.*, 2005; 37 (2): 102-107.
- [13] C. Govantes, J.L. Ayuso, Capítulo 18: Fármacos antidepresivos y antimaniacos, en: *Farmacología básica y clínica* (A. Velásquez, B. Lorenzo). Ed. Médica Panamericana, Madrid, 2004, 17ª edición.
- [14] M.J. Millan. The role of monoamines in the action of established and “novel” antidepressant agents: a critical review. *Eur. J. Pharmacol.*, 2004; 500: 371-384.
- [15] J.A. Lieberman, R. Golden, S. Stroup, J. McEvoy. Drugs of the psychopharmacologic revolution in clinical psychiatry. *Psychiatr. Serv.*, 2000; 51: 1254-1258.
- [16] A. Frazer. Pharmacology of antidepressants. *J. Clin. Pharmacol.*, 1997; 17 (2): 25-185.
- [17] Danish University Antidepressant Group. Citalopram: clinical effect in comparison with clomipramine. A controlled multicentre study. *Psychopharmacol.*, 1986; 90: 136-138.
- [18] DUAG. Paroxetine: a selective serotonin reuptake inhibitor showing better tolerance but weaker antidepressant effect than clomipramine in a controlled multicentre study. *J. Affect. Disord.*, 1990; 18: 289-299.

[19] I.M. Anderson. Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. *J. Affect. Disord.*, 2000; 58: 19-36.

[20] E. Wooltorton. Paroxetine (Paxil, seroxat): increased risk on suicide in pediatric patients. *CMAJ*, 2003; 169 (5): 446.

[21] Comunicado de GlaxoSmithKline, publicado en la página web de la U.S. Food and Drug Administration (US FDA). <http://www.fda.gov/medwatch/safety/2005/safety05.htm#Paxil2> (página visitada 16/10/06).

[22] Comunicado de la U.S. Food and Drug Administration (US FDA). <http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/2003/ANS01230.html> (página visitada el 16/10/06)

[23] H. Jick, J.A. Kaye, S.S Jick. Antidepressants and the risk of suicidal behaviors. *JAMA*, 2004; 292: 238-343.

[24] K.E. Goering, L. Raymon, G.D. Christian, B.K. Logan. Post-mortem forensic toxicology of selective serotonin reuptake inhibitors: a review of pharmacology and report of 168 cases. *Journal of Forensic Science*, 2000; 45(3): 633-648.

[25] K. Moore. Duloxetine: new approach for treating stress urinary incontinence. *Int. Gynaecol. Obstet.*, 2004; 86: S53-S62.

[26] T. Spencer, J. Biederman, T. Wilens, R. Steingard, D. Geist. Nortriptyline treatment of children with attention-deficit hyperactivity disorder and tic disorder or Tourette's syndrome. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*, 1993; 32: 205-210.

[27] R.H. Bradley, R.L. Barkin, J. Jerome, K. DeYoung, C.W. Dodge. Efficacy of venlafaxine for the long term treatment of chronic pain with associated major depression disorder. *Am. J. Ther.*, 2003; 10: 318-323.

- [28] A.J. Gruber, J.L. Hudson, H.G. Jr. Pope. The management of treatment-resistant depression in disorders on the interface of psychiatry and medicine. Fibromyalgia, chronic fatigue syndrome, migraine, irritable bowel syndrome, atypical facial pain, and premenstrual dysphoric disorder. *Psychiatr. Clin. North Am.*, 1996; 19: 351-369.
- [29] T.N. Vu. Current pharmacologic approaches to treating neuropathic pain. *Curr. Pain Headache Report*, 2004; 8: 15-18.
- [30] S.H. Preskorn. Clinical pharmacology of SSRIs. Chapter 2: Rational drug discovery and SSRIs. [www.preskorn.com](http://www.preskorn.com)
- [31] C. Hiemke, Härtter. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacology and Therapeutics*, 2000; 85: 11-28.
- [32] A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop (editores). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Ed. Pharmaceutical Press, London, 2004, 3ª edición.
- [33] S.H. Preskorn. Clinically relevant pharmacology of selective serotonin reuptake inhibitors. An overview with emphasis on pharmacokinetics and effects on oxidative drug metabolism. *Clin. Pharmacokinet.*, 1997; 32 (1): 1-21.
- [34] P.J. Goodnick. Pharmacokinetic optimization of therapy with newer antidepressants. *Clin. Pharmacokinet.*, 1994; 27(4): 307-330.
- [35] J. van Harten. Clinical pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Clin. Pharmacokinet.*, 1993; 24(3): 203-220.
- [36] M.J. Otero, L. Santos, D. Santos Buelga, A. Domínguez-Gil. Farmacocinética clínica de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina. *Farm. Hosp.*, 1996; 20(2): 73-85.
- [37] S.H. Preskorn. Clinical pharmacology of SSRIs. Chapter 6: What are the clinical relevant pharmacokinetic differences among SSRIs? [www.preskorn.com](http://www.preskorn.com)



- [38] J. Linderbaun, D.G. Rund, V.P. Butler, D. Tse-Eng, J.R. Saha. Inactivation of digoxin by the gut flora: reversal by antibiotic therapy. *N. Engl. J. Med.*, 1981; 305:789-794.
- [39] P.J. Orsulak. Capítulo: Clinical pharmacology of tricyclic antidepressants: a brief review, en: *Applied TDM. Volume II: Review and case studies* (pp. 229-238) (Thomas P. Moyer and Roger L. Boeckx). Ed. The American Association for Clinical Chemistry, Washington, 1982-1984
- [40] A.E. Balant-Gorgia, M. Gex-Fabry, L.P. Balant. Clinical pharmacokinetics of clomipramine. *Clin. Pharmacokinet.*, 1991; 20(6): 447-462.
- [41] M. Furlanut, P. Benetello, E. Spina. Pharmacokinetic optimization of tricyclic antidepressant therapy. *Clin. Pharmacokinet.*, 1993; 24 (4): 301-318.
- [42] F.R. Sallee, B.G. Pollock. Clinical pharmacokinetics of imipramine and desipramine. *Clin. Pharmacokinet.*, 1990; 18 (5): 346-364.
- [43] U. Breyer-Pfaff. The metabolic fate of amitriptyline, nortriptyline and amitriptylinoxide in man. *Drug Metabolism Reviews*, 2004; 36 (3,4):723-746.
- [44] L. Bertilsson, B. Alexanderson. Stereospecific hydroxylation of nortriptyline in man in relation to interindividual differences in its steady-state plasma level. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1972; 4: 201-205.
- [45] D.P. Dogan, V. Caillard. Sertralina: a new antidepressant. *J. Clin. Psychiatry*, 1988; 49 (8): 46-51.
- [46] C.J. Milne, K.L. Goa. Citalopram: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in depressive illness. *Drugs*, 1998; 41: 450-477.
- [47] S.H. Preskorn. Clinically relevant pharmacology of selective serotonin reuptake inhibitors. An overview with emphasis on pharmacokinetics and effect on oxidative drug metabolism. *Clin. Pharmacokinet.*, 1997; 32 (1): 1-21.

- [48] S. Caccia. Metabolism of the newer antidepressants. An overview of the pharmacological and pharmacokinetic implications. *Clin. Pharmacokinet.*, 1998; 34(7): 281-302.
- [48] J. Hyttel, K.P. Bogeso, J. Perregaard, C. Sanchez. The pharmacological effect of citalopram residues in the (S)-(+)-enantiomer. *J. Neural. Transm.*, 1992;88: 157-160.
- [50] B. Rochat, M. Amey, P. Baumann. Analysis of enantiomers of citalopram and its demethylated metabolites in plasma of depressive patients using chiral reverse-phase liquid chromatography. *Therap. Drug Monit.*, 1995; 17: 273-279.
- [51] H. Overmars, P.M. Scherpenisse, L.C. Post. Fluvoxamina maleate: metabolism in man. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, 1983; 8: 269-280.
- [52] Eresshefsky, BCPP, FCCP, D Dugan. Review of the pharmacokinetics, pharmacogenetics and drug interaction potential of antidepressants: focus on venlafaxine. *Depress. Anxiety*, 2000; 12 (1): 30-44.
- [53] P. Pacher, Z. Ungvari, P.P. Nanasi, S. Furst, V. Kecskemeti. Speculations on difference between tricyclic and selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants on their cardiac effect. Is there any? *Curr. Med. Chem*, 1999; 6: 469-480.
- [54] A. Martínez Larrea. Nuevos antidepresivos en el tratamiento de los trastornos afectivos. *Boletín de Información Farmacoterapéutica de Navarra*, 2004; 12(1): 1-10.
- [55] Efectos adversos de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina. *Información farmacoterapéutica de la comarca*, 2000; 8: 5.
- [56] A. Fisher, M. Davis, J. Croft-Baker, P. Purcell, A. McLean. Citalopram-induced severe hyponatraemia with coma and seizure. *Adverse Drug Reactions, Toxicol. Rev.*, 2002; 21: 179-187.
- [57] J.M. Kent. SNaRIs, NaSSAs, and NaRIs. New agents for the treatment of depression. *Lancet*, 2000; 355: 911-918.

- [58] J. Sanz. Vademecum Internacional. Ed. MEDICOM, S.A., Madrid, 2004, 45ª edición.
- [59] S.H. Preskorn. Clinically relevant pharmacology of selective serotonin reuptake inhibitors. An overview with emphasis on pharmacokinetics and effects on oxidative drug metabolism. Clin. Pharmacokinet., 1997; 32 (1): 1-21.
- [60] L.J. Cohen, C.L. De Vane. Clinical implications of antidepressant pharmacokinetics and pharmacogenetics. Ann. Pharmacother., 1996; 30: 1471-1480.
- [61] J. Gualtieri. Tricyclic antidepressant poisoning.  
<http://www.courses.ahc.umn.edu/pharmacy/6124/handouts/TCAPoisoning.pdf>
- [62] F.A. Maffei, H. Connolly. Toxicity, tricyclic antidepressants.  
<http://www.emedicine.com/ped/topic2714.htm#target1>
- [63] A. Öhberg, E. Vuori, T. Klaukka, J. Lönnqvist. Antidepressants and suicide mortality. J. Affective Disorder, 1998; 50: 225-233.
- [64] A. Jönsson, P. Holmgren, J. Ahlner. Fatal intoxications in a Swedish forensic autopsy material during 1992-2002. Forensic Sci. Int., 2004; 143: 53-59.
- [65] S. Cheeta, F. Schifano, A. Oyefeso, L. Webb, A.H. Ghodse. Antidepressant related deaths and antidepressant prescriptions in England and Wales, 1998-2000. Br. J. Psychiatry, 2004; 184: 41-47.
- [66] L. Armstrong. Antidepressant update. Topics in Drug Therapy, 1997; 35 (6).  
<http://www.dr-bob.org/tips/antidepressants.html#Adverse%20Effects>
- [67] H.K. Thanacoody, S.H. Thomas. Tricyclic antidepressant poisoning: cardiovascular toxicity. Toxicol Rev., 2005; 24 (3): 205-214.
- [68] K.R. Olson (editor). Sección II: Specific Poisons and Drugs (pp 88-93), en: Poisoning & Drug Overdose. Ed. McGraw-Hill Professional, New York, 2004, 4ª edición.

- [69] G.W. Kerr, A.C. McGuffie, S. Wilkie. Tricyclic antidepressant overdose: a review. *Emerg. Med.*, 2001; 18: 236-241.
- [70] D.N. Bateman. Tricyclic antidepressant poisoning: central nervous system effects and management. *Toxicol. Rev.*, 2005; 24 (3): 181-186.
- [71] D.G. Spiker, A.N. Weiss, S.S. Chang, J.F. Jr Ruwich, J.T. Biggs. Tricyclic antidepressant overdose: clinical presentation and plasma levels. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1975; 18 (5 Pt 1): 539-546.
- [72] D. Reith, J. Fountain, M. Tilyard, R. McDowell. Antidepressant poisoning deaths in New Zealand for 2001. *N. Z. Med. J.*, 2003; 116 (1184): U646.
- [73] I.M. Whyte, A.H. Dawson, N.A. Buckley. Relative toxicity of venlafaxina and selective serotonin reuptake inhibitors in overdose compared to tricyclic antidepressants. *Q. J. Med.*, 2003; 96: 369-374.
- [74] N.A. Buckley, P.R. McManus. Fatal toxicity of serotonergic and other antidepressant drugs: analysis of United Kingdom mortality data. *Br. Med. J.*, 2002; 325: 1332-1333.
- [75] R. Compton, H.A. Spiller, G.M. Bosse. Fatal fluoxetine ingestion with post-mortem blood concentrations. *Clin. Toxicol.*, 2005; 43: 277-279.
- [76] L.I. Velez, G. Shepherd, B.A. Roth, F.L. Benitez. Serotonin syndrome with elevated paroxetine concentrations. *Ann. Pharmacother.*, 2004; 38 (2): 269-272.
- [77] B. Mégarbane, A. Delahalle. Syndrome sérotoninergique et intoxication par les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (ISRS) et les antidépresseurs inhibiteurs de la monoamine oxydase (MAO). *Encyclopedy Orphanet*, Mars 2003. <http://www.orpha.net/data/patho/FR/fr-ISRS.pdf>
- [78] A. Gaudins, R.P. Dowsett, C. Liddle. The toxicity of antidepressant poisoning: is it changing? A comparative study of cyclic and newer serotonin-specific antidepressants. *Emerg. Med. (Fremantle)*, 2002; 14 (4): 440-446.

[79] A. Koski, E. Vuori, I. Ojanperä. Newer antidepressants: evaluation of fatal toxicity index and interaction with alcohol base on Finnish postmortem data. *Int. J. Legal Med.*, 2005; 119: 344-348.

[80] C. Long, J. Crifasi, D. Maginn, M. Graham, S. Teas. Comparison of analytical methods in the determination of two venlafaxina fatalities. *J. Anal. Toxicol.*, 1997; 21: 166-169.



## **II. MONITORIZACIÓN TERAPÉUTICA DE LOS FÁRMACOS ANTIDEPRESIVOS**





## 2.1. MONITORIZACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE FÁRMACOS

Tradicionalmente, el ajuste de la dosis se realiza de forma individual en función de las características de cada paciente y la respuesta obtenida. Esta es la práctica más sencilla cuando la respuesta puede medirse inmediatamente. Sin embargo, es mucho más complicado cuando la aparición del efecto debe pasar un periodo de latencia, o cuando los efectos adversos no son detectados hasta que son severos o irreversibles.

La dosis de fármaco administrada está relacionada con la respuesta clínica de forma indirecta, a través de las concentraciones plasmáticas a las que da lugar. Sin embargo, los niveles plasmáticos alcanzados tras la administración de una misma dosis van a depender de la biodisponibilidad y del aclaramiento del fármaco, parámetros afectados por varios factores (edad, sexo, polimorfismo genético, hábitos, forma de administración, estado fisiológico del paciente, interacciones farmacocinéticas), por lo que su predicción a partir de las dosis puede llevar a conclusiones erróneas [1].

El principio básico de la monitorización terapéutica de los niveles plasmáticos de un fármaco (TDM, del inglés *Therapeutic Drug Monitoring*) es que tanto la respuesta clínica que origina como los efectos adversos, dependen de su concentración en el lugar de acción que, a su vez, está directamente relacionada con la concentración plasmática.

El objetivo fundamental de la TDM, más que dictar la dosis adecuada, es ayudar en su ajuste para la optimización de la respuesta terapéutica, y debe ser utilizada en conjunto con la evaluación clínica del paciente [2].

A pesar de la superioridad teórica de la concentración plasmática en la predicción de la respuesta, actualmente la dosis sigue considerándose como la variable de interés tanto por los médicos como por la industria farmacéutica. La razón fundamental es la escasez de datos en cuanto a la relación entre concentración plasmática y respuesta terapéutica, cuya investigación requiere una importante inversión de tiempo y de dinero. Por otro lado, existe una infravaloración de la variabilidad en la respuesta en distintos pacientes a una

misma dosis. Otro argumento en contra de la TDM es la relación eficacia/coste negativa. Sin embargo, esta afirmación se hace teniendo en cuenta sólo el coste analítico, y no el ahorro que podría derivarse de un ajuste racional de la dosis basado en la TDM en cuanto a la reducción del gasto farmacéutico en casos de prescripción de dosis superiores a las necesarias, así como el gasto en personal y recursos debido a la prolongación del tiempo de hospitalización o al incremento del número de visitas médicas, al prescribir dosis que den lugar a concentraciones plasmáticas excesivas o ineficaces [1]

Hoy en día está reconocida la utilidad de la TDM de fármacos que presentan una ventana terapéutica estrecha, con riesgo de toxicidad seria fuera de este margen, como es el caso del litio, la digoxina o los anticonvulsivantes. Este reconocimiento se basa tanto en la obtención de una mayor seguridad en el tratamiento, como en la mejora de la relación eficacia/coste [1,3].

Las principales características farmacológicas que debe presentar un fármaco para considerarse candidato ideal para la TDM son [1]:

- Importante variabilidad interindividual en el aclaramiento plasmático del fármaco, lo que dará lugar a diferentes concentraciones plasmáticas tras la administración de una misma dosis en distintos individuos.
- Estrecha ventana terapéutica, con riesgo de toxicidad severa fuera de este margen.
- Relación concentración/respuesta bien definida.
- Múltiples mecanismos de acción. La potencia de un fármaco sobre los distintos lugares de acción es, generalmente, concentración dependiente, de forma que los efectos predominantes variarán en función de los niveles de fármaco.

## 2.2. VARIABILIDAD EN EL ACLARAMIENTO PLASMÁTICO DE LOS ANTIDEPRESIVOS [4,5,6,7,8]

Es conocida la gran variabilidad interindividual que presentan los antidepresivos en su eliminación. La vida media ( $t_{1/2}$ ), además de estar condicionada por los efectos de la edad, la presencia de enfermedad hepática o renal, está sujeta a una importante variabilidad interindividual debido a la existencia de diferencias genéticas en la metabolización de los antidepresivos. De esta forma, la presencia de estas situaciones especiales va a afectar tanto a las concentraciones plasmáticas alcanzadas con una misma dosis y, por tanto, a la respuesta terapéutica obtenida, así como al tiempo necesario para que se produzca la eliminación del fármaco.

- *Influencia de edad y sexo*

Excepto fluvoxamina y venlafaxina, todos los ISRSs y ADTs experimentan un aumento en la  $t_{1/2}$  en pacientes geriátricos, por lo que la dosis debe reducirse en estos casos. Las concentraciones plasmáticas de fluvoxamina también están afectadas por el sexo, encontrándose niveles un 40-50% inferiores en hombres. Los niveles de sertralina están influenciados por la combinación de ambos factores, con concentraciones superiores en mujeres mayores de 65 años. Sin embargo, estas diferencias no justifican la recomendación del uso de dosis inferiores en mujeres ancianas. La influencia de la edad en la eliminación es de especial importancia en los pacientes geriátricos, ya que éstos suelen estar polimedicados, aumentando el riesgo de interacciones farmacocinéticas.

- *Insuficiencia hepática*

Todos los antidepresivos se metabolizan extensamente en el hígado, por lo que es esperable que la eliminación esté ralentizada en pacientes con cirrosis y otras enfermedades hepáticas.

- *Insuficiencia renal*

La eliminación de venlafaxina, citalopram y desipramina se prolonga en pacientes con enfermedad renal. En cuanto a la paroxetina, su eliminación no parece modificarse en situaciones de afectación leve o moderada, pero sí en caso de enfermedad severa. Para el resto de los compuestos no se han encontrado diferencias entre pacientes con fallo renal y voluntarios sanos. Aún así, los fabricantes recomiendan comenzar el tratamiento con las dosis mínimas por razones de seguridad.

**Tabla 5.** Valores promedio de  $t_{1/2}$  e influencia de determinadas condiciones fisiológicas

Antidepresivo	$t_{1/2}$ (horas)	Edad	Insuficiencia hepática	Insuficiencia renal
Amitriptilina	9-36	$\uparrow t_{1/2}$		-
Nortriptilina	15-90	$\uparrow t_{1/2}$		-
Imipramina	8-16	$\uparrow t_{1/2}$	$\uparrow t_{1/2}$	-
Desipramina	17-28	$\uparrow t_{1/2}$	$\uparrow t_{1/2}$	$\uparrow t_{1/2}$
Clomipramina	24-48	$\uparrow t_{1/2}$	?	-
Norclomipramina	48-72	$\uparrow t_{1/2}$		-
Fluoxetina	2-4 días	<sup>c</sup> $\uparrow t_{1/2}$	$\uparrow t_{1/2}$	-
Norfluoxetina	7-15 días	<sup>c</sup> $\uparrow t_{1/2}$	$\uparrow t_{1/2}$	-
Paroxetina	10-24 <sup>a</sup>	$\uparrow \uparrow t_{1/2}$	-	$\uparrow t_{1/2}$ <sup>b</sup>
Sertralina	24	$\uparrow t_{1/2}$	$\uparrow t_{1/2}$	-
Fluvoxamina	12-24	-	$\uparrow t_{1/2}$	-
Citalopram	36	$\uparrow \uparrow t_{1/2}$	$\uparrow t_{1/2}$	$\uparrow t_{1/2}$
Venlafaxina	2.7-3.8	-	$\uparrow t_{1/2}$	$\uparrow t_{1/2}$

**a:** Dependiente de sus niveles plasmáticos, ya que inhibe CYP2D6, responsable de su biotransformación; **b:** Influencia en caso de afectación severa; **c:** Aunque no suficientemente estudiado.

- *Polimorfismo genético*

El sistema enzimático citocromo P450 es responsable del metabolismo de la mayoría de tratamientos farmacológicos disponibles en la actualidad y es, por ello, uno de los puntos principales en la investigación farmacogenética. La

mayoría de las enzimas de P450 tienen un papel limitado en la metabolización de sustancias exógenas, actuando principalmente en la formación y metabolización de sustancias endógenas como esteroides, prostaglandinas o colesterol. Así, de las más de 30 isoenzimas que han sido identificadas, CYP1A2, CYP2C9/19, CYP2D6 y CYP3A4 son las que juegan un papel fundamental en el metabolismo de los antidepresivos y de otras drogas ampliamente utilizadas.

Se han identificado múltiples alelos para algunos de los genes que codifican las isoenzimas del citocromo P450. Este polimorfismo genético se manifiesta fenotípicamente a través de diferencias subpoblacionales en la farmacocinética de drogas eliminadas por acción de estas isoenzimas, dando lugar a la existencia de metabolizadores rápidos (autonómico dominante), metabolizadores lentos (autonómico recesivo) e, incluso, metabolizadores ultrarrápidos. Su repercusión clínica viene dada por la presencia de concentraciones plasmáticas superiores y un aumento del tiempo de vida media en metabolizadores lentos, lo que puede dar lugar a concentraciones tóxicas o interacciones farmacocinéticas en presencia de otros fármacos [11]. En metabolizadores rápidos, las concentraciones plasmáticas alcanzadas pueden no ser suficientes para producir el efecto terapéutico.

La repercusión clínica del polimorfismo ha sido documentada para los genes que codifican CYP2D6 y CYP2C9/19 [8,9]. Concretamente, se sabe que un 5-8% de blancos, 8.5% de Afroamericanos y 2-10% de asiáticos son metabolizadores lentos por déficit de CYP2D6; y con respecto a CYP2C19, un 2-5% de blancos y un 18-25% de Afroamericanos y asiáticos son metabolizadores lentos [10]. También se ha demostrado la existencia de polimorfismo en los genes que codifican para CYP1A2 y CYP3A4, pero su importancia clínica ha sido menos estudiada.

Los antidepresivos son metabolizados por estas isoenzimas del citocromo P450. La existencia de este polimorfismo genético es, en parte, responsable de la gran variabilidad interindividual en los niveles plasmáticos de estos fármacos tras la administración de la misma dosis. Por ello, la determinación del fenotipo de grupos étnicos específicos puede suministrar

información útil en la valoración de las concentraciones plasmáticas que se obtendrán tras la administración de una dosis determinada, así como en la incidencia de los efectos adversos en diferentes poblaciones.

## **2.3. NIVELES PLASMÁTICOS DE LOS ANTIDEPRESIVOS**

### **2.3.1. Relación dosis/niveles plasmáticos**

Una característica común a la mayoría de los antidepresivos es la baja correlación entre la dosis administrada y en las concentraciones plasmáticas alcanzadas en el estado de equilibrio ( $C^{ss}$ ). Esto puede explicarse principalmente a través de dos hechos: el polimorfismo genético en las enzimas responsables de su metabolización y la presencia de una farmacocinética no lineal en algunos de ellos.

Por un lado, como se comentó en el apartado anterior, el polimorfismo genético permite, en parte, explicar la gran variabilidad interindividual en  $C^{ss}$  en distintos subgrupos poblacionales tras la administración de la misma dosis [8,11,12,13,14].

Por otro lado, a pesar de que la mayoría de los antidepresivos presentan un comportamiento lineal a las dosis utilizadas habitualmente, algunos de ellos presentan una cinética no lineal, lo que conduce a un aumento desproporcionado en los niveles plasmáticos al incrementar la dosis, así como a la prolongación de  $t_{1/2}$  comparado con el calculado tras la administración de una dosis única. Este hecho tiene importantes implicaciones en cuanto a la posible aparición de toxicidad o la falta de eficacia al administrar una dosis habitual. Además, interfiere en la capacidad del clínico para predecir el efecto de un ajuste en la dosis [4,12,15].

La mayoría de ADTs presentan farmacocinética lineal a las dosis habituales [4], asociándose de forma general la gran variabilidad interindividual en sus niveles plasmáticos con su extenso metabolismo de primer paso, unido al polimorfismo genético en las enzimas que participan en su metabolización.

De los 5 ISRSs comercializados, fluoxetina, paroxetina y, de forma menos pronunciada, fluvoxamina presentan cinética no lineal [7,12]. En el caso de la *fluoxetina*, se ha observado además un incremento de la biodisponibilidad al aumentar la dosis, lo que parece indicar la existencia de un mecanismo de saturación en el metabolismo de primer paso [16]. La saturación de CYP2D6 parece, al menos parcialmente, responsable de su cinética no lineal, así como el hecho de que es posible que múltiples enzimas de P450 actúen en su metabolización [17]. En el caso de la *paroxetina* también se observa un incremento de la biodisponibilidad con el aumento de la dosis, explicado por un mecanismo de autoinhibición, ya que paroxetina es un potente inhibidor de CYP2D6; sin embargo, se cree que su cinética no lineal se explica a través de un mecanismo de saturación de Michaelis-Menten, ya que presenta dos vías metabólicas paralelas: una de alta afinidad/baja capacidad, es decir, saturable o no lineal, y otro de baja afinidad/alta capacidad, es decir, lineal o no saturable. Aunque esto sólo se cumple en metabolizadores rápidos, ya que los metabolizadores lentos, al carecer o presentar déficit de CYP2D6, metabolizan la paroxetina por el mecanismo de baja afinidad lineal. Las concentraciones de *fluvoxamina* son ligeramente superiores a las esperadas tras la administración de dosis crónicas, aunque se considera que presenta una farmacocinética lineal a dosis terapéuticas (25-100mg) [37].

Venlafaxina presenta farmacocinética lineal a las dosis empleadas habitualmente (75-450mg/día) [18].

### 2.3.2. Relación niveles plasmáticos ( $C^{ss}$ )/eficacia clínica

Se han llevado a cabo numerosos estudios con la intención de correlacionar las concentraciones plasmáticas de los antidepresivos con la respuesta clínica [19,20,21,22,23,24,25].

En el caso de los ADTs, sigue existiendo cierta controversia en las concentraciones que dan lugar al efecto terapéutico [26,27], dificultado por la falta de relación dosis/concentración, así como la existencia de metabolitos también activos que, incluso, pueden presentar un perfil farmacológico distinto al del compuesto original, como es el caso de la clomipramina. A pesar de ello,

es posible establecer un rango de concentraciones críticas, ya que concentraciones demasiado bajas se asocian con la ausencia de respuesta, y concentraciones muy altas, con un aumento en la incidencia de efectos secundarios e, incluso para algunos de ellos, con un descenso en la respuesta. También se ha observado que para aquellos compuestos para los que se proponen rangos de referencia teniendo en cuenta la suma del compuesto original y su metabolito principal hay mucha mejor correlación que para el propuesto para cada uno de los compuestos individualmente [28].

En cuanto a los más recientes ISRSs y venlafaxina, la relación entre concentraciones plasmáticas y respuesta clínica es más incierta. A las dificultades citadas anteriormente para establecer esta correlación, se suma su mayor novedad y la presencia de la mezcla racémica en las formulaciones comercializadas de fluoxetina, citalopram, venlafaxina, al presentar los dos enantiómeros diferencias en cuanto a su potencia farmacológica y su farmacocinética. Sin embargo, este grupo de fármacos presentan una ventana terapéutica mucho más amplia y menor toxicidad que los ADTs [29]. Un hecho demostrado en el caso de los ISRSs es que a las dosis efectivas mínimas se produce un 70-80% de inhibición de la recaptación de serotonina, y las dosis más altas sólo se asocian con un incremento adicional de un 8% en la inhibición de la recaptación, dando lugar a una mayor incidencia en la aparición de los efectos secundarios sin obtener una mejora apreciable en la eficacia antidepresiva. Así, debe emplearse esta dosis mínima, ya que se mejora la tolerabilidad y se minimizan problemas derivados de la interacción con enzimas de P450.

A pesar de las limitaciones expuestas anteriormente, se han publicado listas en las que se proponen rangos terapéuticos para distintos compuestos, con la intención de ser usados como guía de referencia. Una de las listas más extensa es la propuesta por la Asociación Internacional de Toxicólogos Forenses (TIAFT) y la publicada por C.L. Winek et al [30,31], donde se incluye rangos terapéuticos para todos los antidepresivos comercializados.



**Tabla 6.** Rangos de concentraciones terapéuticas recogidos en el listado de la TIAFT

ANTIDEPRESIVO	CONCENTRACIONES TERAPÉUTICAS (ng/mL)
Amitriptilina+nortriptilina	100-200
Imipramina+desipramina	150-300
Clomipramina+norclomipramina	150-550
Fluoxetina+norfluoxetina	150-500
Paroxetina	10-75
Citalopram	20-200
Fluvoxamina	50-250
Sertralina	20-250
Venlafaxina+ O-desmetilvenlafaxina	250-750

## 2.4. UTILIDAD DE LA TDM DE LOS ANTIDEPRESIVOS

Una vez descritos los principales parámetros para evaluar la posible indicación de TDM en el caso de los fármacos antidepresivos, debe hacerse una clara distinción entre los clásicos ADTs y la nueva generación de agentes antidepresivos. Esta diferenciación se debe a que la utilización sistemática de TDM sólo está justificada desde el punto de vista clínico con fármacos que dan lugar a efectos tóxicos o indeseables a concentraciones plasmáticas ligeramente superiores que las necesarias para producir el efecto terapéutico.

La TDM de ADTs es una práctica ampliamente aceptada [1,3,32,33,34,35,36], ya que presentan varias características farmacológicas que apoyan su beneficio, tanto desde el punto de vista clínico como económico:

- Son fármacos de *estrecho margen de terapéutico*, con riesgo de toxicidad cardíaca y en el SNC a concentraciones 5 veces mayores que la

terapéutica. Aunque los resultados de los estudios para valorar la relación  $C^{ss}$ /eficacia con las aminas terciarias son menos robustos que los obtenidos con sus metabolitos, es posible establecer una ventana terapéutica teniendo en cuenta los niveles plasmáticos eficaces mínimos y aquellos que dan lugar a la aparición de toxicidad.

- Es conocida la gran *variabilidad interindividual* en los niveles plasmáticos alcanzados tras la administración de la misma dosis debido, fundamentalmente, al polimorfismo genético enzimático.
- Presentan una *farmacodinamia compleja*, con múltiples actividades biológicas, algunas de las cuales son responsables de sus efectos adversos. En este sentido, teniendo en cuenta que la afinidad del fármaco por los distintos lugares de acción es concentración dependiente, la TDM podría evitar la aparición de ciertas acciones responsables de sus efectos secundarios o su toxicidad.
- *Comienzo de la acción retardado*. El efecto clínico tarda 2-4 semanas en manifestarse, por lo que el ajuste de la dosis basado exclusivamente en la respuesta clínica es más lento que el basado en TDM. Esto conduce a un retraso en la eficacia del tratamiento, aumentando la probabilidad de visitas hospitalarias y/o prolongación del tiempo de permanencia en el hospital, con importantes consecuencias económicas. Además, con frecuencia, los antidepresivos dan lugar a efectos adversos que pueden confundirse con un empeoramiento de la enfermedad, y la tendencia del médico en estos casos es aumentar la dosis de fármaco, incrementando la toxicidad.

En cuanto a las nuevas generaciones de antidepresivos, a pesar de presentar una serie de características compatibles con el uso de la TDM (importante variabilidad interindividual en el aclaramiento plasmático, retraso en el comienzo de la acción, toxicidad temprana que puede confundirse con empeoramiento de la enfermedad), el fracaso en la identificación de una clara relación concentración/eficacia, el amplio margen terapéutico y su relativa seguridad hacen que no haya razones de peso que justifiquen el uso de la TDM de forma rutinaria. Sin embargo, muchos autores defienden su utilidad en situaciones concretas [1,3,33,36]:

- Cuando se sospecha *incumplimiento* de la prescripción en aquellos pacientes que no responden al tratamiento. Este hecho es bastante frecuente en la práctica psiquiátrica debido, principalmente, a la intolerancia a los efectos adversos, así como a la larga duración de los tratamientos. La TDM puede ayudar a detectar niveles plasmáticos muy por debajo de los de “referencia”.
- En *poblaciones especiales* en las que los parámetros farmacocinéticos se ven afectados, como pacientes geriátricos, metabolizadores lentos o ultrarrápidos, pacientes con fallo hepático o renal, o pacientes con enfermedad cardíaca preexistente.
- En pacientes *polimedicados*, situación frecuente en ancianos, a fin de evitar la aparición de interacciones farmacocinéticas.
- Cuando se realiza un *cambio en el tratamiento*, para asegurar la completa eliminación del fármaco sustituido antes la administración del nuevo tratamiento. Esto es especialmente importante en el caso de la fluoxetina debido a su larga  $t_{1/2}$  y la de su metabolito, y su alta capacidad para dar lugar a interacciones farmacocinéticas.

## 2.4. REQUISITOS ANALÍTICOS

Generalmente, la muestra de elección en la TDM es el plasma o suero. La principal desventaja de este espécimen es que su recolección requiere la utilización de un procedimiento invasivo (venopunción). La saliva puede emplearse como muestra alternativa siempre y cuando se demuestre que la relación entre las concentraciones en saliva y plasma es constante, y no está afectada por el pH o el flujo salivar. En estos casos, la saliva se presenta como una matriz efectiva no invasiva en la detección de la concentración de fármaco activo en plasma, particularmente útil en niños, ancianos o pacientes con fobia a las agujas.

La técnica analítica utilizada debe cumplir una serie de requisitos básicos, como la especificidad por el compuesto/s a medir, la capacidad para realizar una cuantificación precisa, y suficientemente sensible para poder llevar

a cabo la determinación a partir de un volumen relativamente pequeño de muestra. Los métodos cromatográficos tienen la ventaja de poder adaptarse fácilmente al análisis de un amplio grupo de compuestos, y el desarrollo de métodos para la determinación de nuevos compuestos es relativamente rápido en comparación con el tiempo necesario para el desarrollo de una técnica de inmunoensayo. Además, los sistemas cromatográficos pueden acoplarse a técnicas de detección que permiten obtener un alto grado de especificidad y sensibilidad, como la detección ultravioleta o la espectrometría de masas.

La separación de los enantiómeros en el caso de determinados compuestos quirales puede suministrar información útil en la interpretación de los resultados, ya que para algunos compuestos existen diferencias importantes en la potencia de acción y biotransformación de los enantiómeros. Entre los antidepresivos, la fluoxetina, el citalopram y venlafaxina se comercializan en su forma racémica, y se han desarrollado métodos analíticos que permiten la identificación de cada uno de los isómeros.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] M.J. Burke, S.H. Preskorn. Therapeutic drug monitoring of antidepressants. Cost implications and relevance to clinical practice. *Clin. Pharmacokinet.*, 1999; 37 (2): 147-165.
- [2] F. Bengtsson. Therapeutic drug monitoring of psychotropic drugs. TDM “nouveau”. *Ther. Drug Monit.*, 2004; 26 (2): 145-151.
- [3] J. Lundmark, F. Bengtsson, C. Nordin, M. Reis, J Wålinder. Therapeutic drug monitoring of selective serotonin reuptake inhibitors influences clinical dosing strategies and reduces drug costs in depressed elderly patients. *Acta Psychiatrica Scand*, 2000; 101: 354-359.
- [4] P.J. Goodnick. Pharmacokinetic optimization of therapy with newer antidepressants. *Clin. Pharmacokinet.*, 1994; 27(4):307-330.
- [5] S.H. Preskorn. Clinically relevant pharmacology of selective serotonin reuptake inhibitors. An overview with emphasis on pharmacokinetics and effects on oxidative drug metabolism. *Clin. Pharmacokinet.*, 1997; 32 (1):1-21.
- [6] M. Furlanut, P. Benetello, E. Spina. Pharmacokinetic optimization of tricyclic antidepressant therapy. *Clin. Pharmacokinet*, 1993; 24 (4):301-318.
- [7] S.H. Preskorn. Clinical pharmacology of SSRIs. Chapter 6: What are the clinically relevant pharmacokinetic differences among SSRIs? [www.preskorn.com](http://www.preskorn.com)
- [8] Eresshefsky, BCPP, FCCP, D. Dugan. Review of the pharmacokinetics, pharmacogenetics and drug interaction potential of antidepressants: focus on venlafaxine. *Depression and Anxiety*, 2000; 12 (1): 30-44.
- [9] C.L. De Vane. Pharmacogenetics and drug metabolism of the newer antidepressant agents. *J. Clin. Psychiatry*, 1994; 55: 38-45.

- [10] L.J. Cohen, C.L. De Vane. Clinical implications of antidepressant pharmacokinetics and pharmacogenetics. *The Annals of Pharmacotherapy*, 1996; 30: 1471-1480.
- [11] A.E. Balant-Gorgia, M. Gex-Fabry, L.P. Balant. Clinical pharmacokinetics of clomipramine. *Clin. Pharmacokinet.*, 1991; 20(6):447-462.
- [12] C. Hiemke, Härtter. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacology and Therapeutics*, 2000; 85:11-28.
- [13] F.R. Sallee, B.G. Pollock. Clinical pharmacokinetics of imipramine and desipramine. *Clin. Pharmacokinet.*, 1990; 18 (5): 346-364.
- [14] S.H. Preskorn. Clinical Pharmacology of SSRI's. Chapter 5: How SSRIs as a Group Are Similar. [www.preskorn.com](http://www.preskorn.com)
- [15] M.J. Otero, L. Santos, D. Santos Buelga, A. Domínguez-Gil. Farmacocinética clínica de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina. *Farm. Hosp.*, 1996; 20(2):73-85.
- [16] S. Caccia, M. Cappi, C. Fracasso, S. Garattini. Influence of dose and route of administration on the kinetics of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in rats. *Psychopharmacology*, 1990; 100:509-514.
- [17] R.F. Bergstrom, L. Lemberger, N.A. Farid et al. Clinical pharmacology and pharmacokinetics of fluoxetine: a review. *British Journal of Psychiatry*, 1988; 153 (3): 201-214.
- [18] K.J. Klamerus, K. Maloney, S.F. Sinsinwine, W.J. Jusko, S.T. Chiang. Introduction of a composite parameter to the parameters of venlafaxine and its active O-desmethyl metabolite. *Journal of Clinical Pharmacology*, 1992; 32: 716-724.
- [19] P.J. Perry, C. Zeilmann, S. Arndt. Tricyclic antidepressant concentrations in plasma: an estimate of their sensitivity and specificity as a predictor of the response. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 1994; 14(4): 230-240.

[20] S. Ulrich, J. Läuter. Comprehensive survey of the relationship between serum concentration and therapeutic effect of Amitriptyline in depression. *Clinical Pharmacokinetics*, 2002; 41(11): 853-876.

[21] C. Faravelli, A. Ballerine, A. Ambonetti, A.D. Broadhurst, M. Das. Plasma levels and clinical response during treatment with clomipramine. *Journal of affective disorders*, 1984; 6(1): 95-107.

[22] M.C. Mauri, V. Laini, G. Cerveri; M.E. Scalvini, L.S. Volonteri, F. Regispani, L. Malvini, S. Manfré, L. Boscati, G. Panza. Clinical outcome and tolerability of sertralina in major depression: a study with plasma levels. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and biological Psychiatry*, 2002; 26(3): 597-601.

[23] L. Bjerkenstedt, L. Flyckt, K.F. Overo, O. Lingjaerde. Relationship between clinical effects, serum drug concentration and serotonin reuptake inhibition in depressed patients treated with citalopram. A double-blind comparison of three dose levels. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1985; 28(5): 553-557.

[24] L. Lemberger, R.F. Bergstrom, R.L. Wolen, N.A. Farid, G.G. Enas, G.R. Aronoff. Fluoxetine: clinical pharmacology and physiologic disposition. *Journal of Clinical Psychiatry*, 1985; 3(2): 14-1.

[25] S.H. Sindrup, K. Brosen, L.F. Gram. Pharmacokinetics of the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine: nonlinearity and relation to the sparteine oxidation polymorphism. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 1992; 51(3): 288-295.

[26] S.C. Risch, L.Y. Huev, D.S. Janowsky. Plasma levels of tricyclic antidepressants and clinical efficacy: review of the literature—part II. *The journal of Clinical Psychiatry*, 1979; 40(2): 58-69.

[27] S.A. Montgomery. Measurement of serum drug levels in the assessment of antidepressants. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1980; 10: 411-416.

[28] J.F. Wilson. Survey of reference ranges and clinical measurements for psychoactive drugs in serum. *Therapeutic Drug Monitoring*; 2003; 25: 243-247.

[29] S.H. Preskorn. Recent pharmacology advances in antidepressant therapy for the elderly. *American Journal of Medicine*, 1993; 94(5A): 2S-12S

[30] [www.tiaft.org](http://www.tiaft.org)

[31] C.L. Winek, W.W. Wahba, C.L. Winek Jr, T. Winek Balzer. Drug and chemical blood-level data 2001. *forensic Science International*, 2001; 122:107-123.

[32] K. Mann, C. Hiemke, L.G. Schmidt, D.W. Bates. Appropriateness of therapeutic drug monitoring in routine psychiatric inpatient care. *Ther. Drug Monit.*, 2006; 28: 83-88.

[33] B.B. Rasmussen, K. Brøsen. Is therapeutic drug monitoring a case for optimizing clinical outcome and avoiding interactions of the selective reuptake inhibitors? *Ther. Drug Monit.*, 2000; 22: 143-154.

[34] P. Orsulak, J.J. Schildkraut. Guidelines for therapeutic drug monitoring of tricyclic antidepressant plasma levels. *Ther. Drug Monit.*, 1979; 1:199-208.

[35] P.B. Mitchell. Therapeutic drug monitoring of psychotropic medications. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2001; 52: 45S-54S.

[36] P.B. Mitchell. Therapeutic drug monitoring of non-tricyclic antidepressant drugs. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2004; 42 (11): 1212-1218.



### **III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



Se pueden distinguir dos grandes grupos en cuanto a las técnicas analíticas utilizadas en el análisis toxicológico: las técnicas no cromatográficas basadas en sistemas de inmunoensayo, que permiten el análisis directo de la muestra, y las distintas técnicas cromatográficas que, generalmente, requieren su tratamiento previo.

### **3.1. TÉCNICAS NO CROMATOGRÁFICAS**

Existen distintos inmunoensayos para análisis general de antidepresivos del grupo de los tricíclicos. Entre éstos, las técnicas de RIA están actualmente en desuso debido al desarrollo de otros inmunoensayos no isotópicos, como EMIT, ELISA y FPIA [1-10]. La mayoría de los inmunoensayos se encuentran comercializados en forma de test fáciles de usar, automáticos o semiautomáticos (Ej., Abbott's ADx, SyvaEmittox, COBAS-BIO), y su principal ventaja como técnica analítica es que no se requiere el tratamiento inicial de la muestra. Generalmente, los kits para la detección de fármacos están diseñados para su utilización con muestras de plasma o suero, aunque también se dispone de dispositivos para el análisis de orina. Una gran limitación de las técnicas de inmunoensayo es que no se puede llevar a cabo el diagnóstico de sobredosis general por antidepresivos, ya que no permiten la identificación de fármacos pertenecientes a distintos grupos no relacionados químicamente, como son los de nueva generación. Además, en muchos casos, los sistemas para la detección de ADTs dan lugar a interferencias con compuestos del grupo de las fenotiacinas [3,6]. Son técnicas para el análisis semicuantitativo, aunque se han desarrollado métodos específicos para la determinación cuantitativa de ADTs y su aplicación a TDM [7,8], permitiendo detectar concentraciones de 25-50ng/ml. Sin embargo, los niveles detectados con las técnicas inmunológicas generalmente no presentan buena correlación con los determinados con las técnicas cromatográficas, limitando su utilidad en la TDM [9,10].

### 3.2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Estas técnicas son más específicas y sensibles que las anteriores, pero requieren, generalmente, el tratamiento previo de la muestra.

Las muestras de mayor interés en el análisis de antidepresivos son plasma o sangre total y orina. También se han determinado en otros medios biológicos como contenido gástrico, humor vítreo, pelo, hígado y cerebro.

Existen distintos procedimientos de extracción. En la mayoría de los casos se han empleado extracciones líquido-líquido (LL) o extracciones en fase sólida (SPE). La selección de uno u otro dependerá de los requerimientos perseguidos, el tipo de muestra analizada, el método cromatográfico empleado, o la necesidad de obtener resultados en poco tiempo.

En la **extracción líquido-líquido** los compuestos son extraídos de los medios biológicos mediante la utilización de un disolvente orgánico. Debido al carácter básico de los antidepresivos, las muestras son inicialmente alcalinizadas con NaOH, NH<sub>4</sub>Cl o tampones básicos (tampón bicarbonato, fosfato, borato, carbonato) para obtener un pH generalmente superior a 9.5. Se han empleado distintos disolventes orgánicos (hexano, diclorometano, alcohol isoamílico, éter dietílico, acetato de etilo) o mezclas de disolventes de distintas polaridades [11-15]. La fase orgánica conteniendo los analitos es, generalmente, evaporada a sequedad y reconstituida. En ocasiones, se ha efectuado una reextracción de la fase orgánica recolectada. El volumen de espécimen y de disolvente orgánico empleado dependerá del compuesto que se pretenda analizar, así como del rango de concentraciones esperadas. Los procedimientos de extracción líquido-líquido permiten llevar a cabo extracciones rápidas, útiles en el screening.

La **extracción en fase sólida** (SPE) es un proceso físico de extracción basado en el mismo principio que la cromatografía líquida, en el que están implicadas una fase sólida y otra líquida. La SPE conlleva 5 etapas básicas: el acondicionamiento y equilibrado de los cartuchos de sorbente, la carga de la muestra, el lavado del cartucho, una etapa de secado, y la elución.

Se han utilizado diferentes procedimientos de SPE para la extracción de antidepresivos empleando, generalmente, sorbentes basados en mecanismos de fase reversa como los C8 ó C18, así como los más recientes HLB (balance hidrofílico-lipofílico) [16,17]. Debido al carácter básico de estos compuestos, la utilización de sorbentes en modo mixto como los Bond Elut Certify o MCX [18], que actúan simultáneamente a través de un mecanismo de fase reversa y de un mecanismo de intercambio catiónico, permiten una extracción más selectiva mediante la eliminación de compuestos presentes en la muestra que no tengan carácter básico. En este caso, la muestra debe ser acondicionada previamente con una disolución ácida para permitir la ionización de los antidepresivos, que son eluidos posteriormente mediante un disolvente en medio básico.

Además de los sistemas automáticos para llevar a cabo la SPE (Rapid Trace SPE Workstation, ASPEC XL4, Zymark Rapid-Trace Workstation), existen en el mercado equipos que permiten llevar a cabo la extracción en línea con el sistema cromatográfico, lo que posibilita la automatización total del método analítico, con el consiguiente aumento en el número de muestras que es posible analizar (ej., Spark Biosystem).

Entre las técnicas de extracción alternativas a las anteriormente descritas se encuentra la **microextracción en fase sólida** (SPME). En la SPME la extracción se realiza mediante la utilización de una fibra de sílice fundida recubierta de distintas fases estacionarias (PDMS, PA, CAR-PDMS, CW-DVB) a través de su inmersión directa en la muestra, o poniéndola en contacto con el espacio de cabeza creado mediante su sellado y calentamiento. La extracción se produce a través de la difusión de los compuestos entre la muestra (el espacio de cabeza, en caso de utilizarse esta modalidad) y la fibra.

Lee y col. han publicado un método para la extracción de ADTs en sangre total empleando como fase estacionaria de SPME una fibra de polodemetilsiloxano (PDMS), con un límite de cuantificación de 30ng/mL [19]. C. Salgado y col. han determinado ISRSs en orina, utilizando como recubrimiento de la fibra PDMS-DVB, con un límite de cuantificación de 10ng/mL [20].

En los últimos años se han desarrollado distintas técnicas basadas en el acoplamiento de soportes al sistema cromatográfico, que permiten efectuar un tratamiento de la muestra de forma automática, posibilitando el análisis mediante **la inyección directa de la muestra**, con el consiguiente aumento en el número de muestras analizadas. Estos sistemas sólo pueden ser incorporados a equipos de cromatografía líquida. Se han utilizado para ello distintos soportes como los de medio de acceso restringido (RAM), los de partículas de gran tamaño (LPS) o los soportes monolíticos, en dos posibles configuraciones: uso de soporte y elución directa al detector (*single column approach*), o la elución hacia una columna analítica para efectuar la separación de los compuestos antes de su entrada al detector (*column-switching approach*).

Se han descrito algunos métodos en los que se utiliza este tipo de sistemas para la determinación antidepresivos, generalmente para el análisis de uno o pocos compuestos [21,22]. M. Kollroser y C. Schober han desarrollado un método para el análisis de algunos ADTs [23]. Recientemente, F. Sauvage ha empleado este sistema para la determinación de 13 antidepresivos de distintos grupos y algunos de sus metabolitos en suero [24].

También se ha utilizado en el análisis de antidepresivos sistemas de SPE “on-line”, que realizan todo el proceso de extracción de la muestra y el posterior acoplamiento al sistema cromatográfico automáticamente [25].

### 3.3.1. Cromatografía en capa fina (TLC)

Esta técnica está perdiendo uso debido a su baja sensibilidad, selectividad y la dificultad para realizar determinaciones cuantitativas. Existen métodos que permiten la detección de ADTs en plasma, orina o contenido gástrico, para la identificación preliminar en casos clínicos o forenses. Se han empleado soportes en fase reversa y fase normal, utilizando distintas mezclas de fase móvil como ciclohexano/tolueno/dietilamina, benceno/acetona/EtOH/NH<sub>3</sub>, etilacetato/diclorometano/NH<sub>3</sub>/metanol,

ACN/agua, cloroformo/metanol, Además del Rf, para su detección se han empleado distintos agentes reveladores que dan lugar a la formación de complejos coloreados (Dragendorff, I<sub>2</sub>, Mandelin, HClO<sub>4</sub> en EtOH/H<sub>2</sub>O), así como la luz UV y la espectrofotometría [26-29]. También se dispone de un sistema de TLC comercializado, Toxi-Lab®, que incluye todos los reactivos necesarios para las drogas más usadas y sus metabolitos, así como un esquema interpretativo actualizado [30].

### **3.3.2. Cromatografía capilar micelar electrocinética (MEKC)**

La electroforesis capilar de zona (CZE) es una técnica de separación basada en la diferente movilidad electroforética de las moléculas cargadas bajo la influencia de un flujo electro-osmótico. MEKC permite obtener una mayor resolución mediante la incorporación de un segundo mecanismo de separación, utilizando micelas surfactantes que interaccionan con los analitos. Su principal ventaja es que se requieren pequeños volúmenes de muestra. Además, permite la separación de enantiómeros, ya que eluyen en forma de complejos diastereosoméricos. La detección quiral es interesante en el caso de que los distintos enantiómeros de un compuesto presenten distinta potencia farmacológica y/o farmacocinética, como es el caso de fluoxetina y citalopram que, además, se comercializan como mezcla racémica. Sin embargo, esta técnica no supone una ventaja sobre las técnicas de HPLC o GC en el campo de TDM o de la toxicología clínica debido al elevado precio de estos sistemas.

Esta técnica de separación se ha empleado en el análisis de antidepresivos en plasma y orina [31,32,33] efectuándose, en algunos casos, la separación enantiomérica [34].

### **3.3.3 Cromatografía gaseosa (GC)**

Las primeras técnicas de detección que se acoplaron a GC para el análisis antidepresivos fueron los detectores de ionización de llama (FID) [35] y de captura electrónica (ECD) [36], el segundo de los cuales requiere derivatización previa de los compuestos. La utilización del detector de nitrógeno-fósforo (NPD) ha dado lugar al desarrollo de numerosos métodos

para la detección de ADTs [37-41], ISRSs [42-45] y venlafaxina [43,45] debido a sus estructuras nitrogenadas. Esta técnica ha probado ser una herramienta de gran utilidad en el screening toxicológico y el análisis cuantitativo de estos compuestos sin necesidad de llevar a cabo procedimientos de derivatización [42], debido a su buena sensibilidad (límites de detección del orden de ng/mL), evitándose además muchas de las interferencias obtenidas con el uso de detectores no selectivos como FID.

La espectrometría de masas (MS) acoplada a la GC es la técnica identificativa más utilizada en toxicología forense debido a su alto grado de selectividad y sensibilidad. Se han descrito varios métodos para el análisis toxicológico sistemático de numerosas drogas y sus metabolitos en orina, incluidos los antidepresivos [46]. En la mayoría de los casos, la determinación de antidepresivos mediante esta técnica requiere derivatización previa (trifluoroacetamida, anhídrido trifluoroacético, anhídrido acético/piridina, cloruro de 4-carbetoxihexafluorobutírico, ácido pentafluoropropiónico o heptafluorobutírico, entre otros). Maurer y col. han descrito procedimientos para el screening de antidepresivos en orina, mediante la modificación del método desarrollado para el análisis sistemático [47,48]. Se han descrito también otros métodos para la confirmación ADTs y sus metabolitos en plasma o suero, trabajando en modo full scan, y su posterior cuantificación mediante la monitorización selectiva de los iones de interés [50,51], siendo adecuados tanto para el screening en caso de intoxicación, como para la monitorización de los niveles plasmáticos. Otros métodos han sido desarrollados para la cuantificación de antidepresivos del grupo de los tricíclicos o ISRSs (por grupos de antidepresivos), con límites de detección muy por debajo de los terapéuticos [52-55]. También se ha descrito un método para la determinación conjunta de los enantiómeros de fluoxetina y norfluoxetina, y fluvoxamina, después de su derivatización [56].



### 3.3.4 Cromatografía líquida de alta resolución (LC)

Se han publicado un gran número de métodos empleando LC para el screening toxicológico o la determinación de fármacos antidepresivos y otros relacionados (como neurolépticos), o para la TDM de un antidepresivo en particular (o unos pocos) y sus principales metabolitos. Generalmente, se ha empleado fase reversa mediante la utilización de columnas de analíticas C8 ó C18. La fase móvil utilizada consiste en una mezcla de tampón a distintos pH (fosfato, amonio, acetato) y un disolvente orgánico (ACN, MeOH).

Las técnicas de detección más ampliamente utilizadas en el análisis de antidepresivos mediante LC han sido la visible-ultravioleta (UV) o array de diodos (DAD) y la fluorimetría (FL) [21]. Como técnica de screening, DAD es muy útil, ya que permite la elaboración de bases de datos con los espectros ultravioleta de las sustancias, posibilitando la identificación mediante la comparación del espectro obtenido con el de referencia. Se han descrito métodos estandarizados para la identificación mediante tiempo de retención y espectro UV-DAD [57-59]. Además, algunos sistemas poseen softwares (ej. MMD de E. Merk, Darmstadt/Amsterdam) que emplean algoritmos basados en regresión lineal, permitiendo obtener resultados semicuantitativos de forma rápida. Otros métodos han sido desarrollados para la identificación y cuantificación simultánea en casos sobredosis [60,61], o para la TDM de antidepresivos y sus principales metabolitos [62,63,64] mediante UV o DAD.

El detector FL se ha empleado generalmente para la determinación de uno o pocos antidepresivos simultáneamente y requiere, en la mayoría de los casos, la derivatización de los compuestos para conferirles propiedades fluorescentes (cloruro de dansyl, NBD-COCl, DBD-COCl, NBD-F) [65-69]. Se han desarrollado también métodos que permiten la determinación de enantiómeros con columnas quirales [64,70].

### 3.3.5 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS(/MS)).

Esta ha sido la técnica analítica empleada en el trabajo experimental presentado en esta tesis doctoral. Por ello, los métodos desarrollados para la determinación de antidepresivos mediante LC-MS(/MS) se describirán con mayor detenimiento (Tabla 7).

La espectrometría de masas permite obtener una alta especificidad y sensibilidad, de gran utilidad cuando se requieren niveles de detección muy bajos, como en el caso de la TDM o de los estudios farmacocinéticos. Los antidepresivos son compuestos polares, por lo que la utilización de GC para el análisis requiere su derivatización previa. Por ello, la utilización de LC-MS en la determinación de antidepresivos ha crecido significativamente en los últimos años, permitiendo detectar concentraciones del orden de pg/mL. Además, el uso de LC-MS permite la reducción del tiempo de análisis (de la duración cromatográfica) comparado con otros métodos tradicionales de detección como UV, ya que no es necesario obtener una resolución total entre los compuestos a analizar, y permite llevar a cabo procedimientos de tratamiento de la muestra más sencillos, dando lugar a una mayor productividad (high-throughput).

En la mayoría de los casos, plasma o sangre han sido las muestras biológicas empleadas en la determinación de antidepresivos. También se ha descrito la utilización de otros medios como orina, bilis, humor vítreo, cerebro, hígado, contenido gástrico o pelo, pero en contadas ocasiones [71,72,73].

Debido a la gran variedad de compuestos incluidos dentro de la denominación general de fármacos antidepresivos, la mayoría de los métodos se han desarrollado para la determinación de un compuesto y su principal metabolito [13,14,72,74-82], o compuestos pertenecientes al mismo grupo de antidepresivos [14,22,23,83,84]. Aunque útil para su aplicación a estudios farmacocinéticos o TMD, métodos que sólo detecten un compuesto o un grupo reducido son poco realistas para su uso en un laboratorio de toxicología forense, particularmente en el análisis de fármacos en casos psiquiátricos ya que, generalmente, está implicada la combinación de sustancias.

Recientemente, el grupo de Sauvage y el grupo de Kirchherr han desarrollado métodos en los que se incluyen los principales fármacos antidepresivos de las familias de los ADTs y los ISRSs y sus principales metabolitos [24].

Generalmente, la técnica de ionización utilizada ha sido ESI en modo positivo. También se ha descrito, en menor número de ocasiones, la utilización de APCI, [22,23,76], y en un caso SSI [85], siempre en modo positivo. En cuanto al analizador empleado, éste ha sido mayoritariamente el cuadrupolo, bien simple o en tandem.

Tabla 7. Descripción de los métodos analíticos para la determinación de antidepresivos en los que se utilizó la técnica LC-MS(MS).

Referencia	Compuestos	Muestra	LC		MS		Validación
			Fase estacionaria	Fase móvil	Interfase	Analizador y modo de detección	
K. Kudo, 1997 [88]	amitriptilina, nortriptilina	Plasma (1mL)	HP Hypersil (150x2.1mm, 5µm)	Acetato amónico 100mM/ACN	PB (CI+)	Cuadrupolo simple	En plasma: - Linealidad: 10-1000ng/mL
		Sangre, hígado, cerebro	reextracción de nuevo con metil-tert-butiléter	Flujo= 0.4mL/min		SIM	- LOD: 2 y 5ng/mL (amitriptilina y nortriptilina, respectivamente) - Precisión intradía <15% - Recuperación: 58 y 47% (amitriptilina y nortriptilina, respectivamente) - Aplicación a casos reales
H. Zhang, 2000 [83]	doxepina, imipramina, desipramina, amitriptilina, trimipramina	Plasma (1mL)	SB-C18 Mac Mod rapid resolution (15x2.1mm, 3µm)	Acetato amónico 3mM pH 3.3/ACN	ESI+	Tiempo de vuelo	- Linealidad: 1-50ng/mL (2-100ng/mL para desipramina) - LOQ: 1-2ng/mL
			P.I.: imipramina-d3	Flujo= 1.4mL/min			- Recuperación >92% (72% para desipramina) - Precisión y exactitud intra e interdía <15%
S.R. Needham, 2000 [84]	Amitriptilina, nortriptilina, imipramina, desipramina, clomipramina, doxepina, protriptilina, trimipramina y 11 β-bloqueantes	Patrones en disolución	Distintos rellenos: PFP, CN, OH, C4, C18 (300x2.1mm, 5µm)	Acetato amónico 5mM pH 4.5/ACN Flujo= 0.4mL/min	ESI+	Triple cuadrupolo	/

Referencia	Compuestos	Muestra	LC			MS			Validación
			Preparación y extracción	Fase estacionaria	Fase móvil	Interfase	Analizador y modo de detección		
F. C.W Sutherland, 2001 [75]	Fluoxetina, norfluoxetina	Plasma (1mL)	L-L: hexano/alcohol isoamílico; reextracción con ácido fórmico 2% P.l.: doxepina	Phenomenex Luna C18 (150x2.1mm,5µm) T <sup>a</sup> = 50°C	Ácido fórmico 0.02%/ACN Flujo= 0.35ml/min	ESI+	Triple cuadrupolo MRM	- Linealidad: 0.15-80ng/mL - LOQ: 0.15ng/mL - Precisión y exactitud intra e interdía <15% - Recuperación >95% (comparación con soluciones patrón) - No efecto matriz - Aplicación a casos reales (estudio farmacocinético) - Estabilidad: extracto 4°C/7h	
R. Green, 2002 [74]	Fluoxetina, norfluoxetina	Plasma (0.5mL)	SPE: Oasis HLB 1cc (ASPEC XL4) P.l.: fluvoxamina	XTerra MS C18 (50x2.1mm,3.5µm) T <sup>a</sup> = 50°C	Ácido fórmico 0.05%/MeOH (0.05% ácido fórmico) Flujo= 0.6ml/min (división de flujo post-columna 3:1)	ESI+	Triple cuadrupolo MRM	- Linealidad: 0.5-50ng/mL - Precisión y exactitud intra e interdía <15% - Recuperación: 82-87% (comparación con soluciones patrón) - Selectividad - Estabilidad: -20°C/1 mes; extracto a T <sup>a</sup> amb/24h y 4°C/48h - Aplicación a casos reales (estudio farmacocinético)	

Referencia	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción	MS			Validación	
				LC		Analizador y modo de detección		
				Fase estacionaria	Fase móvil			Interfase
M. Kollroser, 2002 [23]	amitriptilina, nortriptilina, melitracem, dibencepina, doxepina, dusolepina, opipramol	Plasma (1mL)	On-line SPE: Oasis HLB (50x1mm, 30µm) P.I.: lofepramina	Symmetry C18 (150x3mm, 5µm) Precolumnna Symmetry C18 (20x3.9mm, 5µm)	Ácido fórmico 0.1%/ACN Flujo= 0.6mL/min Gradiente	APCI+	Trampa de iones MRM	- Linealidad: 10 ó 50-800 ó 1500ng/mL - LOD: 5ng/mL - LOQ: 10-50ng/mL - Precisión y exactitud intra e interdía <15% - Rendimiento >90% (comparación con soluciones patrón) - Aplicación a casos reales
C. Li, 2002 [14]	Fluoxetina, norfluoxetina	Plasma (0.2mL)	L-L: acetato de etilo P.I.: fluoxetina-d2	Zorbax SB-C18 (50x2.1mm, 3.5µm) T <sup>s</sup> = 50°C	Agua/ACN (0.02% formiato amónico) Flujo= 0.2mL/min	ESI+	Triple cuadrupolo MRM	- Linealidad: 0.8-28ng/mL - LOD: 0.1ng/mL - Precisión y exactitud intra e interdía <15% - Recuperación >40-60% (comparación con soluciones patrón) - Aplicación a casos reales (estudio farmacocinético)

Referencia	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción		LC		MS		Validación
			Fase estacionaria	Fase móvil	Interfase	Analizador y modo de detección			
A. Eerkes, 2002 [13]	Fluoxetina, norfluoxetina	Plasma (0.1mL)	L-L: metilcercbutil éter P. I.: fentanilo-d5	Betasil silica (50x3mm, 5µm)	Acetato amónico 40mM/ ACN/TFA Flujo= 0.5mL/min	ESI+	Triple cuadrupolo MRM	- Linealidad: 0.5-250ng/mL - LOQ: 0.5ng/mL - Precisión y exactitud intradía <15% - Recuperación >80% - No efecto matriz - Estabilidad: Tª amb/24 h, -20°C/3 semanas y después de 3 ciclos con/descong; extractos 4°C/48h	
Z. Shen, 2002 [76]	R-fluoxetina y S-fluoxetina	Plasma (0.2mL)	L-L: acetato de etilo en 96-well plate (Tomtec Cuadra 96 Model 320) P. I.: oxacepam	Chirobiotec V (250x4.6mm, 5µm)	Trifluoroacetato amónico 0.075% en MeOH Flujo 1.2mL/min	APCI+	Triple cuadrupolo MRM	- Linealidad: 2-1000ng/mL - LOQ: 2ng/mL - Precisión y exactitud intradía <15% - Recuperación >60%	

Referencia	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción	LC		MS		Validación
				Fase estacionaria	Fase móvil	Interfase	Analizador y modo de detección	
Z. Zhu, 2002 [78]	Paroxetina	Plasma (0.5mL)	L-L: ciclohexano/acetato de etilo P.I.: fluoxetina	Genesis C18 (50x2.1mm, 4µm)	Formiato amónico 5mM/ACN Flujo 0.22mL/min	ESI+	Triple cuadrupolo MRM	- Linealidad: 0.2-50ng/mL - LOQ: 0.2ng/mL - Precisión y exactitud intra e interdía <15% - Recuperación =70.8% - Selectividad - Estabilidad: -20°C/69días y después de tres ciclos cong./descong.; extractos 4°C/76h
S. Souverain, 2003 [21]	Fluoxetina, norfluoxetina	Plasma (1mL)	L-L: hexano/alcohol isoamílico; reextracción con ácido fórmico 2% P.I.: doxepina	Phenomenex Luna C18 (150x2.1mm, 5µm)	Ácido fórmico 0.02%/ ACN Flujo= 0.35mL/min	ESI+	Triple cuadrupolo MRM	- Linealidad: 0.15-80ng/mL - LOQ: 0.15ng/mL - Precisión y exactitud intradía <15% - Recuperación >95% (comparación con soluciones patrón) - No efecto matriz - Estabilidad 4°C/7h - Selectividad - Aplicación a casos reales



Referencia	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción	LC		MS		Validación
				Fase estacionaria	Fase móvil	Interfase	Analizador y modo de detección	
M. Segura, 2003 [72]	Paroxetina, 4-hidroxi-3-metoxiparoxetina	Plasma (1mL) Orina (1mL)	•Plasma: Hidrólisis con HCl 0.5M/100°C/30min •Orina: 4 protocolos: sin hidrólisis, hidrólisis con HCl, con sulfatasa y con β-glucuronidasa L-L: acetato de etilo P.l.: metoxifenamina, foletrina	Synergi 4u MAX RP80A (150x2mm, 4µm)	Acetato amónico 40mM/ ACN/TFA Flujo= 0.5mL/min	ESI+	Trampa de iones MRM	En plasma - Linealidad: 0.75-100ng/mL y 5-100ng/mL (paroxetina metabolito) - LOD: 0.7 y 2.2ng/mL (paroxetina y metabolito) - LOQ: 0.7 y 2.2ng/mL (paroxetina y metabolito) - Precisión y exactitud intradía <15% - Recuperación ~ 75% - Estabilidad después de tres ciclos cong/descong. - Aplicación a casos reales (estudio farmacocinético)
T. G. Halvorsen, 2003 [86]	Amitriptilina, domipramina, doxepina, trimipramina, citalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina	Plasma y sangre (0.05mL)	LPME: ácido fórmico 0.2M (aceptor)/dodecil acetato	Inertsil 3 ODS-3 (50x2mm, µm)	Formiato amónico 5mM pH 2.7/ACN Flujo= 0.2mL/min	ESI+	Trampa de iones Full scan (m/z 260-335)	- LOD: 1-106ng/mL - Recuperación: 9-52% - No efecto matriz

Referencia	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción	LC			MS		
				Fase estacionaria	Fase móvil	Interfase	Analizador y modo de detección	Validación	
M. Kollrosier, 2003 [22]	citalopram, fluvoxamina, paroxetina	Plasma (1mL)	On-line SPE: Oasis HLB (50x1mm, 30µm) P.I.: metilfluoxetina	Symmetry C18 (150x3mm, 5µm) Precolumna Symmetry C18 (20x3.9mm, 5µm)	Ácido fórmico 0.1%ACN Flujo= 0.6mL/min	APCI+	Trampa de iones MRM	- Linealidad: 20-800ng/mL (10-600ng/mL paroxetina) - LOD: 5ng/mL - LOQ: 10-20ng/mL - Precisión y exactitud intra e inter día <15% - Especificidad - No efecto matriz	
U. Gutteck, 2003 [87]	amitriptilina, nortriptilina, imipramina, desipramina, clomipramina, norclomipramina, trimipramina, escitalopram, fluvoxamina, dibencepina, doxepina, norcloxepina, flupentixol, flufenacina, opiipramol, pipamperona, reboxetina, tioridacina, zuclopentixol	Suero (1mL)	4 métodos distintos según grupos de compuestos L-L: n-hexano/DCM (4:1) o DCM Reconstitución en distintos volúmenes de FM P.I.: imipramina-d3, doxepina-d3, cloroaloperidol (según método)	Sílice Uptisphere C18 (12.5x2mm, 5µm) precolumna Interchim (8x2mm)	Acetato amónico 50mM pH 4/ACN Flujo= 0.2-0.3mL/min isocrático o gradiente, en función del grupo de compuestos	ESI+	Cuadropolo simple SIM	- Linealidad: según compuesto - LOQ: 1.4-54nmol/L - Precisión y exactitud intra e inter día <15% - Recuperación absoluta: 60-103% - Selectividad y especificidad - Aplicación a casos reales	

Referencia	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción	LC		MS		Validación
				Fase estacionaria	Fase móvil	Interfase	Analizador y modo de detección	
K.E. Goeringer, 2003 [71]	venlafaxina, O-desmetilvenlafaxina, risperidona, 9-OH-risperidona, trazodona, fluvoxamina, paroxetina, fluoxetina, norfluoxetina, sertralina, N-desmetilsertralina, nefazodona	Sangre (1mL) Bilis, cerebro, hígado, orina, humor vítreo, contenido gástrico	L-L: cloruro de butilo; reextracción con cloroformo P.L.: trazodona	Zorbax Extend-C18 (150x2.1mm, 5µm) Tª= 21°C	Amonio 50mM/MeOH/THF pH 10 Flujo= 0.25mL/min	ESI+	Cuadrupolo simple Full scan (m/z 115-500)	Para sangre: - Linealidad: 10 ó 50-5000ng/mL - LOQ= 10-50ng/mL - Precisión y exactitud intra e interdía <15% - Recuperación >78% - Aplicación a casos reales
W. Naidon, 2004 [77]	Paroxetina	Plasma (0.4mL)	L-L: metiliterbutiléter P.L.: fentanilo-d5	Betasil silica (50x3mm, 5µm)	Acetato amónico 40mM/ ACN/TFA Flujo= 0.5mL/min	ESI+	Triple Cuadrupolo MRM	- Linealidad: 0.05-50ng/mL - LOQ: 0.05ng/mL - Precisión y exactitud intradía <15% - Recuperación absoluta ~ 100% - No efecto matriz - Selectividad - Estabilidad: Tª amb/24 h, -20°C/460 días y después de 3 ciclos con/descong; extractos 2-8°C/48h

Referencia	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción	LC		MS		Validación
				Fase estacionaria	Fase móvil	Interfase	Analizador y modo de detección	
J. Avella, 2004 [82]	Clomipramina, norclomipramina	Sangre (2mL), Hígado y cerebro (10g), orina, contenido gástrico	Homogenización de tejidos con 40mL agua L-L: hexano/alcohol isoamílico; reextracción con tolueno/isoamílico P.L.: protriptilina	Zorbax SB C18 (150x2.1mm, 5µm)	Acetato amónico 2mM (0.01% TFA)/ACN (acetato amónico 2mM y 0.01%TFA) Flujo= 0.5mL/min	ESI+	Cuadrapolo simple SIM	- Linealidad: 0.125-1250ng/mL - Aplicación a 2 casos reales
S.S. Singh, 2004 [79]	Escitalopram	Plasma (3mL)	L-L: dietiléter/ diclorometano P.L.: paroxetina	ODS 4MC™ AQ (150x4.6mm, 5µm)	Acetato amónico 2mM pH 5/ACN Flujo 1mL/min (división flujo post-columna (8:2)	ESI+	Cuadrapolo simple SIM	- Linealidad: 1-200ng/mL - LOQ: 1ng/mL - Precisión y exactitud intra e inter día <15% - Recuperación absoluta: 75-80% - Selectividad - Estabilidad: Tª amb/8h, -70°C/36días y después de 3 ciclos cong/descong.; extractos 15°C/30h - Aplicación a casos reales (estudio farmacocinético)

Referencia	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción				LC		MS		Validación
			Fase estacionaria		Fase móvil	Interfase	Analizador y modo de detección				
P. Massaroti, 2005 [80]	Paroxetina	Plasma (0.5mL)	L-L: hexano/acetato de etilo P.L.: fluoxetina	Polaris C18 (50x2mm, 5µm) Precolumna Phenomenex® C18	Agua/ACN(0.1% ácido fórmico) Flujo= 0.15mL/min	ESI+	Triple Cuadrupolo MRM	- Linealidad: 0.2-20ng/mL - LOQ: 0.05ng/mL - Precisión y exactitud intradía <15% - Recuperación absoluta: 78.7% - Selectividad - Estabilidad: -70°C/73 días - Aplicación a casos reales (estudio farmacocinético)			
D.S. Jain, 2005 [81]	Sertralina	Plasma (0.5mL)	SPE: Oasis HLB P.L.: imipramina	Beta Basic C8 (100x4.6mm, 5µm) T <sub>m</sub> = 45°C	Acetate amónico 5mM pH3/ACN Flujo= 0.5mL/min	ESI+	Triple cuadrupolo MRM	- Linealidad: 0.5-60ng/mL - LOQ: 0.5ng/mL - Precisión y exactitud intra e interdía <15% - Recuperación absoluta: 81.5% - Selectividad - Estabilidad: T <sup>o</sup> amb./6h, -70°C/70 días y después de tres ciclos cong./descong.; extractos en inyector/40h			

Referencia	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción		LC		MS		Validación
			Fase estacionaria	Fase móvil	Interfase	Analizador y modo de detección			
H. Juan, 2005 [17]	fluoxetina, citalopram, paroxetina, venlafaxina	Plasma (0.5mL)	SPE: Oasis HLB 1cc (Auto Science® AP-01P vacuum pump) P. I.: fluvoxamina	Macherey-Nagel C18 (250x4.6, 5µm) Tª= 40°C	Acetato amónico 30mM (0.06% ácido fórmico)/ACN	ESI+	Cuadrapolo simple SIM	- Linealidad: 5-1000ng/mL - LOD: 0.1-0.5ng/mL - Precisión y exactitud intra e interdia <15% - Recuperación absoluta >73% - Aplicación a casos reales	
F.L. Sauvage, 2006 [24]	amitriptilina, nortriptilina, imipramina, desipramina, clomipramina, norclomipramina, trimipramina, amoxapina, doxepina, maprotilina, mianserina, normianserina, dotiepina, fluoxetina, norfluoxetina, paroxetina, sertralina, norsertralina, citalopram, N-norcitalopram (compuestos divididos en 2 grupos)	Plasma (0.1mL)	Centrifugación e inyección del sobrenadante On-line SPE: Cyclone (50x0.5mm, 50µm) P. I.: mianserina-d3, amitriptilina-d6, clomipramina-d3, imipramina-d3	XTerra MS C18 (50x2.1, 5µm)	Ácido fórmico 0.1%/ACN	ESI+	Triple cuadrapolo MRM	- Linealidad: 10-500ng/mL - LOD: 0.1-0.5ng/mL - Precisión y exactitud intra e interdia <15% - No efecto matriz - Comparación de resultados con control externo de calidad	

Referencia	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción	LC		MS		Validación
				Fase estacionaria	Fase móvil	Interfase	Analizador y modo de detección	
W.F. Smyth, 2006 [73]	Citalopram, fluoxetina, paroxetina, sertralina, venlafaxina, mirtazapina	Pelo (200mg)	Lavado y extracción: MeOH (Tecator Soxtec HT12 system con 1046 Soxtec service unit)	C18 (150x4.6mm)	Ácido fórmico 0.1%+TFA 0.1%:MeOH (80:20)/ MeOH: ácido fórmico 0.1%+TFA 0.1%	ESI+	•Trampa de iones MRM •Cuadrupolo-tiempo de vuelo	- LOD: $9 \times 10^{-9}$ -6.25x10 <sup>7</sup> mmol/mL
T. Shinozuka, 2006 [85]	imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina, trimipramina, clomipramina, amoxapina, lofepramina, dosulepina, maprotilina, mianserina, seliptina, trazodona, fluvoxamina, paroxetina, minalcipram, sulpiride, tandospirona, metilfenidato, melitracen	Plasma (1mL)	SPE: Oasis HLB 1cc P.I.: diacepam	Inertsil C8 (150x2mm, 5µm) T <sup>a</sup> = 35°C	Acetato amónico 10mM pH5/MeOH Flujo= 0.1mL/min	SSI+	Trampa de iones Full scan (m/z 60-500)	- LOD: 30-630ng/mL - LOQ: 100-200ng/mL - Linealidad: 100-1000ng/mL - Precisión intradía <15% - Rendimiento: 69-102%

Referencia	Compuestos	Muestra	Preparación y extracción	LC			MS		Validación
				Fase estacionaria	Fase móvil	Interfase	Analizador y modo de detección		
H. Kirchherr, 2006 [89]	48 psicofármacos (19 antidepresivos y algunos de los principales metabolitos, y 23 antipsicóticos o neurolepticos)	Suero (0.1mL)	Precipitación de proteínas (ACN/MeOH)  P.I: clonidina, dihidrometiltrisperidon, metabenztiазurona  Distintos volúmenes de reconstitución según el grupo de fármacos	Chromolith Speed ROD C18 (50x4.6mm, 5µm)	Acetato amónico 5mM pH 3.9/MeOH  Flujo= 1mL/min	ESI+	Triple cuadrupolo  MRM	- Linealidad: 1 ó 5-20, 50 ó 100ng/mL, 5 ó 10-500 ó 1000ng/mL y 100-10000ng/mL, según rango terapéutico  - LOQ: 0.13-28.3ng/mL  - Precisión y exactitud intra e inter día <15%  - Recuperación absoluta: 92-111% (185% olanzapina)  - No efecto matriz, salvo para olanzapina	



**BIBLIOGRAFÍA**

- [1] G.M. Meenan, S. Barlotta, M. Leher. Urinary tricyclic antidepressant screening: comparison results obtained with Abbott FPIA reagents and Syva EIA reagents. *J. Anal. Toxicol.*, 1990; 14 (5): 273-276.
- [2] R.C. Dorey, S.H. Preskorn, P.K. Widener. Results compared for tricyclic antidepressants as assayed by liquid chromatography and enzyme immunoassay. *Clin. Chem.*, 1988; 34 (11): 2348-2351.
- [3] T.J. Schroeder, J.J. Tasset, E.J. Otten, J.R. Hedges. Evaluation of Syva EMIT toxicological serum tricyclic antidepressant assay. *J. Anal. Toxicol.*, 1986; 10 (6): 221-224.
- [4] H. Denis, S. Marullo, J.Hoebeke, A.D. Strosberg. Enzyme-linked immunosorbent assay for amitriptyline and other antidepressants using a monoclonal antibody. *Clin. Chim. Acta*, 1986; 159 (3): 257-267.
- [5] A. Dasgupta, C. McNeese, A. Wells. Interference of carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in the fluorescence polarization immunoassay for tricyclic antidepressants: estimation of the true tricyclic antidepressant concentration in the presence of carbamazepine using a mathematical model. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2004; 121 (3): 418-425.
- [6] W.M. Asselin, J.M. Leslie. Use of the EMITTOX serum tricyclic antidepressant assay for the analysis of urine samples. *J. Anal. Toxicol.*, 1990; 14 (3): 168-171.
- [7] M. Banger, B. Hermes, S. Hartter, C. Hiemke. Monitoring serum concentrations of clomipramine and metabolites: fluorescence polarization immunoassay versus high performance liquid chromatography. *Pharmacopsychiatry*, 1997; 30 (4): 128-132.
- [8] S. Pankey, C. Collins, A. Jaklitsch, A. Izutsu, M. Hu, M. Pirio, P. Singh. Quantitative homogeneous enzyme immunoassay for amitriptyline, nortriptyline, imipramine and desipramine. *Clin. Chem.*, 1986; 32 (5): 768-772.

- [9] M.L. Rao, U. Staberock, P. Baumann, C. Hiemke, A. Deister, C. Cuendet, M. Amey, S. Haertter, M. Kraemer. *Clin. Chem.*, 1994; 40 (6): 929-933.
- [10] L.P. Hackett, L.J. Dusci, K.F. Ilett. A comparison of high-performance liquid chromatography and fluorescence polarization immunoassay for therapeutic drug monitoring of tricyclic antidepressants. *Ther. Drug Monit.*, 1998; 20 (1): 30-34.
- [11] S. Ertürk, S.M. Çetin, S. Atmaca, L. Ersoy, G. Baktir. A sensitive HPLC method for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma with fluorescence detection. *Ther. Drug Monit.*, 2005; 27: 38-43.
- [12] K.E. Goeringer, L. Raymond, G.D. Christian, B.K. Logan. Post-mortem forensic toxicology of selective serotonin reuptake inhibitors: a review of pharmacology and report of 168 cases. *J. Forensic Sci.*, 2000; 45 (3): 633-648.
- [13] A. Eerkes, N Weng, M. King, A. Du, W.Z. Shou. A sensitive and high-throughput LC/MS/MS method using a silica column and an aqueous-organic mobile phase for the analysis of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma. *J. Liq. Chrom. and Rel. Technol.*, 2002; 25 (8): 1215-1227.
- [14] C. Li, Z. Ji, F. Nan, Q. Shao, P. Liu, J. Dai, J. Zhen, H. Yuan, F. Xu, J. Cui, B. Huang, M. Zhang, C. Yu. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of fluoxetine and its main active metabolite norfluoxetine in human plasma with deuterated fluoxetine as internal standard. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002; 16: 1844-1850.
- [15] E. Lacassie, J.M. Gaulier, P. Marquet, J.F. Rabatel, G. Lachâtre. Methods for the determination of seven selective serotonin reuptake inhibitors and three active metabolites in human serum using high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *J. Chromatogr. B*, 2000; 742: 229-238.
- [16] I. Kristoffersen, A. Bugge, E. Lundanes, L. Slørdal. Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine, paroxetine and their metabolites in

plasma and whole blood by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, 1999; 734: 229-246.

[17] H. Juan, Z. Zhiling, L. Huande. Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid-chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI). *J. Chromatogr. B*, 2005; 820: 33-39.

[18] A.M. Martínez, C. Sánchez de la Torre, E. Almarza. A comparative solid-phase extraction study for the simultaneous determination of fluvoxamine, mianserin, doxepin, citalopram, paroxetine, and etoperidone in whole blood by capillary gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J. Anal. Toxicol.*, 2004; 28 (3): 174-180.

[19] X.P. Lee, T. Kumazawa, O. Suzuki. Detection of tricyclic antidepressants in whole blood by headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, 1997; 35 (7): 302-308.

[20] C. Salgado-Petinal, J.P. Lamas, C. García-Jares, M. Llompart, R. Cela. Rapid screening of selective serotonin re-uptake inhibitors in urine samples using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005; 382: 1351-1359.

[21] S. Souverain, M. Mottaz, S. Cherkaoui, J.L. Veuthey. Rapid analysis of fluoxetine and its metabolite in plasma by LC-MS with column-switching approach. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003; 377: 880-885.

[22] M. Kollroser, C. Schober. An on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of citalopram, fluvoxamine, and paroxetine in human plasma. *Chromatographia*, 2003; 57: 133-138.

[23] M. Kollroser, C. Schober. Simultaneous determination of seven tricyclic antidepressant drugs in human plasma by direct-injection HPLC-APCI-MS-MS with ion trap detector. *Ther. Drug Monit.*, 2002; 24: 537-544.

- [24] F.L. Sauvage, J.M. Gaulier, G. Lachâtre, P. Marquet. A fully automated turbulent-flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry technique for monitoring antidepressants in human serum. *Ther. Drug Monit.*, 2006; 28 (1): 123-130.
- [25] A. de Castro, M.M. Ramírez, M. Laloup, N. Samyn, G. De Boeck, M. López-Rivadulla. A high-throughput on-line SPE-LC-MS/MS for the analysis of 14 antidepressants and metabolites in plasma. Presentado en el 44º Congreso Internacional de la Asociación Internacional de Toxicólogos Forenses (TIAFT), Eslovenia, 28 agosto-1 septiembre de 2006.
- [26] A. Oztunc, A. Onal, S. Erturk. 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane as a new derivatization reagent for high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography: rapid screening of plasma for some antidepressants. *J. Chromatogr. B*, 2002; 774 (2): 149-155.
- [27] G. Misztal, R. Skibinski. Chromatographic analysis of new antidepressant drugs by normal- and reversed-phase TLC. *J. Planar Chromatogr.-Modern TLC*, 2001; 14 (4): 300-304.
- [28] I. Wiater, K. Katarzyna, A. Parczewski, M. Kala. Optimum TLC system for identification of phenothiazines and tri- and tetracyclic antidepressants. *Mikrochimica Acta*, 1998; 129 (1-2): 121-126.
- [29] T.A. Briellmann, C. Hamberg, A.N. Jeger. Determination of tricyclic antidepressants and neuroleptics in post mortem blood by instrumental thin-layer-chromatography. *Contrib. Forensic Toxicol., Proc. Int. Meet. Int. Assoc. Forensic Toxicol.*, 31<sup>st</sup>, 1994.
- [30] D.R. Jarvie, D. Simpson, R. Infirm. Drug screening: evaluation of the Toxi-Lab TLC system. *Ann. Clin. Biochem.*, 1986; 23 (1): 76-84.
- [31] L. Labat, M. Deveaux, P. Dallet, J.P. Dubost. Separation of new antidepressants and their metabolites by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. B*, 2002; 773: 17-23.

- [32] A. Aumatell, R.J. Wells. Determination of a cardiac antiarrhythmic, tricyclic antipsychotics and antidepressants in human and animal urine by micellar electrokinetic. *J. Chromatogr. B*, 1995; 669 (2): 331-344.
- [33] K.J. Lee, J.J. Lee, D.C. Moon. Determination of tricyclic antidepressants in human plasma by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr.*, 1993; 616 (1):135-143.
- [34] R. Mandrioli, M.A. Raggi. Advances in the enantioseparation of second-generation antidepressant drugs by electrodriven methods. *Electrophoresis*, 2006; 27 (1): 213-221.
- [35] Berzas, C. Guiberteau, M.J. Villaseñor, V. Rodríguez. Development of a gas capillary gas chromatographic procedure. *Anal. Chem. Acta*, 2004; 519 (2): 219-230.
- [36] P. Hartvig, B. Näslund. Simultaneous determination of plasma amitriptyline and nortriptyline as trichloroethyl carbamates by electron-capture gas chromatography. *J. Chromatogr.*, 1977; 133: 367-371.
- [37] R. De La Torre, J.A. Pascual, S. González, J. Ballesta. Quantitative determination of tricyclic antidepressants and their metabolites in plasma by solid-phase extraction (Bond-Elut TCA) and separation by capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Ther. Drug Monit.*, 1998; 20 (3): 340-346.
- [38] M. Terada, T. Shinozuka, E. Tanaka, M.K. Osman, Z.T. Tun, N. Ikawa, Y. Fujimoto, K. Honda, J. Yanagida, S. Misawa. Simultaneous determination of eleven tricyclic and tetracyclic antidepressant drugs in human serum by wide-bore capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Japanese Journal of Forensic Toxicology*, 1997; 15 (3): 217-225.
- [39] G.L. Corona, B. Bonferoni, P. Frattini, M.L. Cucchi, G. Santagostino. Gas chromatography routine analysis of five tricyclic antidepressants in plasma. *J. Chromatogr.*, 1983; 227: 347-351.

- [40] N. Van Brunt. Application of new technology for the measurement of tricyclic antidepressants using capillary gas chromatography with a fused silica DB5 column and nitrogen phosphorus detection. *Ther. Drug Monit.*, 1983; 5 (1): 11-37.
- [41] D. R. Abernethy, D.J. Greenblatt, I.R. Shader. Tricyclic antidepressant determination in human plasma by gas chromatography using nitrogen-phosphorus detection: application to single-dose pharmacokinetic studies. *Pharmacol.*, 1981; 23 (2): 57-63.
- [42] M.A. Martínez, C. Sánchez de la Torre, E. Almarza. A comparative solid-phase extraction study for the simultaneous determination of fluvoxamine, mianserine, doxepin, citalopram, paroxetine, and etoperidone in whole blood by capillary gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J. Anal. Toxicol.*, 2004; 28: 174-180.
- [43] M.A. Martínez, C. Sánchez de la Torre, E. Almarza. Simultaneous determination of viloxazine, venlafaxine, imipramine, desipramine, sertraline, and amoxapine in whole blood: comparison of two extraction/clean-up procedures for capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J. Anal. Toxicol.*, 2002; 26 (5): 296-302.
- [44] H.N. Jourdil, P.D. Fontanille, G.M. Bessard. Concurrent determination of second-generation antidepressants in plasma by using gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Clin. Chem.*, 1997; 43 (11): 2209-2210.
- [45] E. Lacassie, J.M. Gaulier, P. Marquet, J.F. Rabatel, G. Lachâtre. Methods for the determination of seven selective serotonin reuptake inhibitors and three active metabolites in human serum using high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *J. Chromatogr. B*, 2000; 742: 229-238.
- [46] H.H. Maurer. Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 1992; 580 (1-2): 3-41.

- [47] H.H. Maurer, J. Brickeboeller-Friedrich. Screening procedure for the detection of antidepressants of the selective serotonin reuptake inhibitor type and their metabolites in urine as part of a modified systematic toxicological analysis procedure using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, 2000; 24: 340-347.
- [48] J. Brickeboeller-Friedrich, H.H. Maurer. Screening for detection of new antidepressants, neuroleptics, hypnotics, and their metabolites in urine by GC-MS developed using rat liver microsomes. *Ther. Drug Monit.*, 2001; 23 (1): 61-70.
- [49] J. Hallbach, H. Vogel, P.W. Boogaard, W.G. Guder. Identification and quantification of tricyclic antidepressants in serum by computerized gas chromatography-mass spectrometry. *Clin. Lab.*, 1999; 45 (3/4): 191-200.
- [50] E. Lacassie, S. Ragot, J.M. Gaulier, P. Marquet, G. Lachâtre. A specific dosage method for the analysis of 24 antidepressants using gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). *Acta Clinica Belgica*, 1999; 1: 20-24.
- [51] N. Narasimhachari, R.O. Friedel, J.J. Saady. Improved tricyclic antidepressant assay by GC/MS. *Research Communications in Psychology, Psychiatry and Behaviour*, 1979; 4 (4): 447-490.
- [52] J.M. Wilson, L.J. Williamson, V.A. Raisys. Simultaneous measurement of secondary and tertiary tricyclic antidepressants by GC/MS chemical ionization mass fragmentography. *Clin. Chem*, 1977; 23 (6): 1012-1017.
- [53] B.A. Way, D. Stickle, M.E. Mitchell, J.W. Koenig, J. Turk. Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric measurement of tricyclic antidepressant drugs. Utility of the 4-carbomethoxyhexafluorobutyryl derivatives of secondary amines. *J. Anal. Toxicol.*, 1998; 22 (5): 374-382.
- [54] C.B. Eap, G. Bouchoux, M. Amey, N. Cochard, L. Savary, P. Baumann. Simultaneous determination of human plasma levels of citalopram, sertralina,

and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.*, 1998; 36: 365-371.

[55] C. Salgado-Petinal, J.P. Lamas, C. García-Jares, M. Llompart, R. Cela. Rapid screening of selective serotonin re-uptake inhibitors in urine samples using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005; 382: 1351-1359.

[56] C.B. Eap, N. Gaillard, K. Powell, P. Baumann. Simultaneous determination of plasma levels of fluvoxamina and of the enantiómeros of fluoxetina and norfluoxetina by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 1996; 682: 265-272.

[57] A. Tracqui, P. Kinz, P. Kreissing, P. Mangin. A simple and rapid method for toxicological screening of 25 antidepressants in blood or urine using high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Annales de Biologie Clinique*, 1992; 50 (9): 639-647.

[58] C. Lai, T. Lee, K. Au, A.Y. Chan. Uniform solid-phase extraction procedure for toxicological drug screening in serum and urine by HPLC with photodiode-array detection. *Clin. Chem.*, 1997; 43 (2): 312-325.

[59] M. Bogusz, M. Erkens. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic database of retention indices and UV spectra of toxicologically relevant substances and its interlaboratory use. *J. Chromatogr. A*, 1994; 674 (1-2): 97-126.

[60] K. Titier, N. Castaing, E. Scotto-Gomez, F. Pehourcq, N. Moore, M. Molimard. High performance liquid chromatographic method with diode array detection for identification and quantification of the eight new antidepressants and five of their active metabolites in plasma after overdose. *Ther. Drug Monit.*, 2003; 25: 581-587.

[61] T.W. Ryan. Identification and quantification of tricyclic antidepressants by UV-photodiode array detection with multicomponent analysis. *J. Liq. Chromatogr.*, 1993; 16 (7): 1545-1560.



- [62] C. Duverneuil, L.G. de la Grandmaison, P. de Mazancourt, J.C. Alvarez. A high-performance liquid chromatography method with photodiode-array UV detection for therapeutic drug monitoring of the nontricyclic antidepressant drugs. *Ther. Drug Monit.*, 2003; 25 (5): 565-573.
- [63] S. Joron, H. Robert. Simultaneous determination of antidepressant drugs and metabolites by HPLC. Design and validation of a simple and reliable analytical procedure. *Biomedical Chromatography*, 1994; 8 (4): 158-164.
- [64] X. Guo, T. Fukushima, F. Li, K. Imai. Determination of fluoxetine enantiomers in rat plasma by pre-column fluorescent derivatization and column-switching high-performance liquid chromatography. *Analyst*, 2002; 127 (4): 480-484.
- [65] L. Kristoffersen, A. Bugge, E. Lundanes, L. Slordal. Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine, paroxetine and their metabolites in plasma and whole blood by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, 1999; 734 (2): 229-246.
- [66] Q.H. Meng, D. Gauthier. Simultaneous analysis of citalopram and desmethylcitalopram by liquid chromatography with fluorescence detection after solid-phase extraction. *Clin. Biochem.*, 2005; 38 (3): 282-285.
- [67] Y. Higashi, H. Matsumura, Y. Fujii. Determination of fluvoxamine in rat plasma by HPLC with pre-column derivatization and fluorescence detection using 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. *Biomed. Chromatogr.*, 2005; 19 (10): 771-776.
- [68] M.A. Raggi, V. Pucci, R. Mandrioli, C. Sabbioni, S. Fanali. Determination of recent antidepressant citalopram in human plasma by liquid chromatography-fluorescence detection. *Chromatographia*, 2003; 57 (5-7): 273-278.
- [69] S.A. Stout, C.L. De Vane. Quantification of imipramine and its major metabolites in whole blood, brain, and other tissues of the rat by liquid chromatography. *Psychopharmacol.*, 1984; 84 (1): 39-41.

[70] B. Rochat, M. Amey, P. Baumenn. Analysis of enantiómeros of citalopram and its demethylated metabolites in plasma of depressive patients using chiral reverse-phase liquid chromatography. *Ther. Drug Monit.*, 1995; 17 (3): 273-279.

[71] K.E. Goeringer, I.M. McIntyre, O. Drummer. LC-MS analysis of serotonergic drugs. *J. Anal. Toxicol.*, 2003; 27: 30-35.

[72] M. Segura, J. Ortuño, M. Farré, R. Pacifici, S. Pichini, J. Juglar, J. Segura, R. de la Torre. Quantitative determination of paroxetine and its 4-hydroxy-3-methoxy metabolite in plasma by high-performance liquid chromatography/electrospray ion trap mass spectrometry: application to pharmacokinetic studies. *Rapid commun. Mass Spectrom.*, 2003; 17: 1455-1461.

[73] W.F. Smyth, J.C. Leslie, S. McClean. B. Hannigan, H.P. McKenna, B. Doherty, C. Joyce, E. O'Kane. The characterization of selected antidepressant drugs using electrospray ionisation with ion trap mass spectrometry and with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and their determination by high-performance liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006; 20: 1637-1642.

[74] R. Green, R. Houghton, J. Scarth, C. Gregory. Determination of fluoxetine and its major metabolite norfluoxetine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, 2002; 55: 133-136

[75] F.C.W. Sutherland, D. Bandenhorst, A.D. de Jager, T. Scanes, H.K.L. Hundt, K.J. Swart, A.F. Hundt. Sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of fluoxetine and its primary active metabolite norfluoxetine in human plasma. *J. Chromatogr. A*, 2001; 914: 45-51.

[76] Z. Shen, S. Wang, R. Bakhtiar. Enantiomeric separation and quantification of fluoxetine (Prozac<sup>®</sup>) in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using liquid-liquid extraction in 96-well plate format. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002; 16: 332-338.

- [77] W. Naidong, A. Eerkes. Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the analysis of paroxetina in human plasma. *Biomed. Chromatogr.*, 2004; 18: 28-36.
- [78] Z. Zhu, L. Neirinck. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of paroxetina in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 2002; 780: 295-300.
- [79] S.S. Singh, H. Shah, S. Gupta, M. Jain, K. Sharma, P. Thakkar, R. Shah. Liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry method for the determination of escitalopram in human plasma and its application in bioequivalence study. *J. Chromatogr. B*, 2004; 811: 209-215.
- [80] P. Massaroti, N.M. Cassiano, L.F. Duarte, D.R. Campos, M.A.M. Marchioretto, G. Bernasconi, S. Calaffati, F.A.P. Barros, E.C. Meurer, J. Pedrazzoli. Validation of a selective method for determination of paroxetina in human plasma by LC-MS/MS. *J. Pharmaceut. Sci.*, 2005; 8 (2): 340-347.
- [81] D.S. Jain, M. Sanyal, G. Subbaiah, U.C. Pande, P. Shrivastav. Rapid and sensitive method for the determination of sertralina in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J. Chromatogr. B*, 2005; 829: 69-74.
- [82] J. Avella, M. Lehrer, M. Katz, E. Minden. Two cases involving clomipramine intoxication. *J. Anal Toxicol.*, 2004; 28: 504-508.
- [83] H. Zhang, K. Heinig, J. Henion. Atmospheric pressure ionization time-of-flight mass spectrometry coupled with fast liquid chromatography for quantitation and accurate mass measurement of five pharmaceutical drugs in human plasma. *J. Mass Spectrom.*, 2000; 35: 423-431.
- [84] S.R. Needham, P.R. Brown, K. Duff, D. Bell. Optimized stationary phases for the high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric analysis of basic pharmaceuticals. *J. Chromatogr. A*, 2000; 869: 159-170.

[85] T. Shinozuka, M. Terada, E. Tanaka. Solid-phase extraction and análisis of 20 antidepressant drugs in human plasma by LC/MS with SSI method. *Forensic Sci. Int.*, 2006; 162: 108-112.

[86] T.G. Halvorsen, S. Pedersen-Bjergaard, J.L.E. Reubsaet, K.E. Rasmussen. Liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry. Extraction from small volumes of biological samples. *J. Separation Sci.*, 26 (17): 1520-1526.

[87] U. Guttek, K.M. Rentsch. Therapeutic drug monitoring of 13 antidepressant and five neuroleptic drugs in serum with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2003; 41 (12): 1571-1579.

[88] K. Kudo. Selective determination of amitriptyline and nortriptyline in human plasma by HPLC with UV and PB mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, 1997; 21: 185-189.

[89] H. Kirchherr, W.N. Kühn-Velten. Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: a multi-level, single-sample approach. *J. Chromatogr. B*, 2006; 843: 100-113.

## **IV. LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS**



## 4.1. INTRODUCCIÓN A LC-MS

### ¿Por qué el acoplamiento LC-MS?

La introducción de la espectrometría de masas (MS) ha supuesto un gran avance en las técnicas analíticas por su gran sensibilidad y su alto grado de fiabilidad. Su principal ventaja sobre otras técnicas de detección (visible-ultravioleta, fluorimetría, detección electroquímica) es, por un lado, su capacidad para suministrar información útil desde el punto de vista identificativo, de forma que el espectro de masas se presenta así como una prueba casi inequívoca de la identidad del compuesto a analizar. Por otro lado, se trata de un detector universal, basado en la separación de las especies cargadas de acuerdo con su relación masa/carga. La espectrometría de masas se presenta como uno de los métodos de detección más sensibles y específicos para el análisis molecular.

El acoplamiento de la espectrometría de masas a la cromatografía gaseosa (GC-MS) surge ya a finales de la década de 1950 [1]. Hoy en día, esta metodología se considera una técnica robusta, utilizada de forma rutinaria en los laboratorios de análisis, y su rol como técnica de cribado es incuestionable. Esto se debe a que la utilización de impacto electrónico (EI) como técnica de ionización da lugar a una fragmentación reproducible de los compuestos independientemente de la instrumentación utilizada. Esto ha posibilitado la creación de librerías con los espectros de masas característicos para multitud sustancias, que pueden ser utilizados en el screening sistemático [2]. Sin embargo, el principal inconveniente de la cromatografía gaseosa (GC) es la dificultad en el análisis de determinados compuestos, como sustancias poco volátiles, polares o termolábiles, haciéndose necesaria la utilización de laboriosos procedimientos de derivatización.

Esta limitación de la cromatografía gaseosa propició la investigación sobre las posibilidades que podría ofrecer el acoplamiento de la cromatografía líquida (LC) a la espectrometría de masas (MS). La combinación de LC y MS permitiría aunar las ventajas de esta versátil técnica de separación con la gran sensibilidad y capacidad identificativa del MS [3].

## **Dificultades**

El problema fundamental que surgió en el acoplamiento LC y MS fue la transferencia de las moléculas disueltas en la fase móvil (líquido) hacia la región de alto vacío donde se produce la separación de los iones y su detección en el MS (gas).

Las principales incompatibilidades que se encontraron entre ambos sistemas fueron [3]:

- 1- Evaporación de los flujos típicamente empleados en LC (1mL/min) antes de su introducción en la región de alto vacío del MS. Para aumentar la detectabilidad del analito debería introducirse la mayor cantidad posible de efluente de la columna o conseguir el enriquecimiento de analito mediante la evaporación del disolvente de la fase móvil antes de su introducción en el MS.
- 2- El uso frecuente de aditivos no volátiles en la composición de la fase móvil. El sistema de vacío de MS no permite la introducción de grandes cantidades de material no volátil, como tampón fosfato o agentes de par iónico.
- 3- Ionización de compuestos termolábiles o no volátiles. Los métodos tradicionales de ionización, impacto electrónico (EI) e ionización química (CI) requieren que la muestra se encuentre en estado gaseoso.

La investigación en el acoplamiento de LC y MS se centró en la búsqueda de interfases con las que superar estos obstáculos. Idealmente, toda interfase debería poseer la capacidad de transformar el efluente de la columna en gas, provocar la ionización de los compuestos y eliminar grandes cantidades de la fase móvil líquida para mantener el vacío necesario para el análisis de masas.

## **Introducción de las interfases**

La primera solución para solventar la dificultad que suponía el acoplamiento de LC y MS fue publicada por Arpino y col. en 1974 [4]. Desde entonces, se han descrito en la literatura más de 25 interfaces distintas [5], de



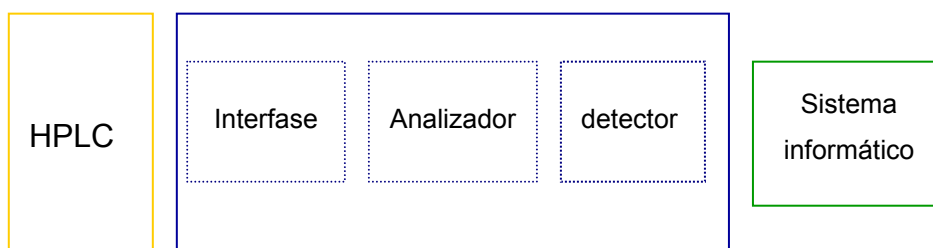
las que sólo unas pocas han tenido aplicación práctica y llegaron a ser comercializadas [1]: moving belt (MB), direct liquid introduction (DLI), thermospray (TSP), fast atom bombardement (FAB) y particle beam (PB). Sin embargo, fue la introducción de las interfaces de ionización a presión atmosférica (API) lo que dio lugar a la enorme expansión experimentada por LC-MS en las últimas dos décadas, de forma que actualmente las anteriores técnicas han quedado prácticamente obsoletas.

Así, inicialmente considerada una “hiphenated technique”, haciendo referencia a dos técnicas cuya combinación se encontraba en un fase de experimentación, hoy en día el increíble aumento en las aplicaciones de esta técnica en los últimos años demuestra el importante grado de madurez alcanzado en la actualidad.

## 4.2. COMPONENTES DE UN SISTEMA API-MS

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es una técnica de separación que ha sido ampliamente utilizada mediante su combinación con distintas técnicas de detección (UV, DAD, fluorescencia) desde su introducción en 1969, y hoy en día su utilidad está bien documentada. El desarrollo de sistemas que permitiesen el acoplamiento entre LC y MS es lo que ha dado lugar a la gran expansión experimentada por esta técnica analítica en las últimas décadas y, por ello, en esta sección serán estas innovaciones las que se explicarán con más detenimiento.

En un equipo de LC-API-MS pueden distinguirse los siguientes componentes:



#### 4.2.1. Interfases de ionización a presión atmosférica (API)

El imparable crecimiento de las aplicaciones de LC-MS en los últimos años se debe principalmente a la comercialización de las interfases API (siglas procedentes del inglés *atmospheric pressure ionization*). Previamente se comercializaron otras interfases que dieron lugar a interesantes aplicaciones (alguna de ellas, como TS, PB o CF-FAB, continúan utilizándose en la actualidad de forma muy restringida). Sin embargo, éstas presentan una serie de limitaciones relacionadas fundamentalmente con la falta de universalidad y su baja sensibilidad y robustez.

Las principales ventajas de API se resumen en cuatro hechos principales:

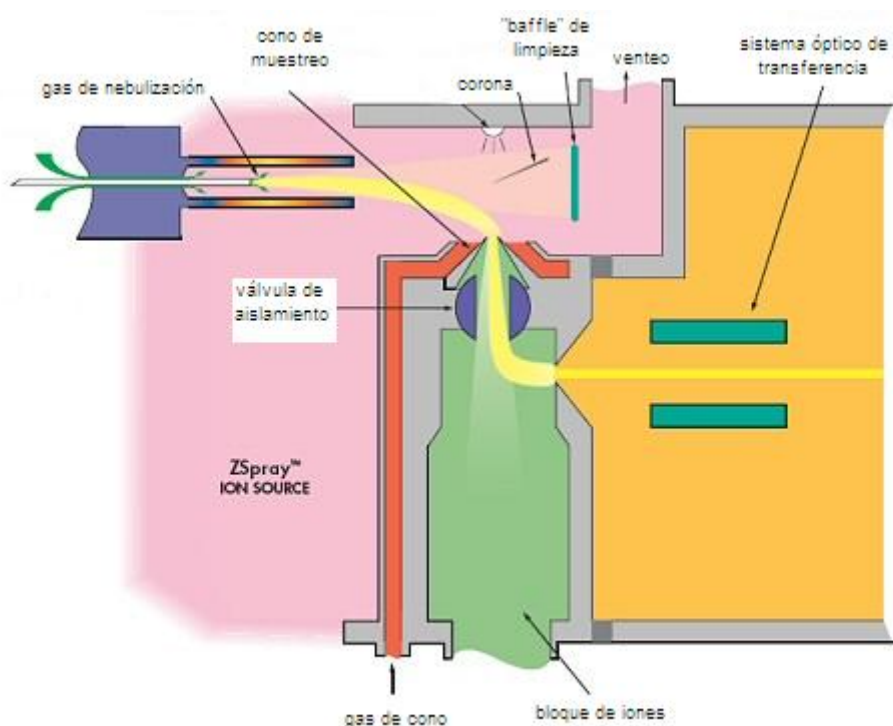
- Permite la utilización de los volúmenes de líquido empleados normalmente en LC.
- Es adecuado para el análisis de compuestos no volátiles, polares y termolábiles, generalmente analizados por LC.
- Es una técnica muy sensible, permitiendo llegar a límites de detección similares o incluso mejores que los obtenidos con GC-MS.
- Su robustez.

Las interfaces API constan de 4 elementos básicos:

- Un sistema de introducción del líquido procedente de la columna cromatográfica.
- Una región de ionización, donde se ionizan las moléculas a presión atmosférica.
- Una apertura para la entrada de los iones formados a la región de presión intermedia.
- Un sistema de transferencia de los iones hasta la región de alto vacío del analizador.

Una vez que se introduce la muestra en la región de ionización se producen, además de los iones de analito, iones de disolvente, especies neutras, así como clusters (agrupaciones moleculares). Para minimizar la

entrada de estas especies en el analizador, los iones se hacen pasar a la zona de presión intermedia través de un orificio de muestreo por medio de un campo eléctrico. Además, la utilización de una corriente de nitrógeno (“curtain gas” o gas de cono) alrededor del cono de muestreo, evita la entrada de moléculas neutras y favorece la evaporación de gotas de solvente (declustering), previniendo además el atasco de orificio y cono de muestreo. Una mejora en el diseño viene dada por la posición ortogonal del spray con respecto al cono de entrada (ej. Z-spray de Waters). Con esta disposición, las moléculas cargadas son extraídas perpendicularmente hacia el orificio gracias al gradiente eléctrico establecido, mientras que las moléculas neutras y las gotas de disolvente no evaporado siguen la dirección del spray, eliminándose como desecho.



**Figura 6.** Representación de una interfase API en la que se produce la extracción ortogonal de los iones desde la región a presión atmosférica hasta la región de alto vacío del analizador (ZSpray de Micromass, Waters Corp.).

Una vez que se han formado los iones a presión atmosférica, deben ser transportados al analizador. La movilización de los iones se consigue estableciendo un gradiente de vacío (por acción de una bomba rotatoria y dos turbomoleculares) y de potencial eléctrico a través de diferentes sistemas ópticos con los que se enfocan a su paso por las distintas cámaras que deben atravesar hasta su llegada a la región de alto vacío del analizador. Este proceso de transferencia constituye una importante fuente de pérdida de iones y, por tanto, sensibilidad. Por ello, los distintos fabricantes han introducido cambios en el diseño de los equipos con dos finalidades: enriquecer los iones de analito que entran en la región de presión intermedia, y favorecer su transmisión al analizador.

En interfases API se produce una ionización suave, donde las especies predominantes serán las moléculas protonadas o desprotonadas  $[M+H]^+$  o  $[M-H]^-$  (ion quasi- o pseudo-molecular), según se trabaje en modo positivo o negativo, respectivamente. Esto hace que la información estructural suministrada sea limitada. Sin embargo, se puede inducir la fragmentación en la región de presión intermedia situada entre la fuente y el analizador mediante la aplicación de un voltaje que provoca la aceleración de los iones y su colisión con moléculas residuales de disolvente o de gas nebulizador. Este fenómeno, conocido con el nombre de colisión inducida en la fuente (CID, *collision-induced dissociation*), permite la utilización de los fragmentos obtenidos para aumentar la especificidad de la técnica. Además, la aplicación de este voltaje favorece la destrucción de posibles clusters.

Las interfases API utilizadas mayoritariamente son la interfase de ionización química a presión atmosférica (APCI) y la interfase de electrospray (ESI). Recientemente, se ha introducido la denominada fotoionización a presión atmosférica (APPI), que permite la ionización de compuestos muy apolares que se ionizan de forma ineficiente con las otras dos técnicas, presentándose como alternativa a ESI y APCI en situaciones concretas. Sin embargo, APPI todavía es una técnica poco explorada, y las aplicaciones descritas en la literatura en las que se utiliza esta técnica son limitadas.

## ♦ Interfase de electropray (ESI)

El uso de electropray como interfase de acoplamiento al espectrómetro de masas fue descrito por primera vez por Dole y col. entre finales de los sesenta y principios de los setenta [6,7]. Estos estudios fueron continuados por Yamashita y Fenn [8,9], culminando con la introducción de esta interfase en un equipo LC-MS por Whitehouse y col. [10] en 1985, utilizando flujos del orden de  $\mu\text{L}/\text{min}$ . La idea de Bruins y sus colaboradores de incorporar una corriente de gas para ayudar en la formación del spray (electrospray neumáticamente asistido), denominado ionspray [11], supuso un gran avance, ya que permitió la introducción de flujos mayores, del orden de  $200\mu\text{L}/\text{min}$ .

### Principio de ESI

La evaporación e ionización del analito a presión atmosférica se producen simultáneamente. La explicación de estos procesos por separado pretende únicamente permitir un orden en su descripción.

La muestra líquida se introduce a través de un capilar al que se aplica un voltaje elevado (generalmente, 2-5 kV). Bajo la influencia del campo eléctrico creado, los iones de la misma polaridad migran hacia el extremo del capilar, donde el líquido comienza a formar un cono (cono de Taylor) a partir del que se generan pequeñas gotas altamente cargadas. Para permitir la formación de un spray estable a flujos de  $50\text{-}200\mu\text{L}/\text{min}$ , la nebulización es asistida con una corriente coaxial de nitrógeno (gas de nebulización). A medida que avanzan a lo largo de la fuente, las gotas se van haciendo más pequeñas debido a la evaporación del disolvente, aumentando el número de cargas por superficie. Cuando las fuerzas Coulombicas debidas al exceso de cargas superan las fuerzas de cohesión debido a la tensión superficial (límite de Rayleigh), se produce la fisión de las gotas. Este proceso de inestabilidad se repite sucesivamente, llevando a la formación de gotas muy pequeñas ( $3\text{-}10\text{nm}$ ) altamente cargadas.

En cuanto al proceso de *ionización del analito en fase gaseosa*, tanto el modelo propuesto por el grupo de Dole (modelo de cargas residuales) [12,13]

como el propuesto por Iribarne y Thomson (modelo de evaporación de iones) [14,15] permiten explicar el proceso, si bien la segunda teoría es la más aceptada por la comunidad científica. En el primer caso se propone que la formación de los iones en fase gaseosa se produce por desorción de las moléculas de analito cargadas desde la superficie de la gota, mientras que en el segundo modelo se cree que es debido a la emisión directa de los iones de analito preformado desde la gota. Un modelo alternativo, descrito por Siu y col., propone que los iones en fase gaseosa se producen directamente en la punta del capilar, sin embargo esta teoría ha sido más discutida.

Además de este mecanismo principal de ionización, pueden producirse interacciones entre iones de solvente y de analito en fase gaseosa que afecten a la respuesta obtenida [16,17,18]. Estas reacciones se producen generalmente mediante transferencia de protones, y ocurren cuando se invierte el orden de basicidad en el estado gaseoso con respecto al que existía en el líquido [17]. Así, puede producirse la ionización de moléculas que se han evaporado en estado neutro o, incluso, puede producirse la supresión de la respuesta en presencia de un disolvente que tenga mayor basicidad que la del analito en fase gaseosa.

La interfase ESI puede considerarse una celda electrolítica [19,20]. La separación electroforética de las cargas da lugar a un exceso de cargas en la punta del capilar. El balance de cargas se obtiene mediante la oxidación electroquímica en la punta del capilar (en modo positivo) y la reducción en el electrodo opuesto (cono de muestreo). La oxidación electroquímica puede generar en algunos casos la ionización de analitos neutros, comportándose en este caso como un verdadero mecanismo de ionización, más que mecanismo de transporte de iones en fase gaseosa.

En ESI se puede trabajar en modo positivo o negativo (ESI+ ó ESI-), en función de la polaridad del voltaje aplicado en el capilar. Además del ion pseudomolecular, la presencia de ciertas especies iónicas procedentes del material de laboratorio (generalmente, cationes Na) o del solvente puede dar lugar a la formación de aductos. Así, al trabajar en modo positivo es frecuente encontrarse aductos de Na, K o aductos del disolvente, y en modo negativo,

aductos formiato o acetato. La formación de estos aductos debe evitarse en el análisis cuantitativo, ya que son uniones difíciles de romper y la señal producida es poco reproducible [21,22].

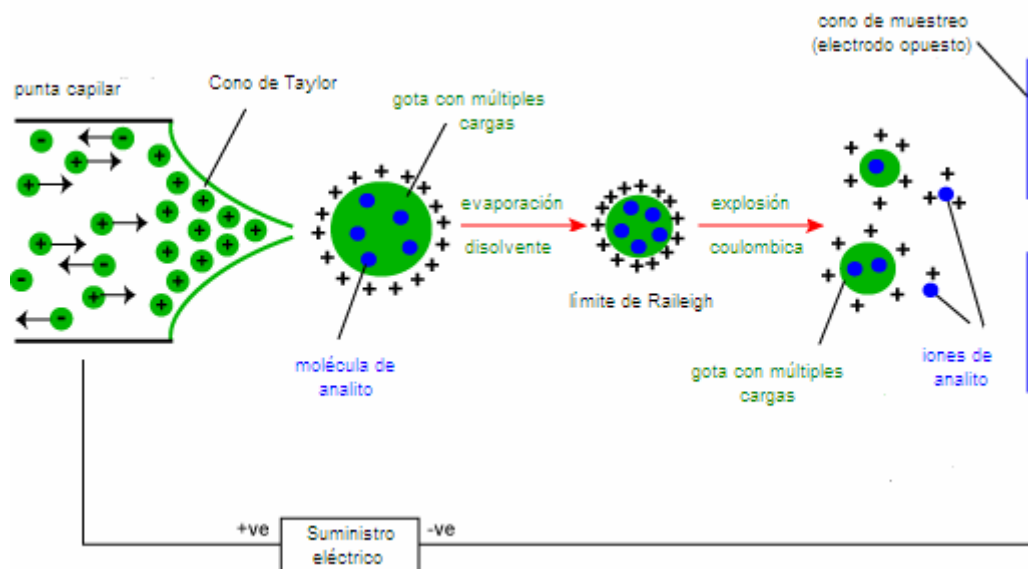


Figura 7. Proceso de evaporación/ionización mediante ESI

La respuesta originada en ESI depende en gran medida de la naturaleza del compuesto a analizar. ESI permite el análisis de compuestos desde moderadamente apolares a polares. Una de sus principales aplicaciones es el análisis de biomoléculas polares, de alto peso molecular y termolábiles, como péptidos y proteínas, difícilmente analizables con otras técnicas. Estos compuestos poseen varios grupos básicos o ácidos, pudiendo adquirir múltiples cargas en el proceso de ionización por electro spray. Teniendo en cuenta que la detección en espectrometría de masas se basa en la relación  $m/z$ , este hecho posibilita el análisis de moléculas de alto peso molecular que, de otra forma, se encontrarían fuera del rango de masas del analizador.

La composición de la fase móvil tiene también importante influencia en la señal obtenida. En ESI, el pH de la fase móvil debe favorecer la ionización del analito. Para ello, normalmente se añade ácido fórmico o acético, o un tampón como formiato o acetato amónico. Es importante que el tampón utilizado a estos efectos sea volátil, para evitar su depósito en la fuente durante la

evaporación/ionización. Además, su concentración debe mantenerse lo más baja posible, ya que sino podría competir con el analito en la ionización, y reducir su respuesta [23].

A diferencia de lo que ocurre con otras interfases LC-MS, la respuesta originada en ESI es concentración-dependiente, de forma que la sensibilidad está más relacionada con la concentración de analito que con la cantidad por unidad de tiempo (velocidad de flujo). Esto ha permitido la miniaturización de la técnica sin pérdida de sensibilidad, llevando al desarrollo de las denominadas interfases nano-ESI. Se cree que el mayor rendimiento obtenido a menor flujo se debe fundamentalmente a que el tamaño de las gotas formadas en el electrospray es menor, llevando a una evaporación más rápida de las mismas [24]; además, el capilar puede situarse más cerca del orificio de muestreo, con lo que entrará mayor cantidad de analito hacia el masas. La principal aplicación de nano-ESI es la reducción de la muestra consumida en el análisis de proteínas mediante electrospray MS [25].

#### ♦ **Interfase de ionización química a presión atmosférica (APCI)**

A principios de la década de los setenta, Horning y col. introducen las primeras propuestas en el acoplamiento de LC-MS mediante APCI [26]. A finales de los setenta y principios de los ochenta, los estudios de Kambara y Sakairi [27,28,29] dieron lugar a la comercialización de un equipo LC-APCI-MS que fue ampliamente utilizado en Japón, aunque no disfrutó de un gran reconocimiento fuera de sus fronteras. Paralelamente, el grupo de Henion demuestra de nuevo la utilidad de APCI, utilizando una interfase direct liquid introduction (DLI) en combinación con una cámara caliente de desolvatación [30], posteriormente mejorada por Covey y col. [12] con la incorporación de nitrógeno para asistir la nebulización (make-up gas).

#### Principio de APCI

En APCI, a diferencia de lo que ocurre en ESI, el proceso de evaporación y la ionización constituyen dos etapas distintas.



El efluente que procede de la columna cromatográfica se introduce en la región de ionización a través de un capilar sometido a 400-500°C. Las altas temperaturas aplicadas y la acción de una corriente coaxial de nitrógeno provocan la nebulización y rápida evaporación del disolvente. A la salida del capilar, un electrodo produce una descarga en corona (2-5kV) que origina la ionización de las moléculas de disolvente, nitrógeno y oxígeno en fase gaseosa. El exceso de iones a presión atmosférica actúa como agente reactivo en la ionización química del analito, que se produce por la captación o cesión de un protón, según se trabaje en modo positivo o negativo, respectivamente, cuando la afinidad del analito con respecto a la de los compuestos de la fase móvil favorezca el proceso. También puede producirse la ionización por transferencia de cargas.

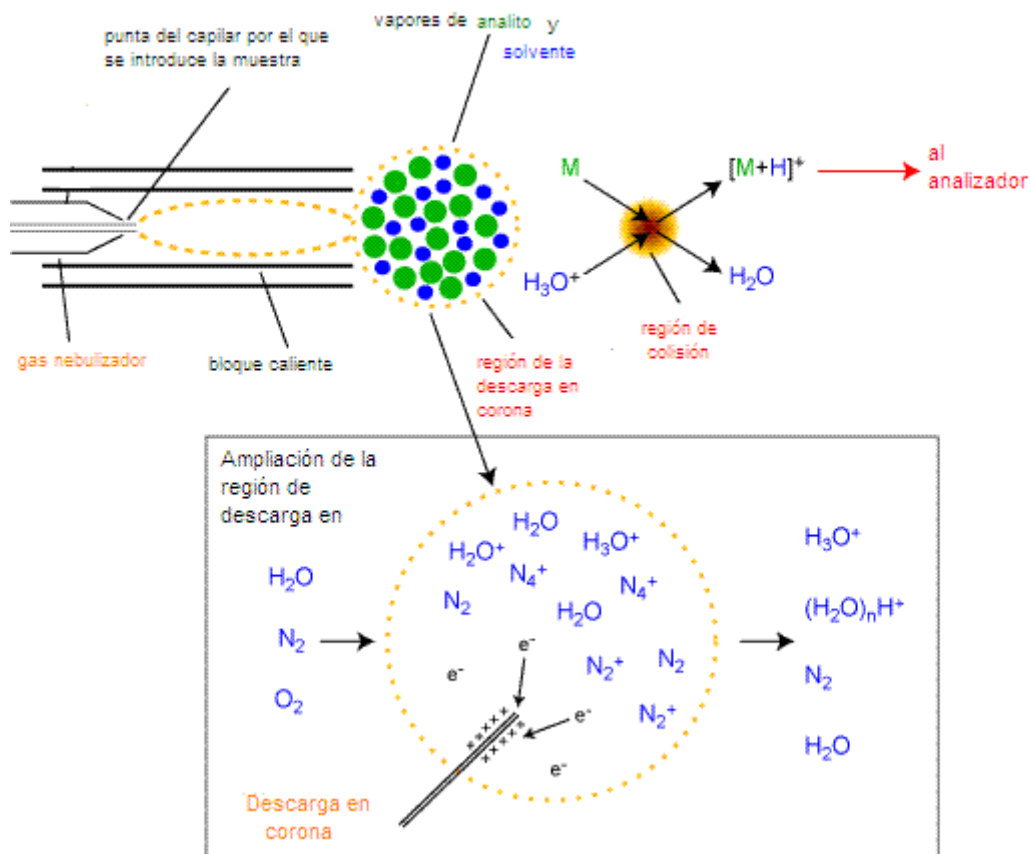


Figura 8. Proceso de evaporación e ionización mediante APCI

En cuanto a la naturaleza de los compuestos analizados, APCI es más adecuada para moléculas de baja polaridad (más que ESI) y peso molecular (generalmente inferior a 1000amu), ya que los analitos deben volatilizarse para que se produzca la ionización en la fase gaseosa. A pesar de que la presencia del elevado flujo de nitrógeno minimiza la posibilidad de degradación térmica por las altas temperaturas en el capilar, debe tenerse precaución en el análisis de compuestos termolábiles [21].

A diferencia de ESI, el pH de la fase móvil debe permitir el estado neutro de los analitos, de forma que se favorezca su volatilización [21]. APCI permite utilizar flujos mayores que los empleados en ESI (del orden de 1mL/min). Esta interfase es menos susceptible al efecto matriz [31,32] y, en caso de que se produzca, suele dar lugar al aumento de la señal [22].

Tanto ESI como APCI son las interfases que se han usado en la gran mayoría de las aplicaciones de LC-MS, si bien la utilización de la primera es mucho más frecuente [33]. En general, la utilización de una u otra interfase se basa principalmente en el compuesto y condiciones experimentales empleadas. En cualquier caso, no hay reglas en cuanto a la selección, excepto para péptidos y proteínas, para las que la ESI da mejores resultados. APCI y ESI son métodos complementarios, ampliando la cobertura de compuestos a analizar.

#### **4.2.2. Analizadores de masas**

Una vez formados, los iones son transferidos al analizador, donde se lleva a cabo su separación en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ).

Existe diferentes tipos de analizadores: cuadrupolos, trampa de iones, tiempo de vuelo, sectores magnéticos, transformador de Fourier-ICR. Una característica común a todos ellos es la necesidad de trabajar en condiciones de muy baja presión ( $<10^{-4}$  Torr), y la separación de los iones se realiza en fase gaseosa en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ). Sin embargo, difieren en los medios empleados para llevar a cabo la separación, haciendo variar la

sensibilidad y la información suministrada por cada uno de ellos en cuanto a la resolución de masas, la precisión, el rango de masas y la velocidad de scan.

- La *resolución* es una medida de la capacidad de un analizador para separar dos iones adyacentes.
- La *precisión* es la capacidad para determinar la masa de un ion de forma exacta, en función de la masa teórica calculada a partir de su composición elemental. Este parámetro está íntimamente relacionado con la capacidad de resolución del analizador.
- El *rango de masas* es el intervalo de  $m/z$  que el analizador es capaz de transmitir al detector, y viene determinado por su configuración.
- La *velocidad de scan* viene dada por el número de veces que puede adquirir el espectro de un ion por unidad de tiempo. Este parámetro va a afectar a la cantidad de puntos de adquisición para un pico cromatográfico de una anchura determinada, es decir, a la calidad en la definición del pico.

De esta forma, la selección de un tipo de analizador u otro dependerá de los requerimientos en cuanto a los parámetros anteriormente citados para la aplicación a la que pretende destinarse, así como del presupuesto disponible.

#### ♦ Cuadrupolo

Es el analizador más versátil y el más utilizado debido a su facilidad de uso y su precio relativamente económico, unido al hecho de que ofrece un buen compromiso entre el rango de masas, resolución y precisión.

Consiste en cuatro rodillos circulares (o hiperbólicos) dispuestos en paralelo dos a dos en torno a un eje central. A cada una de los rodillos se le aplica una corriente continua (DC), de forma que los rodillos opuestos presenten una misma polaridad: un par con voltaje positivo, y el otro, con voltaje negativo.

Mediante la aplicación de dos campos eléctricos, DC y un potencial de radiofrecuencia (RF), los iones que entran en el cuadrupolo comienzan a

oscilar en un plano perpendicular a la longitud de los rodillos, de forma que para una combinación de DC y RF dada, solo los iones con una determinada relación  $m/z$  presentarán una trayectoria estable, y podrán atravesar el cuadrupolo sin chocar contra sus paredes hasta llegar al detector. Creando una rampa de combinaciones de estos voltajes DC y RF (manteniendo DC/RF constante), se consigue que un rango determinado de masas ( $m/z$ ) llegue hasta el detector.

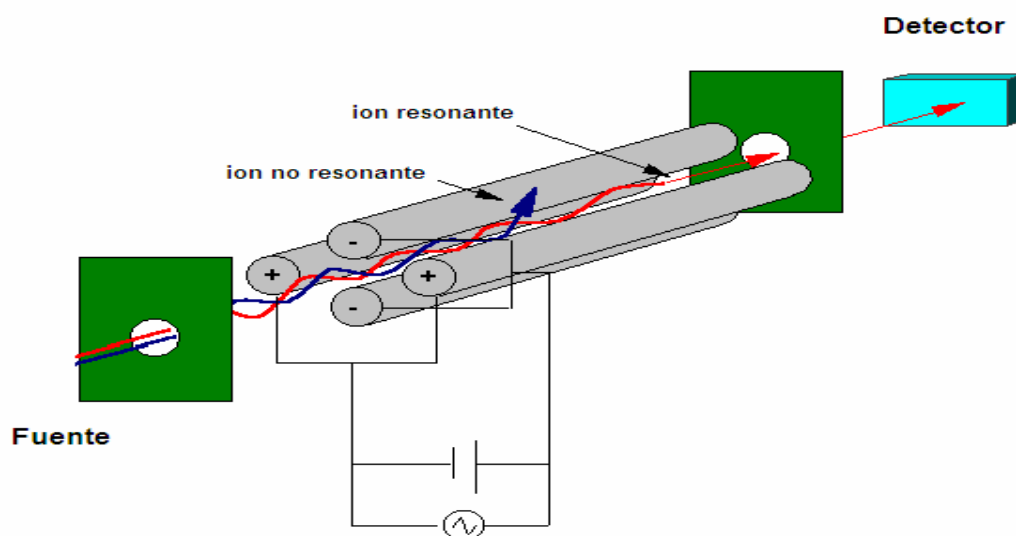


Figura 9. Dibujo esquemático del principio de funcionamiento de un cuadrupolo.

Cuando se hace un barrido comprendiendo un rango de masas, se dice que se trabaja en modo scan. La máxima sensibilidad y precisión se obtiene trabajando en modo SIM (*selected ion monitoring*), que consiste en la selección de una (o varias) combinación concreta de DC y RF para la que sólo los iones con unos determinados valores de  $m/z$  atraviesen el cuadrupolo. La posibilidad de trabajar en este modo selectivo es la razón de que sea uno de los analizadores más utilizado con fines cuantitativos. En cuadrupolo se trabaja generalmente a unit-mass-resolution, es decir, es capaz de diferenciar entre dos masas que difieren al menos en 1Da.

Además de utilizarse en el análisis de masas, en muchos equipos se utilizan cuadrupolos (hexapolos, octopolos) al que sólo se aplica el voltaje RF para focalizar los iones en su transferencia desde las regiones de presión decreciente hasta analizador.

#### ♦ **Trampa de iones (IT)**

Consiste en un electrodo circular sometido a un potencial RF, por encima y debajo del cual se sitúan 2 electrodos hemisféricos perforados, por los que los iones entran y salen de la trampa (end-caps). Los iones son transmitidos desde la fuente de ionización por pulsos y atrapados en la trampa donde, por acción del RF, adquieren una frecuencia de oscilación que dependerá de su relación  $m/z$ . En el interior de la trampa, la presencia de un gas (generalmente He) hace que los iones se sitúen en el centro, lo que evita la pérdida de iones por colisión con los electrodos, y mejora la resolución, ya que limita la distribución espacial de los iones. Para hacer un barrido de un rango de masas, se modifica la amplitud del voltaje RF.

#### ♦ **Tiempo de vuelo (TOF)**

Los iones son acelerados con un voltaje hacia un “tubo de vuelo”. La separación de los iones se basa en el tiempo necesario para recorrer la longitud del tubo, que dependerá de su relación  $m/z$ . Los TOF lineales no permitían obtener una buena resolución debido principalmente a la energía de dispersión de los iones cuando abandonan la fuente. Este efecto se corrigió mediante una disposición ortogonal del tubo, y la introducción en el punto intermedio de una serie de lentes sometidas a diferentes voltajes (“reflectrón”), que da lugar a una compensación de la dispersión inicial. De esta manera, este analizador presenta excelente resolución. Además, teóricamente no tiene límite en el rango de masas a analizar. Este tipo de analizador sólo puede operar en modo scan.

#### ♦ **Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR)**

Es un analizador de tipo “trampa”, que consiste en una celda cúbica formada por dos platos paralelos de entrada y salida, dos de excitación y dos

receptores. La celda está sometida a un elevado campo magnético que provoca un movimiento circular de los iones perpendicular a la dirección de dicho campo magnético (movimiento ciclotron), cuyo radio es inversamente proporcional a su  $m/z$ . Los iones en el interior de la celda son excitados mediante un pulso de radiofrecuencia, que origina un aumento en el radio del círculo descrito. Cuando los iones excitados pasan cerca de los platos receptores generan una corriente eléctrica (llamada "image" current) que es detectada. A diferencia del resto de los analizadores, la detección de los iones en FT-ICR no es destructiva, por lo que pueden ser medidos repetidamente, con el consiguiente aumento de sensibilidad

#### ♦ Sector magnético

Los iones son acelerados con un voltaje  $V$  hacia un campo magnético  $B$ , bajo cuya influencia adquieren un movimiento circular. El radio de curvatura descrita por un ion viene determinado por  $B$ ,  $V$  y su relación  $m/z$ . A un valor fijo de  $B$  (y  $V$ ), los iones de una determinada  $m/z$  se detectan por un detector colocado en una posición fija. Haciendo una rampa mediante la variación de  $B$  ( $V$  constante), los iones de distinta  $m/z$  pueden ser detectados.

Los procesos de ionización dan lugar a una dispersión en la energía cinética de los iones en su salida de la fuente. Por ello, para mejorar la resolución de estos analizadores, suele incorporarse entre la fuente y el sector magnético un analizador electrostático que focaliza los iones a su salida de la fuente. Estos analizadores son capaces de detectar los iones con excelente resolución y sensibilidad. Además, para reducir la energía de dispersión de los iones y provocar su aceleración hacia el analizador, se deben emplear voltajes muy elevados en la fuente (generalmente, 5-8kV), lo que permite llevar a cabo la fragmentación de los iones en las regiones libres de campo (entre la fuente y el primer sector, o entre los dos sectores). Sin embargo, este voltaje es demasiado elevado para trabajar a presión atmosférica y, por ello, estos analizadores no han desempeñado un papel importante en el desarrollo de LC-MS.

### ♦ Espectrometría de masas en tandem (MS/MS)

En un LC-MS simple la separación de los iones se realiza empleando un solo analizador. Como se explico anteriormente, las interfaces API producen una ionización suave, por lo que la especie predominante es el ion pseudomolecular, sin apenas producir fragmentación. Como se comentó anteriormente, una posibilidad en un LC-MS simple para obtener información estructural y/o mejorar selectividad es inducir la fragmentación en la región de presión intermedia mediante CID.

Una alternativa a un LC-MS simple consiste en la combinación en un mismo equipo de dos analizadores, en lo que se denomina LC-MS/MS, o LC-MS en tandem. Entre ambos analizadores se sitúa una celda de colisión, que consiste en un cuadrupolo al que sólo se aplica potencial RF (permitiendo el paso de todos los iones y su focalización al segundo analizador), con un gas inerte en su interior (generalmente, argón o helio). Cuando se aplica un potencial a la celda de colisión, se produce la aceleración de los iones, que entrarán en colisión con las moléculas del gas, permitiendo su fragmentación controlada.

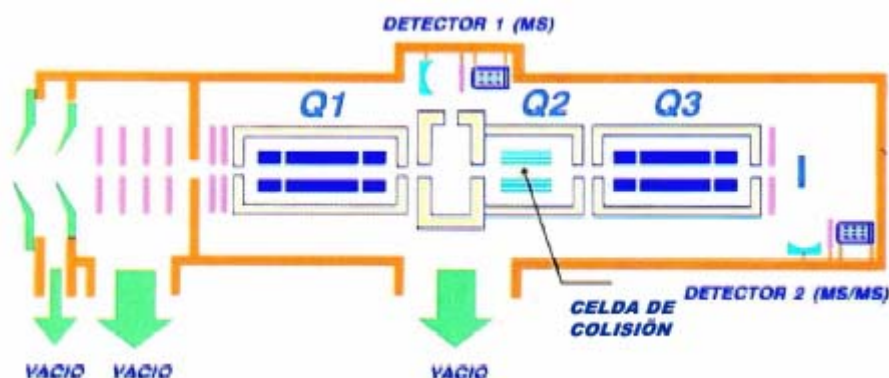


Figura. 10. Esquema de un espectrómetro de masas en tandem con triple cuadrupolo.

La ventaja de un espectrómetro de masas en tandem con respecto a la situación anterior, es que permite seleccionar un ion pseudomolecular (ion padre) en el primer analizador (M1), provocar su fragmentación en la celda de colisión, y seleccionar el fragmento originado (ion hijo) en el segundo analizador (M2). Esta posibilidad se traduce en la disminución del ruido de fondo con respecto al que se produce en un LC-MS simple y, por tanto, en un aumento de la sensibilidad (s), y en un aumento de la selectividad, ya que el fragmento monitorizado en el M2 procederá necesariamente del ion padre seleccionado en el primer M1.

Además de esta ventaja, en un MS/MS cada uno de los analizadores puede operar en modo scan o SIM dando lugar, en su combinación, a distintos modos de trabajo, que permite adquirir información útil que no es posible de obtener empleando un LC-MS simple. Los distintos modos de trabajo en un MS/MS son los siguientes:

- Multiple Reaction Monitoring (MRM): los dos analizadores trabajan en modo SIM. En M1 se selecciona una determinada  $m/z$ , se provoca su fragmentación en la celda de colisión, y un determinado ion hijo se monitoriza en M2. A cada combinación ion padre/ion hijo concreto se le denomina transición. En un método MRM se pueden monitorizar varias transiciones. Este modo se emplea para realizar análisis cuantitativos, aportando la máxima sensibilidad y selectividad en la determinación de compuestos conocidos.
- Daughter ion scan (scan de iones hijo): en M1 se selecciona un  $m/z$  determinado (ion precursor), se fragmenta, y en M2 se hace un barrido de todos los fragmentos (iones hijo) originados. Se emplea para determinar los iones hijo que se utilizarán para crear las transiciones MRM, y para optimizar el voltaje en la celda de colisión con la que obtener la mejor señal para un determinado ion hijo.
- Precursor ion scan (scan de iones precursores): M1 hace un barrido de todas las  $m/z$ , se provoca la fragmentación, y se



selecciona sólo un determinado ion hijo en M2. Permite hacer un barrido de compuestos que tienen un fragmento común, por ejemplo, los metabolitos de un determinado compuesto.

- Neutral loss scan (scan de fragmento neutro): ambos analizadores trabajan en scan de forma sincronizada, de forma que cuando M1 transmite un determinado ion padre, M2 “busca” si se ha perdido un fragmento neutro concreto. El espectro muestra todos los iones padres que han perdido ese determinado fragmento (compuestos que siguen un mismo patrón de fragmentación). También es útil en estudios metabólicos.

Tradicionalmente, los 2 analizadores empleados en MS/MS han sido los cuadrupolos. Sin embargo, también pueden combinarse otros analizadores, o utilizarse combinaciones híbridas (QTOF, QIT, IT-FTICR). Además, algunos analizadores (IT o FT-ICR) permiten realizar análisis en MS/MS con un solo analizador, seleccionando una determinada  $m/z$  y expulsando al resto de los iones del analizador, y provocando, posteriormente, su fragmentación y transmisión del ion hijo al detector (es lo que se denomina “MS/MS en tiempo”, a diferencia de “MSMS en espacio”, que hace referencia a la utilización de dos analizadores). “MS/MS en tiempo” no permite trabajar en los modos de *neutral loss scan* ni *precursor ion scan*.

#### 4.2.3. Detectores

Para poder ser detectados, los iones son transformados después de su separación en una señal eléctrica medible que, posteriormente, es digitalizada.

##### ♦ Multiplicador de electrones

Es el sistema de detección empleado con más frecuencia. Los iones son transformados en electrones por un electrodo dínodo, y se recoge la señal eléctrica producida. Esta señal puede amplificarse mediante la utilización de varios dínodos sometidos a un potencial creciente, de forma que los electrones producidos al chocar con el primer dínodo son multiplicados sucesivamente por

los siguientes. También puede emplearse un dínodo con forma de cuerno, en el cual la amplificación se produce por los sucesivos choques contra las paredes. En ambos caso, la cascada de electrones multiplica la señal por  $10^6$ - $10^7$ .

#### ◆ Fotomultiplicador

En este caso, los electrones producidos por el dínodo se transforman en fotones mediante una pantalla de fósforo. Estos fotones se transforman en electrones al chocar con un fotocátodo a la entrada del fotomultiplicador, y la señal es amplificada en su interior. Su ventaja es que, al estar sellado en cristal y sometido a vacío, se previene su contaminación y mantienen un buen funcionamiento durante más tiempo.

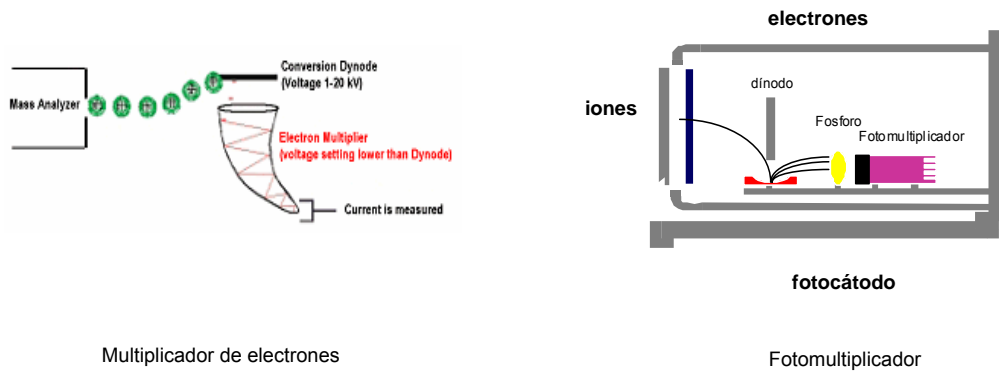


Figura 11. Dibujo representativo del funcionamiento del multiplicador de electrones y del fotomultiplicador.

### 4.3- APLICACIONES DE LC-API-MS EN EL CAMPO DE LA TOXICOLOGÍA

#### 4.3.1. LC-API-MS como técnica de confirmación y cuantificación

Los resultados positivos obtenidos tras el screening toxicológico general deben ser, en algunas circunstancias, confirmados y cuantificados con una técnica sensible y con el mayor grado de fiabilidad [34]. Tradicionalmente, la técnica de referencia utilizada con este fin ha sido GC-MS, debido al alto poder de resolución de la GC, unido a la gran sensibilidad y especificidad aportada

por la espectrometría de masas [35]. Sin embargo, esta técnica presenta dificultad en el análisis de sustancias con alto peso molecular y no volátiles, y la necesidad de llevar a cabo procedimientos de derivatización específicos en el caso de ciertas de sustancias polares y termolábiles.

El uso común de LC-MS(MS) por la industria farmacéutica, así como el extenso número de publicaciones en las que se utilizaba esta técnica en el análisis de moléculas relativamente pequeñas, tanto para su determinación cualitativa como cuantitativa desde años atrás, llevó a pesar en la gran herramienta analítica que podría constituir en el campo de la toxicología [33].

En los laboratorios de toxicología su utilización, en un principio, se centró fundamentalmente en el análisis de compuestos que no podían ser determinados mediante GC-MS [33]. En las dos últimas décadas, la constante introducción de mejoras en la instrumentación ha dado lugar a la disponibilidad de equipos LC-API-MS robustos y de menor coste. Este hecho ha dado lugar a la expansión de las aplicaciones a las que se destina actualmente esta técnica en el campo de la toxicología.

Actualmente, se puede encontrar en la bibliografía aplicaciones con LC-MS para la determinación de las principales sustancias de relevancia desde el punto de vista toxicológico en diferentes fluidos biológicos o tejidos. Además, permite obtener la misma sensibilidad, e incluso mejor, que GC-MS, con la ventaja de requerir una preparación de la muestra más simple en el análisis de ciertos compuestos. Estas aplicaciones en el campo de la toxicología han sido objeto de revisiones publicadas por diferentes autores [33,34,35,37,38].

Se han descrito métodos analíticos para la determinación de prácticamente todo tipo de sustancias de abuso y sus metabolitos, incluyendo opiáceos y opioides, cocaína, anfetamina y derivados, cannabiniodes y LSD. También se ha utilizado esta técnica en la determinación de fármacos de interés toxicológico por su frecuente implicación en suicidios (o tentativas), como benzodiazepinas y antidepresivos, así como fármacos que requieren la monitorización de sus niveles plasmáticos debido a su potencial toxicidad y estrecho margen terapéutico (glicósidos cardiotóxicos, antipsicóticos como litio,

antidepresivos tricíclicos), y agentes dopantes. También se han desarrollado métodos analíticos para llevar a cabo estudios farmacocinéticos y metabólicos.

La principal ventaja de LC-MS es la posibilidad de determinar sustancias termolábiles (ej. LSD, metabolitos de la cocaína como el óxido de N-cocaína), así como el análisis directo de ciertos compuestos polares (ej. principales metabolitos de estas sustancias, anfetaminas) sin necesidad de llevar a cabo la derivatización y/o hidrólisis previa (glucurónidos), necesaria para poder ser determinados con GC-MS. De esta forma, LC-MS se presenta en estos casos como la alternativa de elección.

Otra importante aplicación de LC-MS(MS) es el análisis de muestras alternativas. Aunque plasma y orina son las muestras más frecuentes en el análisis toxicológico, en los últimos años ha aumentado el interés por el análisis de otras muestras biológicas como pelo, fluido oral, sudor, meconio, ya que son menos invasivas, su recolección es más sencilla y, como es supervisada, son más difíciles de adulterar [39,40]. Sin embargo, una de sus principales desventajas es que el volumen o cantidad de estas muestras suele ser limitado, siendo necesario disponer de técnicas de gran sensibilidad.

Estas matrices constituyen la alternativa de elección en ciertos casos concretos. Aplicaciones de especial interés son las determinaciones en pelo en casos sumisión química [41,42,43], agresiones (violaciones, robos,...) en las que estuvo implicado el uso de algún tóxico, ya que son situaciones difíciles de probar debido a las bajas cantidades de droga utilizadas en estos casos; además, las víctimas generalmente informan del ataque varios días después y, para entonces, la droga ya ha sido eliminada del organismo. Sin embargo, estas sustancias y sus metabolitos pueden detectarse en el pelo, ya que permanecen en él inalteradas. También se han descrito aplicaciones en fluido oral [44,45], de gran utilidad para detectar el consumo de drogas en el lugar de trabajo, en prisiones y en el ámbito del tráfico rodado. En este sentido, el uso de esta matriz para detectar la conducción bajo la influencia de drogas ha sido una de los principales objetivos del proyecto europeo ROSITA (ROad Site Test Assesment), en el que nuestro grupo estuvo participando en representación española, llevando a cabo la confirmación de los resultados mediante esta

técnica [46,47]. El uso de LC-MS también ha probado su utilidad en el análisis de meconio [48,49], ya que este espécimen permite detectar el abuso de drogas durante el embarazo aproximadamente desde las últimas 20 semanas de gestación.

LC-MS ha permitido además la simplificación en la preparación de la muestra. Aún así, su tratamiento no se puede obviar totalmente debido a la posibilidad de que ciertas sustancias endógenas o exógenas presentes en ella den lugar a la supresión o aumento aleatorio de la señal (efecto matriz). Sin embargo, LC-MS ha contribuido de forma significativa a la automatización y a la reducción del tiempo de análisis (“high through-put”) gracias a la posibilidad de integrar procedimientos de tratamiento de la muestra “on-line”, como el uso de columnas de extracción con rellenos especiales (soportes monolíticos, large particle size, restricted access media) [50,51,52] e, incluso, sistemas completos de extracción en fase sólida [53,54,55].

#### **4.3.2. LC-API-MS como técnica de screening general**

GC-MS continúa siendo la técnica de referencia en el análisis toxicológico sistemático debido, fundamentalmente, a su gran sensibilidad y a la disponibilidad de extensas librerías con los espectros de masas estandarizados para una gran cantidad de compuestos, obtenidos mediante impacto electrónico [56]. Se dispone, incluso, de librerías especializadas en fármacos, tóxicos y metales.

El interés en la utilización de LC-MS(MS) es, como ya se comentó anteriormente, aumentar el rango de compuestos detectables por espectrometría de masas. El principal obstáculo de esta técnica en el análisis toxicológico sistemático es la dificultad en la elaboración de librerías de espectros estandarizados, ya que las interfases API no son compatibles con la reproducible técnica de IE. Además, producen una ionización suave, dando lugar, principalmente, a la formación del ion pseudomolecular. Aún así, es posible obtener mayor información estructural induciendo fragmentación en la región intermedia mediante CID en un masas simple, o en la celda de colisión

con un masas en tandem, confiriendo gran sensibilidad y especificidad si se trabaja en SIM o MRM.

Se han desarrollado métodos analíticos para hacer un *screening de sustancias sospechadas*, mediante la inclusión de un elevado número de compuestos, pero la necesidad de disminuir el tiempo de *scan* de cada sustancia (*dwell time*), hace que exista un límite en el número de compuestos a analizar [57]. También se ha descrito la utilización de un método en modo MRM para la monitorización de un gran número de compuestos, empleando lo que se conoce con el nombre de “survey scan” [58]. Cuando uno de los compuestos monitorizados alcanza un umbral establecido, es seleccionado automáticamente para llevar a cabo su fragmentación a diferentes voltajes. El principal inconveniente de esta técnica es la necesidad de establecer un umbral de detección, ya que el ruido de fondo en muestras reales es alto y muy variable.

Se han empleado varias técnicas para la elaboración de librerías con los espectros de los principales compuestos de interés toxicológico para la utilización de LC-MS en el *screening* general. Una de estas técnicas consiste en la obtención de información estructural mediante la inducción de la fragmentación (CID) a diferentes voltajes de cono, tanto en modo positivo como en negativo [59,60,61]. Otra alternativa que suministra mayor especificidad es la utilizada en un espectrómetro de masas en tandem por el grupo de Marquet [62] y el de Decaestecker [63], empleando una técnica denominada “adquisición dependiente de la información”. Consiste en la utilización del modo “survey scan”, haciendo inicialmente un full scan en M1.

A pesar de estas interesantes aproximaciones, el principal inconveniente en la expansión de las librerías de LC-MS para el análisis toxicológico sistemático es la importante variabilidad en los espectros obtenidos con distintos equipos. Así, a pesar de su gran utilidad como complemento de GC-MS, todavía se requiere un mayor grado de experimentación para llegar a ser considerada como técnica de referencia en el *screening* general.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] W.M.A. Niessen. Chapter 4: History of LC-MS, en: Liquid chromatography-mass spectrometry. Ed. Marcel Dekker AG, New York, 1999. 2ª edición.
- [2] M.J.Bogusz. Liquid chromatography-mass spectrometry as a routine method in forensic sciences: a proof of maturity. J. Chromatogr. B, 2000; 748: 3-19.
- [3] W.M.A. Niessen. Chapter 3: General instrumental considerations in LC-MS interfacing, en: Liquid chromatography-mass spectrometry. Ed. Marcel Dekker AG, New York, 1999. 2ª edición.
- [4] P. Arpino, M. A. Baldwin, McLafferty. Liquid chromatography-mass spectrometry II. Continuous monitoring. Biomed. Mass Spectrom., 1974; 1 (1): 80-82.
- [5] A.L. Burlingame, R.K. Boyd, S.J. Gaskell. Mass spectrometry. Anal. Chem., 1994; 66 (12): 634-683.
- [6] M. Dole, R.L. Hines, L.L. Mack, R.C. Mobley. Molecular beams of macroions. J. Chem. Phys., 1968; 49 (5): 2240-2249.
- [7] J. Gieniec, L.L. Mack, K. Nakamae, C. Gupta, V. Kumar. M. Dole. Electrospray mass spectrometry of macromolecules: application of an ion-drift spectrometer. Biom. Mass Spectrom., 1984; 11 (6): 259-268.
- [8] M. Yamashita, J.B. Fenn. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. J. Phys. Chem., 1984; 88 (20): 4451-4459.
- [9] M. Yamashita, J.B. Fenn. Negative ion production with the electrospray ion source. J. Phys. Chem., 1984; 88 (20): 4671-4675.
- [10] C.M. Whitehouse, R.N. Dreyer, M. Yamashita, J.B. Fenn. Electrospray interphase for liquid chromatographs and mass spectrometers. Anal. Chem., 1985; 57(3): 675-679.

- [11] A.P. Bruins, T.R. Covey, J.D. Henion. Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 1987; 59 (22): 2642-2646.
- [12] T.R. Covey, E.D. Lee, J.D. Henion. High-speed liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of drugs in biological samples. *Anal. Chem.*, 1986; 58: 2453-2460.
- [13] M. Dole, R.L. Hines, L.L. Mack, R.C. Mobley. Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.*, 1968; 49 (5): 2240-2249.
- [14] J.V. Iribarne, B.A Thomson. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.*, 1976; 64 (6): 2287- 2294.
- [15] J.V. Iribarne, P.J. Dziedzic, B.A. Thomson. Atmospheric pressure ion evaporation-mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, 1983; 50: 331-347.
- [16] L.R.R. Ogorzalec, R.D. Smith. Investigations of the gas phase structure of electrosprayed proteins using ion-molecule reactions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1996; 5: 221-229.
- [17] P. Kebarle M. Peschke. On the mechanism by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Anal. Chem. Acta*, 2000; 406: 11-35.
- [18] M.H. Amand, N.B. Cech, G.S. Jackson, C.G. Enke. Importance of gas-phase proton affinities in determining the electrospray ionization response for analytes and solvents. *J. Mass Spectrom.*, 2000; 35: 784-789.
- [19] P. Kebarle, L. Tang. From ions in solution to ions in gas phase. *Anal. Chem.*, 1993; 65: 972A-985.
- [20] G.J. Van Berkel, F. Zhou. Electrospray as a controlled-current electrolytic cell: electrochemical ionization of neutral analytes for detection by electrospray mass spectrometry *Anal. Chem.*, 1995; 67: 3959.



- [21] L. Politi, A. Groppi, A. Poletti. Chapter 1: Ionisation, ion separation and ion detection, en: Applications of LC-MS in Toxicology. Ed. Pharmaceutical Press, London, 2006.
- [22] R. Kronstrand, M. Josefsson. Capítulo 3: Quantification using LC-MS, en: Applications of LC-MS in Toxicology. Ed. Pharmaceutical Press, London, 2006.
- [23] M.G. Ikonou, A.T. Blades, P. Kebarle. Investigations of the electrospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry. Anal. Chem., 1990; 62: 957-967.
- [24] D.R. Zook, A.P. Bruins. On cluster ions, ion transmission, and linear dynamic range limitations in electrospray (ionspray) mass spectrometry. Int. J. Mass Spectrom. Ion Process., 1997; 162: 129-147.
- [25] W.M.A. Niessen. Chapter 9: Electrospray interfacing, en: Liquid chromatography-mass spectrometry, en: Liquid chromatography-mass spectrometry. Ed. Marcel Dekker AG, New York, 1999. 2ª edición.
- [26] E.C. Horning, M.G. Horning, D.I. Carrol, I. Dzidic, R.N. Stillwell. New pictogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure. Anal. Chem., 1973; 45: 936-943.
- [27] H. Kambara. Sample introduction system for atmospheric pressure ionization mass spectrometry of nonvolatile compounds. Anal. Chem., 1982; 54: 143-146.
- [28] M. Sakairi, H. Kambara. Characteristics of a liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometer. Anal. Chem., 1988; 60: 774-780.
- [29] M. Sakairi, H. Kambara. Atmospheric pressure spray ionization for liquid chromatography/mass spectrometry. Anal. Chem., 1989; 61: 1159-1164.
- [30] J.D. Henion, B.A. Thomson, P.H. Dawson. Determination of sulphadiazine in biological fluids by liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry. Anal. Chem., 1982; 54: 451-456.

- [31] S. Souverain, S. Rudaz, J.L. Veuthey. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. *J. Chromatogr. A*, 2004; 1058: 61-66.
- [32] R. King, R. Bonfiglio, C. Fernández-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah. Mechanism investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2000; 11: 942-950.
- [33] P. Marquet. Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Ther. Drug Monit.*, 24: 255-276.
- [34] H.M. Maurer. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *J. Chromatogr. B*, 1998; 713: 3-25.
- [35] R. Jansen, G. Lachatre, P. Marquet. LC-MS/MS systematic toxicological analysis: comparison of MS/MS spectra obtained with different instruments and settings. *Clin. Biochem.*, 2005; 38: 362-372.
- [36] M. J. Bogusz. Liquid chromatography-mass spectrometry as a routine method in forensic sciences: a proof of maturity. *J. Chromatogr. B*, 2000; 748: 3-19.
- [37] M. Wood, M. Laloup, N. Samyn, M.M. Ramírez Fernández, E.A. de Bruijn, R.A.A. Maes, G. De Boeck. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry in forensic sciences. *J. Chromatogr. A*, 2006; 1130 (1): 3-15.
- [38] H. H. Maurer. Multi-analyte procedures for screening and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. *Clin. Biochem.*, 2005; 38: 310-318.
- [39] P. Kintz, N. Samyn, in: M. bogusz (Ed.), *Handbook of analytical separation: Forensic Science*, Elsevier, Amsterdam, 2000.
- [39] Y.H. Caplan, B.A. Goldberger. Alternative specimens for workplace drug testing. *J. Ana. Toxicol.*, 2001; 25 (5): 396-399.

- [40] M. Villain, M. Concheiro, V. Cirimelle, P. Kintz. Screening method for benzodiazepines and hypnotics in hair at pg/mg level by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *J. Chromatography B*, 2005; 825 (1): 72-78.
- [42] M. Concheiro, M. Villain, S. Bouchet, B. Ludes, M. López-Rivadulla, P. Kintz. Windows of detection of tetrazepam in urine, oral fluid, beard, and hair with a special focus on drug-facilitated crimes. *Ther. Drug Monit.*, 2005; 27 (5): 565-570.
- [43] M. Laloup, M. Ramírez Fernández, G. De Boeck, M. Word, V. Maes, N. Samyn. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 26 benzodiazepines and metabolites, zolpidem and zopiclone, in blood, urine, and hair. *J. Anal. Toxicol.*, 2005; 29 (7): 616-626.
- [44] N. Samyn, G. De Boeck, M. Wood, C.T.J. Lamers, D. De Waard, K.A. Brookhuis, A.G. Verstraete, W.J. Riedel. Plasma, oral fluid and sweat wipe ecstasy concentrations in controlled and real life conditions. *Forensic Sci. Int.*, 2002; 128 (2): 90-97.
- [45] M. Wood, M. Laloup, M. Fernandez, K. Jenkins, M. Young, J. Ramaekers, G. Boeck, N. Samyn. Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.*, 2005; 150 (2-3): 227-238.
- [46] M. Concheiro, A. de Castro, O. Quintela, A. Cruz, M. López-Rivadulla. Development and validation of a method for the quantitation of  $\Delta^9$ tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography electrospray-mass-spectrometry. *J. chromatogr. B*, 2004; 810 (2): 319-324.
- [47] M. Concheiro, A. de Castro, O. Quintela, A. Cruz, M. López-Rivadulla. Confirmation by LC-MS of drugs in oral fluid obtained from roadside testing. Presentado en el 44º Congreso Anual de la Asociación Internacional de Toxicólogos Forenses (TIAFT), Eslovenia, 28 agosto-1 septiembre de 2006.

[48] S. Pichini, R. Pacifici, M. Pellegrini, E. Marchei, E. Pérez-Alarcón, C. Puig, O. Vall, O. García-Algar. Development and validation of a liquid chromatography-mass spectrometry assay for the determination of opiates and cocaine in meconium. *J. Chromatogr. B*; 2003; 794 (2): 281-292.

[49] S. Pichini, R. Pacifici, M. Pellegrini, E. Marchei, J. Lozano, J. Murillo, O. Vall, O. García-Algar. Development and validation of a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay for determination of amphetamine, methamphetamine, and methylenedioxy derivatives in meconium. *Anal. Chem*, 2004; 76 (7): 2124- 2132.

[50] R. Naxing-Xu, L. Fan, E.G. Kim, El-Shourbagy, A Tawakol. A monolithic-phase based on-line extraction approach for the determination of pharmaceutical components in human plasma by HPLC-MS/MS and a comparison with liquid-liquid extraction. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006; 40 (3): 728-736.

[51] G. Hopfgartner, E. Bourgoigne. Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. *Mass Spec. Rev.*, 2003; 22 (3): 195-214.

[52] F.L. Sauvage, J.M. Gaulier, G. Lachâtre, P. Marquet. A fully automated-flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry technique for monitoring antidepressants in human serum. *Ther. Drug Monit.*, 2006; 28 (1): 123-129.

[53] A. de Castro, M.M. Ramírez, M. Laloup, N. Samyn, G. De Boeck, M. López-Rivadulla. A high-throughput on-line SPE-LC-MS/MS for the analysis of 14 antidepressants and metabolites in plasma. Presentado en el 44º Congreso Anual de la Asociación Internacional de Toxicólogos Forenses (TIAFT), Eslovenia, 28 agosto-1 septiembre de 2006.

[54] A. Schellen, B. Ooms, D. Van de Lagemaat, R. Vreeken, W.D. Van Dongen. Generic solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry for fast determination of drugs in biological fluids. *J. Chromatogr. B*, 2003; 788: 251-259.

- [55] Y. Alnouti, K. Srinivasan, D. Waddell, H. Bi, O. Kavetskaia, A.I. Gusev. Development and application of a new on-line SPE system combined with LC-MS/MS detection for high throughput direct analysis of pharmaceutical compounds in plasma. *J. Chromatogr. A*, 2005; 1080: 99-106.
- [56] H.H. Maurer. Position of chromatographic techniques in screening for detection of drugs and poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2004; 42 (11): 1310-1324.
- [57] M. Gergov, I. Ojanpera, E. Vuori. Simultaneous screening for 238 drugs in blood. By liquid chromatography-ionspray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring. *J. Chromatogr. B*, 2003; 795 (1): 41-53.
- [58] C. A. Müller, A. Weinmann, S. Dresen, A. Schreiber, M. Gergov. Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 2005; 19 (10): 1332-1338.
- [59] W. Weinmann, A. Wiedemann, B. Eppinger, M. Renz. Screening for drugs in serum by electrospray ionization/collision-induced dissociation and library searching. *Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1999; 10: 1028-1037.
- [60] N. Vernise, P. Marquet, E. Duchoslav, J.L. Dupuy, G. Lachâtre. A general unknown screening procedure for drugs and toxic compounds in serum using liquid chromatography-electrospray-single quadrupole mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, 2003; 27 (1): 7-14.
- [61] L. Humbert, F. Grisel, G. Bondoux, M. Lhermitte. Presentado en el Congreso Anual de la Asociación Internacional de Toxicólogos Forenses (TIAFT), París 27-30 agosto 2002.
- [62] P. Marquet, F. Saint-Marcoux, T.N. Gamble, J.C. Leblanc. Comparison of a preliminary procedure for the general unknown screening of drugs and toxic compounds using a quadrupole-linear ion-trap mass spectrometer with a liquid chromatography-mass spectrometry reference technique. *J. Chromatogr B*, 2003; 789 (1): 9-18.

[63] T.N. Decaestecker, K.M. Clauwaert, J.F. Van Bocxlaer, W.E. Lambert, E. G. Van den Eeckhout, C.H. Van Peteghem, et al. Evaluation of automated single mass spectrometry to tandem spectrometry function switching for comprehensive drug profiling analysis using a quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2000; 14 (19): 1787-1792.

## V. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS





Entre las pautas que un laboratorio de Toxicología debe ejecutar figura la de complementar los informes necesarios que tanto a nivel clínico como forense son necesarios para un diagnóstico correcto de una intoxicación o una muerte. Como es lógico, estas pautas deben de tener en primer lugar un rigor inexcusable, y por otra deben de estar basadas en las necesidades de demanda al Laboratorio. En este sentido todo laboratorio complementario en estos ámbitos, debe de atender a las necesidades que marcan los estudios epidemiológicos, y este es uno de los retos de este trabajo. Los tipos de compuestos que llegan a los Servicios de urgencia o unidades de vigilancia intensiva son uno de los elementos clave para diseñar estrategias para su detección; los nuevos antidepresivos no son una excepción a este problema, y en los últimos cinco años, la presencia de los antidepresivos y los nuevos SSRI como implicados en casos clínicos y forenses ha hecho necesario su atención por parte del laboratorio, sin que por ello se dejaran de atender otros tipos de compuestos. Por otro lado la necesidad de una monitorización terapéutica ha originado que desde los Laboratorios de Toxicología se adaptasen los métodos para que se pudiera abordar otra parte complementaria a una valoración más terapéutica que tóxica, pero a todas luces interesante para el clínico.

Todos estos aspectos han contribuido al diseño del presente trabajo, realizado básicamente con una doble finalidad: clínica y médico-legal. Pero, además, teniendo presente que en muchas ocasiones no se conoce la naturaleza del compuesto implicado, se hace necesario intentar desarrollar un procedimiento que los detecte y cuantifique a la vez. Esto exige, además, la utilización de nuevas técnicas instrumentales que compaginen una buena especificidad con una buena sensibilidad. En otros apartados de la memoria hemos destacado ya las relaciones entre las concentraciones plasmáticas y la eficacia clínica de estos compuestos, indicando algunas lagunas e incertidumbres. Todo ello nos ha conducido al desarrollo experimental de la presente memoria, con la utilización de la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas, técnica que constituye a partir de los años 90 un importante desafío en el ámbito de la Toxicología, pero sobre todo de una importante ayuda para resolver los problemas de especificidad y sensibilidad a los que aludíamos. Esta técnica nos ha permitido

abordar el problema con una visión de extenderlo al mayor número de compuestos posibles, dentro de este grupo farmacológico, aplicándolo a 13 compuestos de gran incidencia en las intoxicaciones por este tipo de compuestos.

Sin embargo no hemos querido abordar el problema solo desde el punto de vista meramente analítico. Éste, ya de por sí complejo, no ha sido el único objetivo que hemos intentado cumplir en el trabajo. La utilización de matrices alternativas constituye otro reto al que debemos de hacer frente, y así es como llegamos a plantear la utilización del fluido oral como una matriz a valorar en cuanto a su aplicación en el diagnóstico clínico y en la monitorización terapéutica. Los avances en el uso de matrices alternativas para la valoración del consumo reciente de agentes exógenos son de notoria relevancia en el caso de las drogas de abuso, como está bien documentado. A pesar de esto, su aplicación en el caso de los antidepresivos u otros fármacos es un poco más complejo, y sobre todo desconocido, por lo que constituye un tema a resolver. Las interpretaciones que se pueden llevar a cabo con el fluido oral y su correlación con la sangre, y por ende, con el estado clínico del paciente, han constituido uno de los objetivos y por tanto una justificación muy relevante del presente trabajo.

Estimamos por tanto que son dos las vertientes en las que se basa la presente memoria; la primera un diseño coherente de una metodología analítica que, inequívocamente, nos permite conocer con absoluta seguridad qué compuesto o compuestos están implicados en el caso, y en que niveles de concentración; esto ha requerido la aplicación de una instrumentación idónea a tal fin, y asumir el obligado cumplimiento de criterios analíticos validados y que están contrastados a nivel internacional. Estos criterios han sido aplicados con rigor, resolviendo todos aquellos escollos que supone aplicarlo a una mezcla de 13 componentes con sus respectivos patrones internos. En segundo término intentar proponer una interpretación coherente de los resultados obtenidos en la aplicación a casos reales en los que dispusimos de matrices alternativas, y lograr un uso adecuado de la información para resolver los problemas que hemos planteado, y que se pueden producir en la casuística global; esto es,

incumplimientos en la prescripción, aplicación a poblaciones especiales (niños, ancianos, metabolizadores rápidos, lentos etc.), pacientes polimedicados, automedicados o cambios en el tratamiento.



**VI. PARTE EXPERIMENTAL (1). DETERMINACIÓN DE  
ANTIDEPRESIVOS EN PLASMA Y FLUIDO ORAL MEDIANTE  
LC-MS/MS**



## 6.1. INSTRUMENTACIÓN

### 6.1.1. Sistema cromatográfico

Se empleó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Alliance HT, Waters 2795 Separation Module, compuesto de una bomba cuaternaria, un sistema desgasificador de membrana, un inyector automático con capacidad de refrigeración hasta 4°C y un sistema independiente de lavado de la aguja de inyección. El sistema cromatográfico está provisto de un horno de columna Waters Alliance Series Column Heater/Cooler.

### 6.1.2. Sistema de detección

El sistema de detección utilizado fue un espectrómetro de masas en tandem Quattro Micro API (Micromass, Waters Corporation).



**Figura 12.** Fotografía del equipo empleado en el desarrollo de la metodología analítica para la determinación de antidepresivos (cromatógrafo de líquidos y espectrómetro de masas en tandem).

Las características del equipo son las siguientes:

- Sonda ESCI, donde se combina simultáneamente ESI y APCI.
- Sistema de introducción ortogonal de la muestra Z-spray.

- Los analizadores en tandem son dos cuadrupolos, y la celda de colisión un hexapolo.
- El gas de nebulización y desolvatación empleado es  $N_2$ , y el gas de colisión es argón.

El espectrómetro utiliza una bomba rotatoria de vacío Edwards E2M28.

El sistema informático utilizado es un ordenador IBM Think Center con sistema operativo Windows XP, dotado de un software de manejo y comunicación del sistema LC-MS/MS Masslynx NT 4.0 (Micromass, Waters Corporation) y el software de cuantificación Quanlynx 4.0 (Micromass, Waters Corporation).

### 6.1.3. Sistema de extracción de la muestra

Se utilizó el sistema automático de SPE ASPEC XL (Wilson, Middleton, USA) como dispensador para el acondicionamiento previo de las muestras, así como para la posterior SPE.



**Figura 13.** Sistema de SPE automático ASPEC XL (Gilson) empleado en la extracción de las muestras de plasma y saliva.



El equipo se compone de un sistema de bombeo 420, dotado de dos jeringas de distinta capacidad (10 y 1mL) conectadas en "T", y una bandeja que consta de un brazo vertical móvil para el desplazamiento de la aguja, un rack para el almacenamiento de los disolventes con capacidad para 4 botellas, 4 puertos de transferencia para la dispensación de otros líquidos (generalmente, se emplea para la adición de volúmenes superiores de disoluciones con mayor contenido acuoso que los del rack de disolventes), dos racks de muestras y dos racks para llevar a cabo la SPE y la posterior recolección de los extractos, con formatos para la extracción en columnas de 1 ó 3cc. Los racks de muestras y los de SPE/recolección están termostatizados por medio de un módulo de regulación de temperatura (832 temperature regulador (Wilson)).

El sistema se controla mediante un sistema informático compuesto de un ordenador con procesador Intel Pentium III, 866MHz y 128MB de RAM (AS Computer MacCentre), sistema operativo Windows XP Professional y software 735 Sampler Controller (Gilson).

#### **6.1.4. Instrumentación adicional para la preparación de la muestra**

- Pipetas automáticas Gilson y Eppendorf.
- Vortex Reax control (Heidolph).
- Centrífuga de sobremesa analógica Mixtasel (J. P. Selecta).
- Evaporador de bloque metálico para 24 tubos, con suministro de N<sub>2</sub> VLM<sub>EC 1</sub>.
- Campana de extracción.

#### **6.1.5. Otra instrumentación**

- Balanza analítica digital BP61S (Sartorius).
- pHmetro digital Basic 20 (Crison).
- Agitador magnético HI 190M (Hamma Instruments).
- Baño de ultrasonidos (J. P. Selecta).
- Sistema de purificación de agua Mili-Q (Millipore).

- Cámara frigorífica.
- Cámara de congelación.

## **6.2. MATERIAL, DISOLVENTES y REACTIVOS, SUSTANCIAS PATRÓN Y DISOLUCIONES**

### **6.2.1. Material de laboratorio**

- Salivette<sup>®</sup> (Sarstedt), para la recolección de las muestras de saliva.
- Botes de cristal ámbar de 1.5mL y 8mL para almacenamiento de disoluciones patrón.
- Tubos de vidrio de fondo redondo de 12mL (Pyrex).
- Tubos de ensayo de fondo redondo de 12x50mm y 12x75mm.
- Pipetas pasteur.
- Gradillas.
- Probetas de 250 y 500mL.
- Matraces aforados de 100, 200, 500 y 1000mL.
- Vasos de precipitados.
- Viales de polipropileno 12x32mm 300µL con tapa Screw Cap Lectra Bond PTFE/Silicone.

### **6.2.2. Disolventes y reactivos**

- Metanol grado gradiente Lichrosolv<sup>®</sup> y para análisis (Merck).
- Acetonitrilo LC-MS Lichrosolv<sup>®</sup> (Riedel-de Hæn).
- Diclorometano Lichrosolv<sup>®</sup> (Merck).
- Isopropanol (Panreac).
- Agua Mili-Q.
- Ácido fórmico 98-100% (Merck).

- Formiato amónico (Fluka).
- Ácido acético glacial 100% (Merck).
- Acetato sódico (Merck).
- Amoníaco en solución 25% (Merck).
- Plasma y saliva exentos de las sustancias examinadas.

### 6.2.3. Sustancias patrón

- Amitriptilina, 1mg/mL en metanol (Cerilliant).
- Nortriptilina hidrocloreuro (Sigma-Aldrich Química)
- Imipramina, 1mg/mL en metanol (Cerilliant).
- Desipramina, 1mg/mL en metanol (Cerilliant).
- Clomipramina, cedido por Novartis Farmaceutica, S.A.
- Norclomipramina hidrocloreuro (Sigma-Aldrich Química).
- Fluoxetina hidrocloreuro, 1mg/mL en metanol (Cerilliant).
- Norfluoxetina oxalato, 1mg/mL en metanol (Cerilliant).
- Paroxetina maleato, 1mg/mL en metanol (Cerilliant).
- Citalopram (Sigma-Aldrich Química).
- Sertralina, 1mg/mL en metanol (Cerilliant).
- Fluvoxamina, cedido por Solvay-Pharma, S.A.
- Venlafaxina, cedido por Wyeth-farma, S.A.
- Imipramina-d3, 0.1mg/mL en metanol (Cerilliant).
- Clomipramina-d3, 0.1mg/mL en metanol (Cerilliant).
- Paroxetina-d6 maleato, 0.1mg/mL en metanol (Cerilliant).
- Fluoxetina-d6 oxalato, 0.1mg/mL en metanol (Cerilliant).

## 6.2.4. Disoluciones

### 6.2.4.1 Preparación de la disolución tampón y disoluciones empleadas en la extracción

- Tampón acetato sódico pH 3.6: en un matraz aforado se añadieron 890mL de ácido acético 0.1N y se enrasó a 1L con una disolución de acetato sódico 0.1N.
  - Acetato sódico 0.1N: 1.64g de acetato sódico se disolvieron en agua y se enrasaron en un matraz aforado de 200mL.
  - Ácido acético 0.1N: 5.7mL ácido acético se diluyeron en agua en un matraz aforado de 1L.
- Ácido fórmico 2%: 2mL de ácido fórmico se llevaron a un matraz aforado de 100mL y se enrasó con agua.
- Diclorometano/isopropanol/NH<sub>3</sub> (75:24.5:0.5): se añadieron 24.5mL de isopropanol y 0.5mL de NH<sub>3</sub> a un matraz aforado de 100mL, y se enrasó con diclorometano.

### 6.2.4.2 Preparación de las disoluciones madre de antidepresivos

Las disoluciones madre de los patrones adquiridos en estado sólido se elaboraron mediante la disolución de 5mg de patrón en 5mL de metanol. Las disoluciones madre de todos los compuestos se conservaron a -20°C protegidas de la luz durante un periodo máximo de 6 meses.

### 6.2.4.3 Preparación de las disoluciones de trabajo para la elaboración de las rectas de calibrado

Mediante la dilución en metanol de las disoluciones anteriores, se prepararon disoluciones individuales de 0.1mg/mL. A partir de éstas, se elaboró diariamente una disolución de trabajo conteniendo todos los compuestos a una concentración de 2µg/mL en agua, a partir de la cual se prepararon las restantes disoluciones de trabajo necesarias para la elaboración de la recta de calibrado mediante sucesivas diluciones en agua. Las concentraciones de las

disoluciones de trabajo fueron de 2, 0.4, 0.08 y 0.016 $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la elaboración de la recta en plasma, y de 1, 0.2, 0.04 y 0.008 $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la recta en saliva.

Se prepararon disoluciones individuales de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cada uno de los patrones internos mediante la dilución en metanol de las disoluciones madre de 0.1mg/mL. A partir de éstas, se elaboró diariamente la disolución de trabajo conteniendo todos los patrones internos a concentración de 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el plasma y 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la saliva.

### **6.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA**

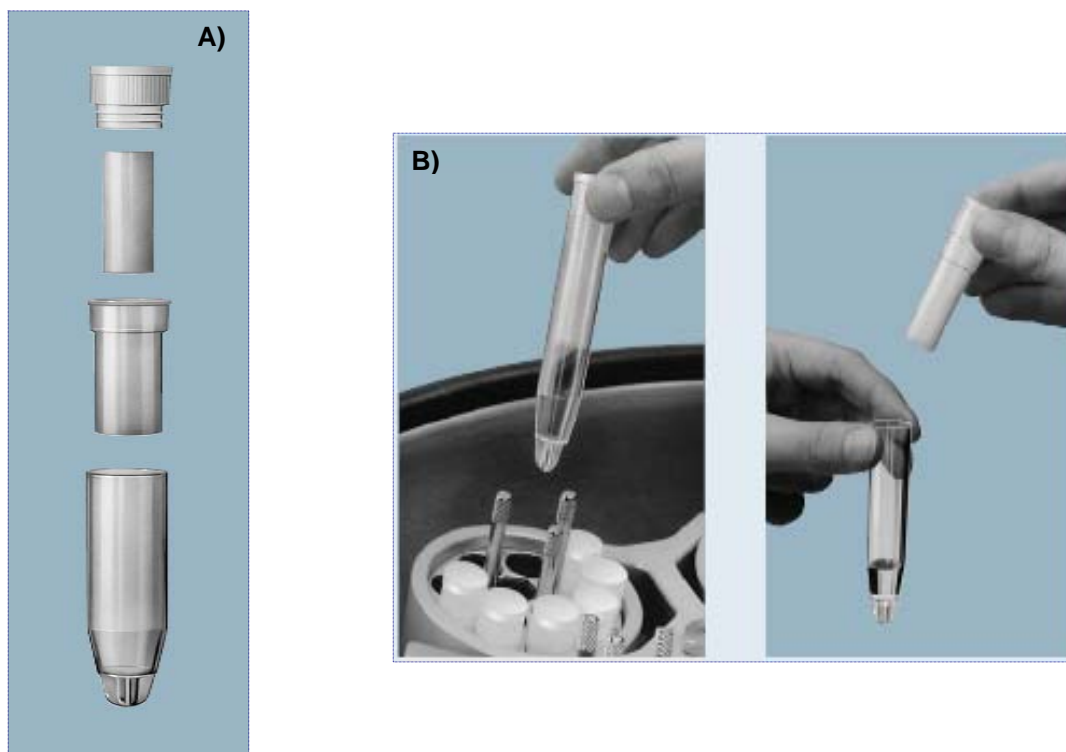
#### **6.3.1 Preparación de las muestras de plasma y saliva**

Las muestras de plasma fueron recolectadas por personal cualificado en tubos heparinizados y remitidas al servicio de toxicología. Una vez allí, las muestras se identificaron y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para su análisis, las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm en tubos eppendorff, y 0.2mL de sobrenadante se añadieron a tubos de ensayo de 12x50mm.

Para el análisis de las muestras remitidas, así como para llevar a cabo el proceso de validación, se prepararon rectas de calibrado mediante la adición a 0.2mL de plasma centrifugado de 25 ó 50 $\mu\text{L}$  de las disoluciones de trabajo necesarias para obtener los distintos niveles de concentración. A todas las muestras se les añadió 1 mL de tampón acetato sódico a pH 3.6 y 50 $\mu\text{L}$  de disolución de patrón interno a 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las rectas se construyeron con nueve niveles de concentración a 2, 4, 10, 20, 50, 100, 250, 500 y 1000ng/mL, excepto en el caso de amitriptilina, norfluoxetina y fluvoxamina, siendo la concentración inferior de 4ng/mL para los dos primeros compuestos, y de 10ng/mL para la fluvoxamina.

La saliva se recogió mediante la utilización de Salivettes<sup>®</sup>. Estos dispositivos constan de un algodón en el interior de un cilindro plástico perforado en su base que, a su vez, se encuentra contenido en un segundo tubo plástico. La recolección de la saliva se efectúa a través de la masticación

del algodón y, posteriormente, se recupera mediante su devolución al contenedor plástico para su centrifugación. Las muestras de saliva fueron congeladas hasta su análisis.



**Figura 14. A)** Dispositivo para la recolección de saliva (Salivette®); **B)** Centrifugación del algodón empapado para la recuperación posterior de la muestra.

Para la preparación de las muestras de saliva se siguió el mismo procedimiento que para las de plasma, a partir de 0.2mL de saliva. Las rectas de calibrado para la determinación de los niveles de antidepresivos y para la validación del método se prepararon con saliva fresca de voluntarios que no estaban a tratamiento con los fármacos en estudio, utilizando los mismos dispositivos que los empleados en la obtención de las muestras reales. En este caso, las rectas se construyeron con ocho puntos a concentraciones de 2, 4, 10, 20, 50, 100, 250 y 500ng/mL, y la concentración de patrón interno añadido se disminuyó a 0.2µg/mL.

### 6.3.2 Procedimiento de extracción

Se llevó a cabo una extracción en fase sólida, utilizando columnas de modo mixto Oasis<sup>®</sup> MCX de 3cc 60mg (Waters Corporation, Mildford, USA), con un sorbente que actúa simultáneamente por dos mecanismos: intercambio catiónico y fase reversa. Para favorecer la retención de los compuestos en estudio a los cartuchos mediante el mecanismo de intercambio catiónico y aumentar así la especificidad de la extracción, éstos deben encontrarse en forma ionizada. Para ello, las muestras fueron acondicionadas antes de su extracción con 1mL de tampón acetato sódico a pH 3.6.

La extracción se llevó a cabo a partir de 0.2mL de muestra, tanto en el caso del plasma como del fluido oral. Previamente, el sistema automático de SPE ASPEC XL (Gilson) se empleó como dispensador para la adición del tampón acetato sódico y de 50µL de patrón interno a las concentraciones anteriormente indicadas según se tratase de muestras de plasma o saliva. Una vez acondicionadas, el lote de muestras se extrajo de forma secuencial mediante el siguiente procedimiento: los cartuchos se acondicionaron y equilibraron con 2mL de metanol y agua antes de efectuar la adición de las muestras sobre las columnas de extracción. Después de la carga de muestra, los cartuchos se lavaron con 2mL de ácido fórmico 2% en agua y 2mL de metanol y, posteriormente, se sometieron a un flujo de nitrógeno durante cinco minutos para su secado. Transcurrido este tiempo, los cartuchos se desplazaron a la zona de recolección para llevar a cabo la elución con 2mL de diclorometano/isopropanol/NH<sub>3</sub> (75:24.5:0.5).

Finalmente, los eluatos se traspasaron al evaporador termostatzado a 35°C, donde el disolvente se evaporó a seco mediante una corriente de nitrógeno seco.

Los extractos se reconstituyeron en 100 ó 200µL (según se tratase de plasma o saliva, respectivamente) de fase móvil al porcentaje empleado en el cromatógrafo de líquidos a condiciones iniciales, de los cuales se inyectaron 20µL en modo full-loop.

**Tabla 8.** Procedimiento de SPE aplicado a las muestras de plasma y saliva mediante la utilización del sistema automático de extracción ASPEC XL.

ETAPA		FLUJO ASPIRADO	FLUJO DISPENSADO	AIRE EMPUJADO
<b>acondicionamiento</b>	2mL MeOH	6mL/min	6mL/min	1mL a 6mL/min
<b>equilibrado</b>	2mL Agua	15mL/min	6mL/min	1mL a 6mL/min
<b>mezcla muestra</b>	Aspirado y dispensado de 750µL de muestra a 10mL/min			
<b>Carga de muestra</b>	muestra	10mL/min	2mL/min	1mL a 6mL/min
<b>lavado 1</b>	2mL AF 2%	6mL/min	6mL/min	1mL a 6mL/min
<b>lavado 2</b>	2mL MeOH	6mL/min	6mL/min	1mL a 6mL/min
<b>secado</b>		N <sub>2</sub> seco durante 5 min		
<b>elución</b>	2mL DCM/isopropanol/NH <sub>3</sub> (75:24.5:0.5)	6mL/min	3mL/min	3mL a 6mL/min

### 6.3.3 Condiciones cromatográficas

La separación de los antidepresivos se llevó a cabo en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución descrito anteriormente. A fin de optimizar la resolución y sensibilidad obtenidas, se ensayaron columnas analíticas con distintos rellenos de fase reversa y de diferentes dimensiones (Tabla 9). Finalmente, se seleccionó una Sunfire® C18 IS (20x2.1mm, 3.5µm) (Waters Corp., Mildford, USA). Se trata de una columna de base sílice, estable a valores de pH bajo. Las siglas IS (del inglés *Intelligent Speed*) hacen referencia a sus pequeñas dimensiones, que posibilitan operar a altos flujos con condiciones normales de presión y sin sacrificar la resolución obtenida, permitiendo reducir el tiempo empleado en el método cromatográfico.



**Tabla 9.** Distintas columnas analíticas ensayadas en la separación cromatográfica de los compuestos antidepresivos.

<b>COLUMNA</b>	<b>RELLENO</b>	<b>Long. x ID, tamaño de partícula</b>
XTerra® RP18	Híbrido C18 con grupo polar embebido	150 x 2.1mm, 5µm
XTerra® MS C18	Híbrido C18 con ligando trifuncional	100 x 2.1mm, 3.5µm
XBridge™ Shield RP18	Híbrido C18 con grupo polar embebido	100 x 2.1mm, 3.5µm
Atlantis dC18	C18 con ligando difuncional	100 x 2.1mm, 3µm 20 x 2.1mm, 3µm (IS)

Híbrido: combinación de partículas de sílice y poliméricas; Ligando difuncional o trifuncional: ligando unido a sílice por dos o tres puntos

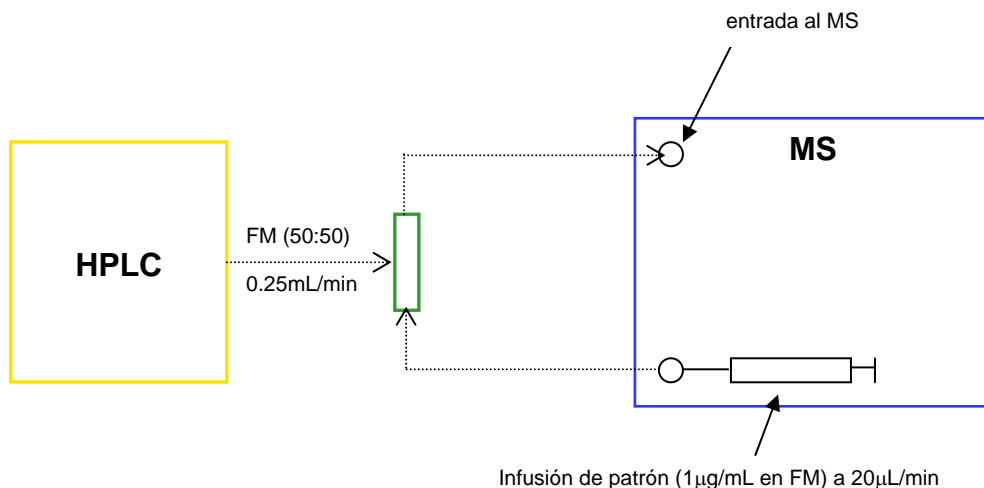
Como fase móvil se ensayaron distintos tampones, empleando finalmente una mezcla de acetonitrilo/ tampón formiato amónico 2mM pH 3 con 0.1% de ácido fórmico, a un flujo de 0.4 mL/min. El método cromatográfico comenzó con un porcentaje de ACN de un 15%. Desde el minuto 0.5 hasta el 4 se aumentó gradualmente el porcentaje de ACN hasta un 50%, manteniéndose durante 0.3 minutos, para aplicar una nueva rampa hasta alcanzar un 70% de ACN a los 5 minutos. Del minuto 5.5 al 6 se retornó a condiciones iniciales, que se mantuvieron 2 minutos. En la Tabla 10 se describe el método cromatográfico aplicado. La duración total del mismo, incluyendo la etapa de equilibrado, fue de 8 minutos. La columna se mantuvo a una temperatura constante de 26 °C.

**Tabla 10.** Método cromatográfico utilizado en la separación de los 13 antidepresivos en estudio.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>ACN (%)</b>	<b>2mM tampón formiato amónico pH3</b>	<b>Curva</b>	<b>Flujo (mL/min)</b>
0	15	85	1	0.4
0.3	15	85	1	0.4
4	28	72	6	0.4
4.3	28	72	6	0.4
5	40	60	6	0.4
5.5	85	15	6	0.4
6.3	15	85	6	0.4
8	15	85	1	0.4

### 6.3.4 Condiciones del espectrómetro de masas

La detección se llevó a cabo en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Quattro Micro™ API. Este equipo cuenta con una sola sonda que combina la posibilidad de trabajar mediante ESI o APCI (ESCI™ Multi-mode ionization). En un espectrómetro en tandem, en el primer cuadrupolo se puede seleccionar el ion pseudomolecular  $[M+H^+]$  de la molécula analizada (ion “padre”), provocar su fragmentación en la celda de colisión mediante la aplicación de un voltaje, para llevar a cabo la selección de un fragmento procedente de esta molécula (ion “hijo”) en el segundo cuadrupolo, lo que aporta una gran selectividad en la detección, y disminuye significativamente el ruido de fondo. A cada una de las combinaciones ion “padre”-ion “hijo” se le denomina transición. Para la detección de cada compuesto se seleccionaron dos transiciones, que fueron utilizadas en la creación del método de MRM (Multiple Reaction Monitoring). Esta es la forma de detección empleada habitualmente en el análisis cuantitativo.



**Figura 15.** Representación del sistema en “T” empleado para la optimización de los parámetros del espectrómetro de masas.

Para la detección de los antidepresivos analizados en este trabajo, inicialmente se estudió la señal obtenida utilizando ambos tipos de fuentes, tanto en modo positivo como negativo, siendo ESI+ la que suministró los mejores resultados. Para ello, así como para establecer los valores óptimos de

los parámetros generales del equipo, se efectuó la infusión de disoluciones individuales de cada uno de los compuestos estudiados (10µg/mL en fase móvil) a un flujo de 10µL/mL con la jeringa de infusión del espectrómetro en “T” con el sistema cromatográfico, que bombeó la fase móvil utilizada en la metodología en proporción 50:50, a un flujo de 0.25mL/min (Figura 15). Los parámetros del masas, a excepción del voltaje de cono y la energía de colisión, no son modificables para cada uno de los analitos, de forma que se seleccionaron aquellos valores con los que se obtuvo mejor señal para la mayoría de los compuestos, favoreciendo, en cualquier caso, a aquellos de menor sensibilidad. Algunas de las condiciones seleccionadas se describen en la Tabla 11.

Del mismo modo, se seleccionaron los dos fragmentos más abundantes para cada uno de los compuestos, y la energía de colisión óptima con la que conseguir la mayor sensibilidad para cada uno de ellos, obteniendo así las transiciones que se emplearon en el método de MRM.

**Tabla 11.** Valores de los parámetros del espectrómetro de masas seleccionados.

---

**Parámetros de la fuente (ESI+)**

---

Voltaje de capilar: 0.5kV

Voltaje de cono: variable

Voltaje del extractor: 0.2V

Radiofrecuencia RF de las lentes: 0V

T<sup>a</sup> de la fuente: 400 °C

T<sup>a</sup> del bloque: 130 °C

Flujo del gas de desolvatación: 800L/h

Flujo del gas de cono: 50L/h

---

---

**Parámetros de los analizadores y de la celda de colisión**

---

Low Mass Resolution 1: 14

High Mass Resolution 1: 14

Ion Energie 1: 0.5

Voltaje a la entrada de la celda de colisión: 2V

Energía de colisión: variable

Voltaje a la salida de la celda de colisión: 2V

Low Mass Resolution 2: 14

High Mass Resolution 2: 14

Ion Energie 2: 1

Multiplicador: 650V

Presión de gas (argón) en la celda de colisión:  $3.5 \times 10^{-5}$  mBar

---

### 6.3.5 Estudio de validación del método analítico

La correcta interpretación de los resultados clínicos o toxicológicos obtenidos mediante una determinada metodología analítica depende de la fiabilidad de la misma. Por ello, es fundamental que los nuevos métodos desarrollados para su aplicación, ya sea en rutina o en la evaluación de estudios científicos, sigan un proceso de validación. Aunque la calidad del método analítico depende fundamentalmente del cuidadoso desarrollo del mismo, es su validación posterior lo que nos permite demostrar objetivamente su fiabilidad mediante el cumplimiento de los criterios mínimos establecidos para la aplicación a la que será destinado [1].

Se han publicado varias guías en las que se recogen los procedimientos que deben seguirse en la validación de nuevos métodos analíticos, así como los criterios mínimos que deben satisfacerse [1-8]. Posiblemente, la guía más ajustada al campo clínico y/o forense es la descrita por Shah y col. en 2000 [5], así como la publicada por la Sociedad Alemana de Química Toxicológica y Forense (GTFCh) [7].

Los principales parámetros que deben estudiarse en la validación de un método analítico son los siguientes:

- Selectividad.
- Modelo de calibración (linealidad).
- Estabilidad.
- Precisión (repetibilidad y precisión intermedia) y exactitud (bias).
- Límite inferior de cuantificación (LLOQ).

Además de éstos, otros parámetros adicionales que pueden ser estudiados son el límite de detección (LOD), la recuperación, la reproducibilidad y la robustez.

#### **6.3.5.1 Selectividad**

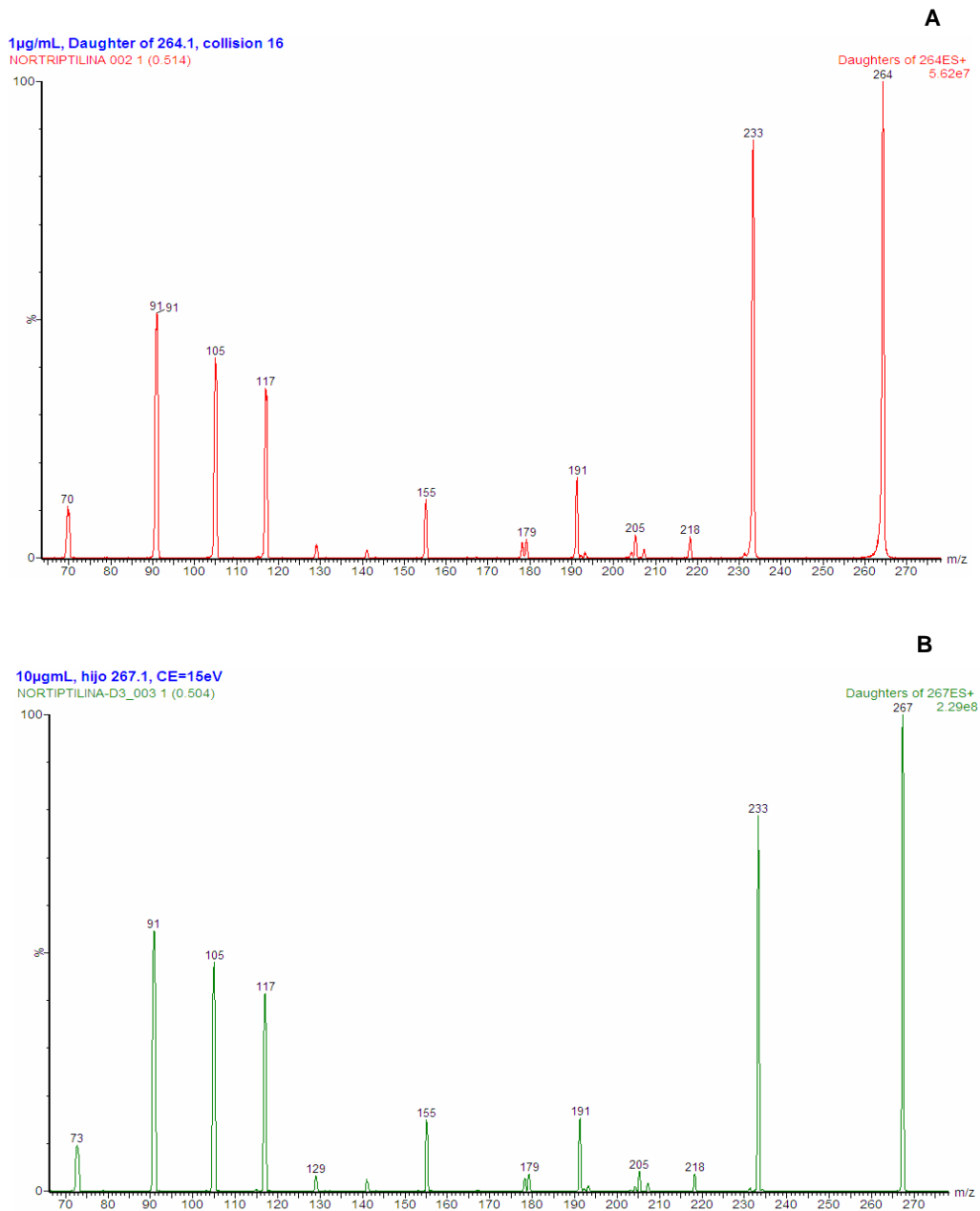
Este parámetro se define como la capacidad de un método analítico para medir y diferenciar el analito(s) de manera inequívoca en presencia de otros compuestos. En el análisis de muestras biológicas, compuestos endógenos, metabolitos, productos de degradación, otros fármacos/drogas coadministradas, etc, pueden comprometer la determinación del analito(s) de interés.

La selectividad con respecto a las interferencias producidas por material endógeno puede ser determinada mediante el análisis de muestras *blanco* (muestra biológica en ausencia de los compuestos analizados). Aún en situaciones controladas, las muestras procedentes de distintos individuos están sujetas a variaciones intra e interindividuales, por lo que las muestras

analizadas en la evaluación de la selectividad deben ser de distinta procedencia. Se ha propuesto la determinación de muestras de, al menos, 6 individuos distintos. Dadgar y col. [3], considerando que con este pequeño número la probabilidad de detectar interferencias menos frecuentes es demasiado alta, han propuesto el aumento de este número al análisis de muestras de 10-20 fuentes diferentes.

Es frecuente que las muestras de procedencia clínica y forense contengan otras sustancias, cuyas interferencias no son descartadas en el análisis de muestras blanco. Por ello, una aproximación complementaria en la evaluación de la selectividad consiste en el análisis de muestras blanco a las que se han adicionado otros analitos que con frecuencia estén presentes en las muestras analizadas. Otra forma, incluso más próxima a la situación real, consiste en el análisis de muestras auténticas que contengan estas sustancias, ya que esta aproximación permite además evaluar las interferencias potenciales debido a la presencia de metabolitos que, en muchos casos, no están disponibles en el mercado.

Por último, en el desarrollo de métodos cuantitativos mediante espectrometría de masas generalmente se emplean como patrones internos deuterados de los compuestos a analizar, que pueden contener impurezas y dar lugar a una sobreestimación de la señal del compuesto sin deuterar. Además, los deuterados D3 o inferiores producen con frecuencia los mismos fragmentos que el compuesto sin deuterar de forma que, al presentar el mismo tiempo de retención, sólo se diferenciarán en el ion pseudomolecular, imposibilitando la utilización de un fragmento de confirmación si se utiliza un espectrómetro de masas simple. Este hecho es menos probable mediante la utilización de un espectrómetro de masas en tandem, ya que lo que se monitoriza en la detección es una determinada combinación de ion "padre"-ion "hijo" (transición). En la Figura 16 se muestra como ejemplo de esta situación el espectro de la nortriptilina y su deuterado-d3. La posible contribución del patrón interno deuterado puede evaluarse mediante el análisis de blancos conteniendo sólo dicho compuesto, y comprobando la señal producida a la  $m/z$  de su análogo sin deuterar.



**Figura 16.** Espectro de masas de los iones “hijos” de Nortriptilina (a) y Nortriptilina-d3 (b) a energías de colisión de 16 y 15eV, respectivamente. Ambos espectros difieren únicamente en el ion pseudomolecular, siendo los fragmentos resultantes los mismos en los dos casos.

En nuestro caso, la selectividad del método fue evaluada mediante el análisis de muestras blanco de plasma y de saliva de 10 individuos distintos. Además, se comprobaron las posibles interferencias originadas tras el análisis de muestras reales de plasma remitidas a nuestro servicio para su análisis toxicológico, que contenían otras sustancias como benzodiazepinas y/o drogas de abuso.

### 6.3.5.2 Modelo de calibración (Linealidad)

Para garantizar la calidad de los resultados cuantitativos obtenidos con un método analítico es necesario establecer adecuadamente la relación entre la respuesta generada por el detector y la concentración analito (generalmente, de la relación entre el área del analito y del patrón interno empleado).

Para establecer esta relación debe emplearse el modelo matemático que mejor se ajuste a los resultados. La utilización del modelo de mínimos cuadrados sólo es adecuada cuando existe homocedasticidad, es decir, cuando las residuales (desviación entre el valor medido y el real) son homogéneas a lo largo de todo el rango de concentraciones. Esto suele ocurrir cuando la expansión de dicho rango es de un orden de magnitud. En toxicología, frecuentemente, los rangos que deben cubrirse son de 2 ó 3 órdenes de magnitud, observándose generalmente un comportamiento heterocedástico. En estos casos, la utilización de modelos matemáticos ponderados permite, normalmente, corregir la heterocedasticidad, siendo frecuente la utilización de la inversa de la concentración de analito o la inversa de la concentración al cuadrado ( $1/x$  ó  $1/x^2$ ) para medir la respuesta producida por los distintos niveles de calibración. Siempre que sea posible, debe emplearse un modelo lineal, pero en caso necesario está aceptada la utilización de modelos no lineales.

En los métodos bioanalíticos, esta relación debe evaluarse en la(s) muestra(s) biológica(s) para la(s) que se ha desarrollado el método, cubriendo todo el rango de calibración. En la mayoría de las publicaciones se aconseja un mínimo de cinco a ocho niveles de concentración para definir la curva de calibrado [2,5,6,8].

Para la selección del modelo matemático adecuado a nuestros datos, se elaboraron 6 curvas de calibrado con 8 niveles de concentración en saliva, y 9 en el caso del plasma (excepto para amitriptilina, norfluoxetina y fluvoxamina, para los que se emplearon 7-8 niveles de concentración) por ser el rango más amplio. En el análisis de las curvas de calibrado se estudió el coeficiente de determinación obtenido, así como las residuales para cada concentración, que



deben ser inferiores al 15%, excepto para el límite de cuantificación, para el que se aceptan desviaciones del 20%. Se empleó para ello el software QuanLynx 4.0 (Micromass, Water Corp.).

### 6.3.5.3 Precisión y exactitud

Estos parámetros son una medida del error aleatorio (precisión) y sistemático (exactitud o bias) del método.

La **precisión** hace referencia al grado de proximidad entre los valores obtenidos para una serie de medidas a la misma concentración, preparadas y analizadas bajo las mismas condiciones. Normalmente lo que se mide es la imprecisión, empleando la desviación estándar relativa (RSD), que mide la dispersión entre los distintos valores obtenidos. RSD puede indicarse en términos de coeficiente de variación (CV), que es la RSD expresada en porcentaje.

La precisión del método se evaluó a dos niveles:

- Repetibilidad o precisión intra-día: expresa la precisión bajo las mismas condiciones en un periodo corto de tiempo.
- Precisión intermedia o interdía: expresa las variaciones obtenidas en un mismo laboratorio bajo distintas condiciones (distintos días, analistas, equipos, etc). En nuestro caso, se determinó efectuando el análisis en distintos días.

La **exactitud** mide la concordancia entre el valor del resultado obtenido y el valor real. Se expresa como el porcentaje de desviación con respecto al valor de referencia. También puede expresarse como el porcentaje de inexactitud mediante la utilización del parámetro error relativo medio (MRE), que puede calcularse con la siguiente fórmula:

$$\text{MRE} = \frac{\text{Media de los resultados obtenidos} - \text{Concentración teórica}}{\text{Concentración teórica}} \times 100$$

El cálculo de la precisión y el de la exactitud se realizó a 4 niveles de concentración (LLOQ, concentración baja, media y alta). Para la determinación de la precisión y la exactitud intra-día, se efectuó el cálculo del CV y del MRE con 5 medidas para cada una de las concentraciones estudiadas, analizadas en el mismo día. Para la determinación de la precisión y exactitud inter-día, los cálculos de CV y MRE se hicieron con los resultados obtenidos para los mismos niveles de concentración en 5 días diferentes.

En cuanto a los criterios de aceptación, tanto el CV como el MRE deben ser inferiores o iguales al 15% para todas las concentraciones, excepto para el LLOQ, para el que valores de hasta un 20% están permitidos.

#### 6.3.5.4 Límites

El **límite de detección** (LOD) de un método analítico se define como la concentración de analito más baja que puede ser detectada de forma fiable bajo las condiciones empleadas en dicho método. Puede calcularse teniendo en cuenta el ruido de fondo originado por una muestra blanco, considerándose como LOD la concentración que produce una señal al menos tres veces superior al ruido de fondo ( $S/N \geq 3$ ).

El **límite inferior de cuantificación** (LLOQ) del método es, por definición, la concentración de analito que puede ser cuantificada con adecuada exactitud y precisión. Los criterios de aceptación son de un 20% de CV y 20% de MRE, para la precisión y la exactitud, respectivamente. Por debajo del LLOQ sólo es posible obtener resultados semicuantitativos o cualitativos.

El **límite superior de cuantificación** (ULOQ) es la concentración máxima de analito que puede ser determinada con adecuada precisión y exactitud, siendo en este caso los criterios de aceptación del 15% de CV y MRE. Normalmente, el ULOQ es la concentración más alta del rango de concentraciones validado.

### 6.3.5.5 Rendimiento de la extracción

Es el porcentaje de analito que se “recupera” tras aplicar el procedimiento de tratamiento de la muestra. El valor de este parámetro no es realmente importante, siempre y cuando el LOQ pueda determinarse con los criterios exigidos de precisión y exactitud.

En muchos casos, la recuperación puede determinarse mediante comparación de la señal del analito obtenida tras la extracción de la muestra con la señal del analito en solución, correspondiéndose ésta última con el 100% de recuperación. Sin embargo, en las metodologías en las que se emplea LC-MS(/MS), de esta forma lo que se está calculando realmente es lo que se denomina *eficiencia del proceso* ya que, además del porcentaje de compuesto recuperado, se está teniendo en cuenta el efecto potencial que puede tener la matriz biológica sobre la señal del analito (es lo que se denomina efecto matriz, del que se hablará posteriormente en esta sección). Por ello, en estos casos, la recuperación debe calcularse mediante la comparación de la señal de analito en la muestra al ser añadido antes y después de llevar a cabo el proceso de extracción.

El cálculo de la recuperación se hizo, tanto en plasma como en saliva, a dos concentraciones (una alta y otra baja). Para cada una de las concentraciones, se comparó la señal obtenida en muestras a las que los analitos se añadieron antes del proceso de extracción (cinco replicados) con la obtenida tras el análisis de muestras blanco a las que se añadió la misma cantidad de analito después de llevar a cabo la extracción (también cinco replicados). La misma cantidad de patrón interno fue añadida a todas las muestras tras su extracción.

### 6.3.5.6 Intensidad relativa de los iones

Además del tiempo de retención y de las  $m/z$  (o transiciones en MS/MS) seleccionadas para la detección de un compuesto, es cada vez más frecuente la utilización de la relación entre la intensidad de dichas  $m/z$  como un parámetro más a tener en cuenta en la identificación [9]. Los criterios exigidos

para este parámetro todavía no están incluidos en la mayoría de las guías internacionales sobre validación de métodos analíticos. La Agencia Mundial Anti-doping es uno de los pocos organismos que ha publicado criterios de aceptación exigidos en función de la abundancia relativa del pico base [10].

**Tabla 12.** Criterios de aceptación en la intensidad relativa de iones publicados por la Agencia Mundial Antidoping [10].

<b>Abundancia Relativa (% pico base)</b>	<b>LC-MS y LC-MS<sup>n</sup></b>
>50%	± 15% (absoluto)
25-50%	± 25% (relativo)
<25%	± 10% (absoluto)

En nuestro caso, la precisión en la relación entre la intensidad de las dos transiciones monitorizadas para cada compuesto (intensidad transición cuantificadora/intensidad transición cualificadora) se calculó en términos de C.V. del valor obtenido para este parámetro en 5 días diferentes. El cálculo se hizo a 4 concentraciones: LLOQ, concentración baja, media y alta con respecto al rango estudiado. Así, las concentraciones estudiadas en las muestras de plasma fueron el LOQ, 20, 500 y 1000ng/mL, y en las muestras de saliva, el LOQ, 4, 100 y 500ng/mL.

#### 6.3.5.6 Efecto matriz

Es bien conocido en LC-MS(/MS) el posible descenso o aumento de la señal de los analitos en estudio cuando compuestos co-eluyentes procedentes de la muestra biológica o de su tratamiento, así como determinados aditivos añadidos a la fase móvil, compiten con dichos analitos en el proceso de ionización. Este fenómeno es lo que se conoce de forma genérica como *efecto matriz* [11,12]. Los efectos de la matriz sobre la señal de los analitos van a depender de factores como el tipo de muestra y del tratamiento de la misma, las características químicas del(los) compuesto(s) a analizar, así como de la concentración a la que se encuentren.

La presencia de efecto matriz va a afectar a parámetros como el LOQ, la linealidad, la precisión y exactitud del método, limitando la fiabilidad de los resultados cuantitativos [1,12,13]. Por ello, a pesar de que la utilización de la espectrometría de masas ha permitido disminuir los requerimientos en cuanto a la separación cromatográfica y el tratamiento de la muestra, en el desarrollo de una metodología mediante LC-MS(/MS) estos procesos no se pueden obviar completamente a fin de evitar la aparición de este fenómeno.

La ionización mediante ESI es más susceptible a este fenómeno, aunque también se ha observado en APCI [11,13,14-16]. Por ello, la evaluación del *efecto matriz* debe incluirse como un parámetro más a estudiar durante el proceso de validación del método analítico siempre que se emplee LC-MS(/MS). Además, debido a la variabilidad intra e interindividual que puede darse en la composición de las muestras biológicas, el grado de efecto matriz puede ser también variable, por lo que los experimentos para el estudio de la supresión/aumento iónico se deben llevar a cabo empleando muestras biológicas procedentes de distintos individuos. La utilización de patrones internos deuterados de los compuestos a analizar puede corregir, en cierta medida, los efectos de este fenómeno, ya que van a estar afectados por el mismo en el mismo grado que sus análogos sin deuterar.

Uno de los experimentos que puede llevarse a cabo para la determinación del efecto matriz es la infusión constante post-columna de los compuestos mediante una bomba jeringa, conectada en "T" con el eluyente de la columna cromatográfica. La infusión de los compuestos da lugar a una señal constante, a menos que componentes procedentes de la matriz biológica produzcan la disminución o el aumento de la señal.

La evaluación del efecto matriz de la metodología que se describe en este trabajo, tanto en plasma como en saliva, se llevó a cabo con este experimento. Se efectuó la infusión postcolumna de una disolución de todos los compuestos estudiados y los patrones internos (1µg/mL en fase móvil, a 10µL/min), en "T" con el sistema cromatográfico. Con esta configuración, se inyectaron muestras blanco de 6 individuos diferentes, extraídas y reconstituidas siguiendo el mismo protocolo que el empleado en el desarrollo

del método, y la señal obtenida a lo largo de todo el cromatograma se comparó con la resultante tras la inyección de fase móvil, que se correspondería con la ausencia total de efecto matriz.

### 6.3.5.7 Estabilidad

Se define como la “estabilidad química de un analito en una determinada matriz bajo determinadas condiciones durante un determinado periodo de tiempo” [5].

La estabilidad de los analitos puede ser investigada a varios niveles:

- Estabilidad en-proceso: hace referencia a la estabilidad del analito bajo las condiciones de preparación de la muestra.
- Estabilidad de la muestra procesada: se trata de la estabilidad del analito después del tratamiento de la muestra, y en las condiciones en las que va a ser inyectado para su análisis.
- Estabilidad a largo plazo: se trata de la estabilidad del analito en la muestra biológica bajo las condiciones normales de almacenamiento (a la misma temperatura, en los mismos recipientes, etc).
- Estabilidad después del congelado/descongelado de la muestra.

La realidad en un laboratorio de Toxicología es que las muestras remitidas pueden estar contenidas en diferentes tipos de recipientes, con distintos tipos de anticoagulantes u otros aditivos, lo que dificulta la determinación de la estabilidad bajo las condiciones reales de almacenamiento hasta efectuarse el análisis. La estabilidad de la mayoría de los antidepresivos en distintas condiciones de almacenamiento y transporte han sido evaluadas por distintos autores [17,18,19]. Generalmente, tras su análisis, las muestras son almacenadas bajo condiciones de congelación por un determinado periodo de tiempo durante el cual es posible que se solicite su re-análisis.

En nuestro caso, se estudió de estabilidad de los antidepresivos en plasma y saliva tras someter las muestras a tres ciclos de congelado/descongelado. Para ambos tipos de muestra, el estudio se realizó a dos concentraciones diferentes, una baja y otra alta (10 y 500ng/mL en plasma,

y 10 y 250ng/mL en fluido oral), con tres replicados para cada una de ellas (muestras de estabilidad). Tras los tres ciclos de congelado/descongelado, se prepararon muestras frescas a las mismas concentraciones, también con tres replicados para cada concentración (muestras de comparación). Todas las muestras fueron conjuntamente analizadas y cuantificadas con una recta de calibrado fresca. Se considera que los analitos son estables a las condiciones estudiadas si la media de los valores obtenidos para las muestras de estabilidad presenta un límite de confianza  $>80\%$  y  $<120\%$  con respecto a la media de los valores obtenidos para las muestras de comparación [4].

Tabla 13. Resumen del estudio de validación de la metodología analítica descrita.

PARÁMETRO VALIDACIÓN	EXPERIMENTO	CRITERIOS ACEPTADOS
<b>Selectividad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 10 muestras procedentes de distintos individuos.</li> <li>- Muestras blanco conteniendo sólo los patrones internos.</li> <li>- Muestras reales conteniendo compuestos frecuentemente administrados a pacientes a tratamiento con antidepresivos.</li> </ul>	Ausencia de interferencias
<b>Modelo de calibración</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Curvas elaboradas (n=6) utilizando la muestra en estudio.</li> <li>- 7-9 niveles de calibración.</li> </ul>	$r^2 > 0.99$ Residuales $\leq 15\%$ , excepto para el LOQ ( $\leq 20\%$ )
<b>Precisión/exactitud y LLOQ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Análisis de muestras control al LLOQ, concentración baja, media y alta con respecto al rango de calibración.</li> <li>- Replicados (n=5) de cada concentración en el mismo run.</li> <li>- Cada concentración analizada en 5 días distintos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- C.V y M.R.E. <math>\leq 15\%</math> para las concentraciones baja, media y alta.</li> <li>- C.V. y M.R.E. <math>\leq 20\%</math> para el LLOQ.</li> </ul>
<b>Recuperación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A concentración baja y alta según el rango de calibración.</li> <li>- Comparación de muestras control (teóricos) a las que se han añadido los compuestos en estudio antes de la extracción con muestras a las que se añaden los compuestos después de la extracción (prácticos). En ambos casos, adición de patrón interno post-extracción. (cinco replicados en ambos casos, a las dos concentraciones).</li> </ul>	Realmente no importante, siempre y cuando se cumplan los requisitos de precisión y exactitud exigidos al LLOQ [1,4,5].
<b>Efecto Matriz</b>	Infusión post-columna continua de patrones en fase móvil en "T" con eluyente de la columna cromatográfica. Comparación del cromatograma obtenido tras la inyección de fase móvil y el obtenido tras la inyección de muestra blanco extraída (6 fuentes diferentes).	Ausencia de este efecto
<b>Estabilidad congelado/descongelado</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Muestras control a concentración baja y alta (por triplicado) sometidas a 3 ciclos de congelado/descongelado (muestras estabilidad).</li> <li>- Preparación de muestras frescas (muestras control) a ambas concentraciones (por triplicado).</li> <li>- Cuantificación de muestras control y muestras estabilidad con recta de calibrado fresca. Comparación de resultados obtenidos en ambos casos.</li> </ul>	Límites de confianza en las muestras de estabilidad 80-120% con respecto a la media de los valores obtenidos para las muestras control.




### 6.3.6 Aplicación a casos reales

Después de llevar a cabo los estudios de validación con los que garantizar la fiabilidad de los resultados cuantitativos suministrados por el mismo, se aplicó el método analítico descrito al análisis de muestras de plasma, tanto clínicas como forenses, remitidas al Servicio de Toxicología del Instituto de Medicina Legal de la Universidad de Santiago de Compostela.

El método se empleó también en un estudio preliminar para establecer la posible correlación entre las concentraciones plasmáticas de antidepresivos y las concentraciones encontradas en fluido oral. Ésta es una muestra que presenta una serie de ventajas con respecto al plasma, como la no invasividad de la toma de muestra y el hecho de no requerir personal cualificado en su recolección. Sin embargo, el principal inconveniente en la interpretación de los resultados obtenidos en saliva o fluido oral es que la difusión de las sustancias desde el torrente sanguíneo depende de varios factores, como el pH y la ingesta de comida, presentando una gran variabilidad intra e interindividual. Por ello, este estudio se planteó con la finalidad de evaluar la existencia o no de una correlación entre los niveles de antidepresivos en plasma y saliva y, con ello, la posibilidad de utilizar este último espécimen como muestra alternativa al plasma en la monitorización de los niveles de antidepresivos. Las muestras de plasma y saliva fueron tomadas a pacientes psiquiátricos ingresados en el Servicio de Psiquiatría del Hospital Provincial de Conxo (Santiago de Compostela). Para ello, se informó verbalmente a los pacientes quienes, además, tuvieron que firmar un informe en el que se explicaban las características del estudio y se solicitaba su consentimiento para participar en el mismo. También se cubrió un formulario con información sobre el sexo y edad del paciente, el tipo de antidepresivo administrado y la posología, otros fármacos incluidos en el tratamiento, así como la fecha y hora a la que se realizó la toma de muestras. En la Figura 17 se muestra un ejemplar del consentimiento informado por escrito firmado por los pacientes, así como el formulario con información relativa al tratamiento y toma de muestras. A cada paciente se le tomó una muestra de plasma y saliva simultáneamente, durante dos semanas consecutivas y a la misma hora tras la toma del fármaco, para

evaluar la existencia o no de correlación entre la concentración plasmática/concentración salival en ambas ocasiones. Una vez realizada la toma de las muestras, éstas fueron almacenadas en nevera hasta su traslado a nuestro laboratorio, donde se congelaron hasta el momento de su análisis.

**Figura. 17.** Ejemplar del consentimiento informado firmado por los pacientes participantes en el estudio y del formulario con la información acerca del tratamiento de cada paciente y la toma de muestra.



**ESTUDIO DE CORRELACIÓN DE NIVELES DE ANTIDEPRESIVOS EN MEDIOS BIOLÓGICOS**

A Ud. se le está preguntando si quiere participar en un estudio de investigación realizado en el departamento de Anatomía Patológica y CC. Forenses para evaluar la correlación entre la concentración de antidepresivos en plasma y saliva.

**CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Entiendo que en el caso de suministrar muestras biológicas:**

- Mi participación es totalmente voluntaria.
- Las muestras solo serán usadas con propósitos de investigación.
- Los resultados serán mantenidos confidencialmente.
- Mis datos de Investigación no se relacionarán con los resultados.
- No hay riesgos conocidos en mi participación.


Sabiendo estas cuestiones firmo este consentimiento, permitiendo la realización del estudio, y por la presente otorgo a los investigadores permiso para obtener las siguientes muestras biológicas:

Saliva..... Plasma.....

Firma de la persona sujeta a Investigación \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

---

Para cualquier aclaración acerca de este estudio, riesgos que se pueden correr, y/o sus derechos puede contactar con las siguientes personas:  
 Prof. Manuel López-Rivadulla Lamas.  
 Ana de Castro Ríos.  
 Universidad de Santiago de Compostela. Instituto de Medicina Legal. Servicio de Toxicología.  
 Teléfono: 981 582327



**ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE ANTIDEPRESIVOS EN MUESTRAS DE SALIVA**  
 Ciencias Forenses. Sección de Toxicología. Facultad de Medicina. USC.  
 Investigadores responsables: Manuel López-Rivadulla Lamas; Ana de Castro Ríos

**Datos de interés a cumplimentar**

Código del paciente: ...../06      Edad: .....      Sexo: .....

Nombre del medicamento: .....      Dosis/veces día: .....

Indicación terapéutica para la que se prescribió el medicamento: .....

¿Toma otros medicamentos? No  Sí  cuáles: .....

**Procedo para la recogida de muestra de saliva y plasma**

**SALIVA:** El dispositivo de recogida de saliva consta de un algodón y un tubo de plástico que se cierra herméticamente con un tapón. La saliva se recogerá introduciendo el algodón en la boca y manteniéndolo hasta que dé la sensación de estar empapado de saliva (normalmente se consigue de 2 a 5 minutos).

**SANGRE:** la sangre debe recogerse en tubo acondicionado con anticoagulante.

La identificación de los tubos se hará escribiendo el código del paciente y el día/hora en el propio tubo.

**Nota importante:** En todos los casos es muy importante almacenar los tubos de saliva bien cerrados y las muestras de sangre temperatura de refrigeración (+ 4 °C).

**Antidepresivos en estudio:** Amitriptilina, Clomipramina, Imipramina, Fluoxetina, Paroxetina, Fluoxamina, Citalopram, Sertralina, Venlafaxina

SEMANA 1	
Fecha: .....	
Hora administración fármaco: .....	
SALIVA	4 horas Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
PLASMA	4 horas Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
SEMANA 2	
Fecha: .....	
Hora administración fármaco: .....	
SALIVA	4 horas Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
PLASMA	4 horas Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>

Para cualquier duda o para la recogida de las muestras avisar a:  
 Ana de Castro      Tfno: 981 58 23 27; 616193000

## 6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.4.1. Separación cromatográfica

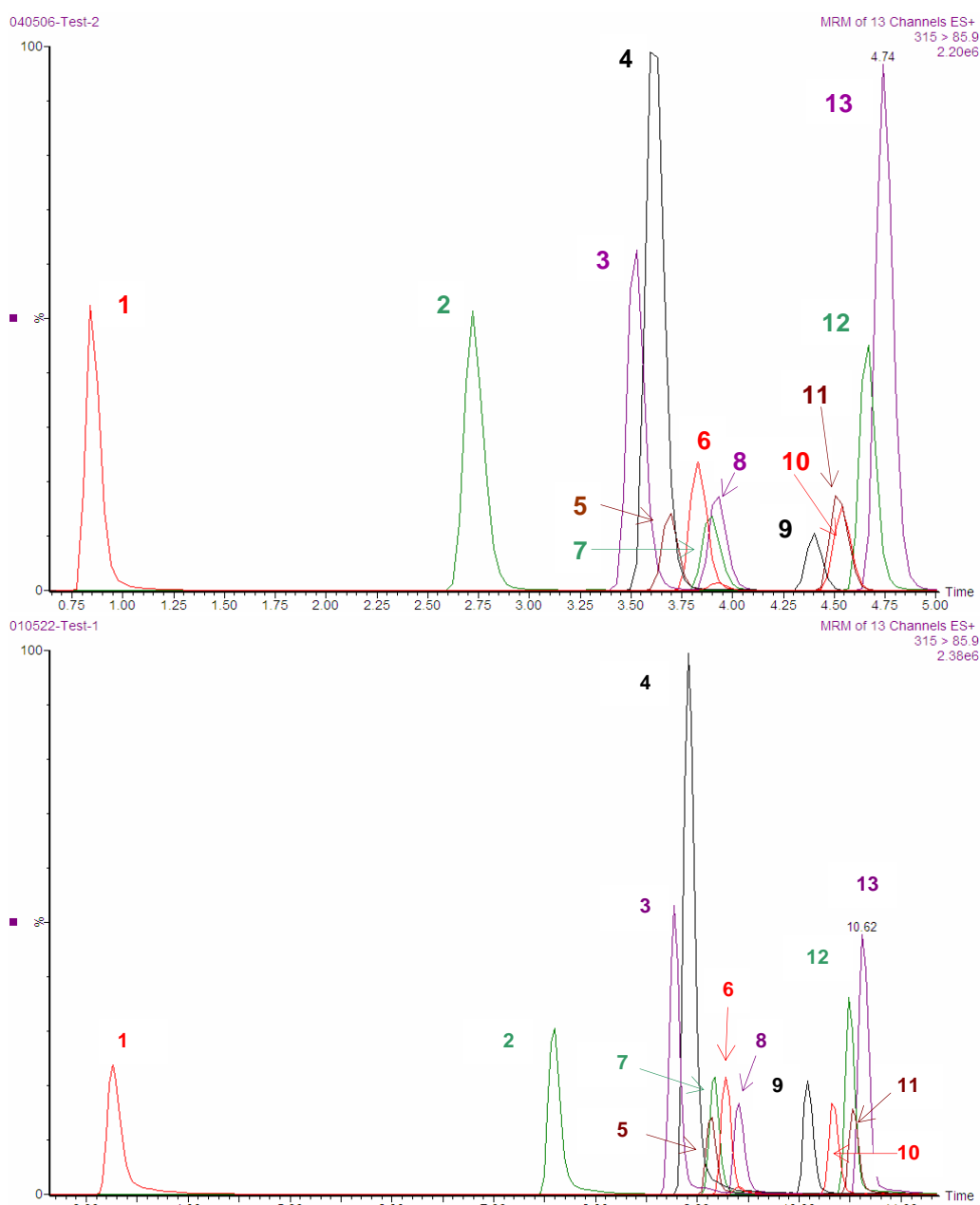
Como se comentó anteriormente, la utilización de un espectrómetro de masas como técnica de detección permite minimizar los requerimientos en cuanto a la separación cromatográfica mediante la selección de las transiciones concretas (o  $m/z$  en un espectrómetro de masas simple) de los compuestos estudiados, ya que no es necesaria la resolución completa entre ellos como ocurre con los demás sistemas de detección acoplados a técnicas cromatográficas. Sin embargo, la posibilidad de que compuestos de la matriz biológica o, incluso, los distintos analitos entre sí compitan en el proceso de ionización, hace que sea necesario establecer una separación entre ellos, sobre todo si la ionización se lleva a cabo mediante ESI, para garantizar la obtención de resultados cuantitativos con adecuada precisión y exactitud.

Para llevar a cabo la separación de los 13 compuestos antidepresivos incluidos en el método, se ensayaron distintas columnas analíticas, todas ellas de fase reversa C18 y de dimensiones entre 100-150mm de longitud. Con todas ellas se obtuvieron resultados similares.

En cuanto a la fase móvil, típicamente en la separación de compuestos de carácter básico mediante cromatografía líquida de fase reversa suelen emplearse fases móviles básicas para favorecer la retención de los analitos en la columna y mejorar la separación. Sin embargo, la ionización de estos compuestos básicos mediante la utilización de interfases API se ve favorecida con la utilización de fases móviles ácidas, por lo que la selección de la misma es un compromiso entre la separación y la señal obtenida. En nuestro caso, la utilización de la mezcla tampón formiato amónico 2mM pH 3/ACN como fase móvil permitió obtener una separación y sensibilidad adecuadas.

La utilización de columnas Intelligent Speed (IS) de menores dimensiones permiten una reducción significativa del tiempo de análisis sin pérdida de resolución, mediante la utilización de flujos superiores sin producirse un aumento de la presión en la columna. Por ello, se seleccionó finalmente

para la separación cromatográfica una columna Sunfire C18 IS (20x2.1mm, 3.5 $\mu$ m). Se trabajo en modo gradiente, con un flujo de fase móvil de 0.4mL/min, sin necesidad de llevar a cabo la división del flujo antes de la entrada en el espectrómetro de masa mediante el aumento del flujo del gas de desolvatación a 800L/h y la temperatura en la fuente de ionización a 400°C. Con estas condiciones, el tiempo de análisis pudo reducirse de 15 a 8 minutos con la utilización de la columna IS (Figura 18).



**Figura 18.** Separación cromatográfica empleando columnas analíticas de diferentes dimensiones. a) Sunfire C18 IS (20x2.1mm, 3.5 $\mu$ m) y b) XBridge C18 (100x2.1mm, 3.5 $\mu$ m). 1:Venlafaxina, 2:Citalopram, 3:Desipramina, 4:Imipramina, 5:Paroxetina, 6:Nortriptilina, 7:Fluvoxamina, 8:Amitriptilina, 9:Norfluoxetina, 10:Sertralina, 11:Fluoxetina, 12:Norclomipramina, 13:Clomipramina.

Bajo las condiciones seleccionadas, la elución de los 13 compuestos antidepresivos se efectuó en 5 minutos, con una duración total del cromatograma de 8 minutos para permitir el equilibrado de la columna con las condiciones iniciales de fase móvil antes de la siguiente inyección. Se obtuvieron así picos con adecuada simetría para todos los compuestos (Figura 19).

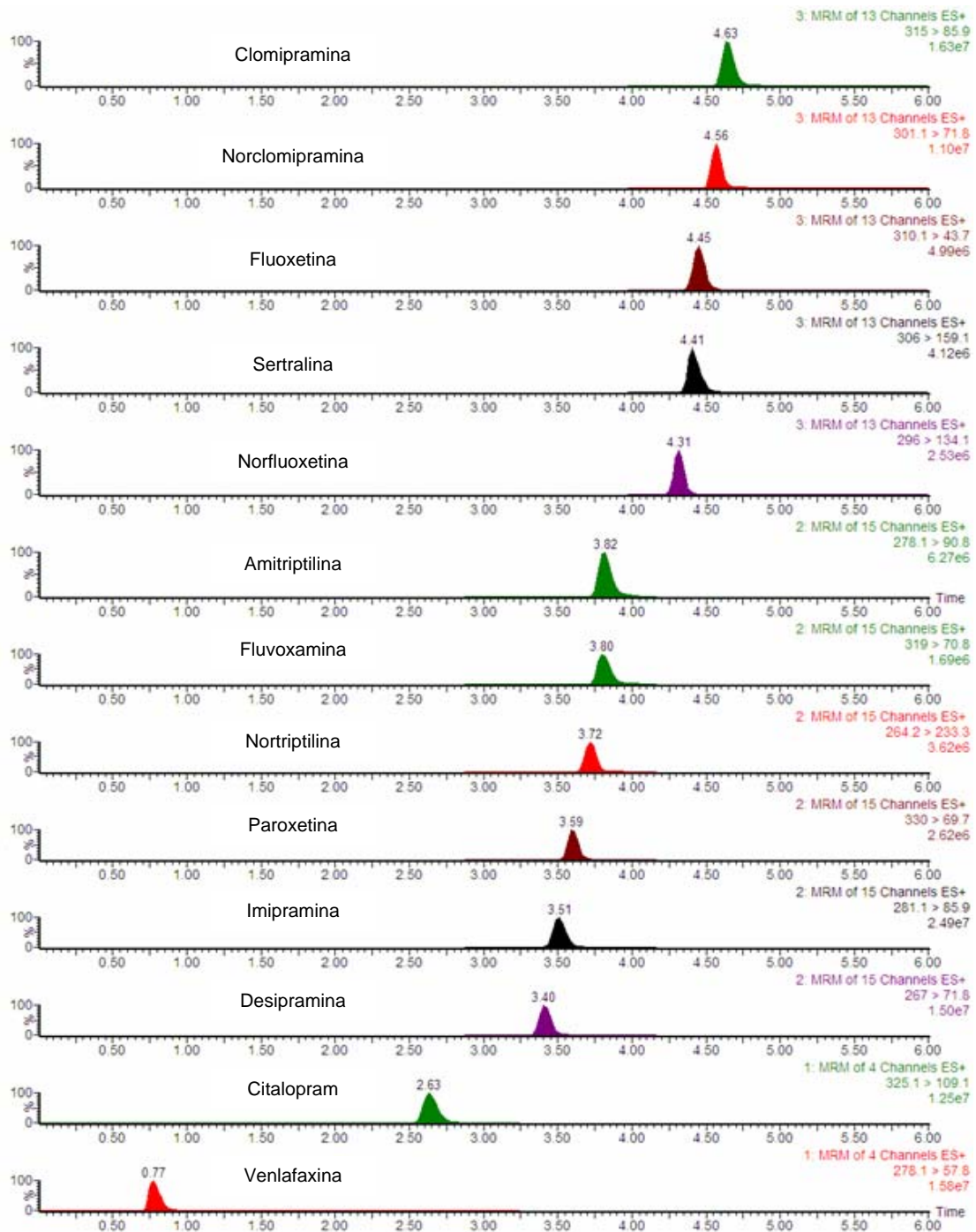


Figura 19. Separación de los 13 antidepresivos bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas.

Como se comentó anteriormente en el capítulo 3, la mayoría de los métodos analíticos en los que se utilizó LC-MS(/MS) para la determinación de antidepresivos incluyeron sólo unos pocos compuesto y sus principales metabolitos, generalmente, pertenecientes a la misma familia, para su análisis simultáneo.

En la mayoría de los casos se emplearon columnas de fase reversa C18 ó C8, utilizando fases móviles a pH ácido. También se han utilizado columnas de sílice con mecanismos de interacción hidrofílica (HILIC), que permiten la retención de compuestos polares utilizando altos porcentajes de disolvente orgánico en la composición de la fase móvil [19,20]. En un caso se ha descrito la utilización de una columna quiral para la separación de los enantiómeros de Fluoxetina [21]. La fase móvil consistió generalmente en una mezcla de ácido fórmico, acético o sus tampones amonio con acetonitrilo o metanol.

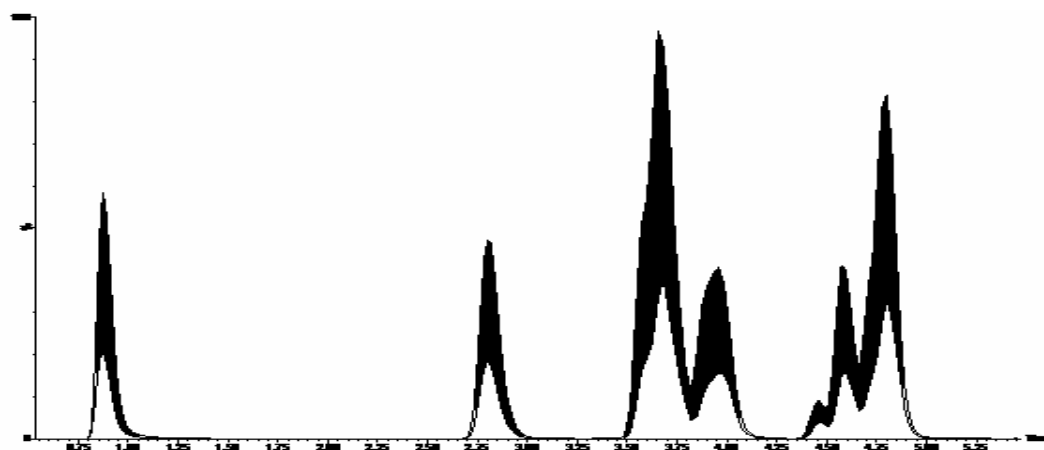
Gutteck y col. desarrollaron un método para la determinación de los principales ADTs y dos antidepresivos pertenecientes al grupo de los ISRSs en el que la separación se efectuó 10 minutos. Los compuestos se dividieron en cuatro grupos, utilizando para cada uno de ellos distintos volúmenes de reconstitución y patrones internos [22]. Sauvage y col. han publicado una método para la cuantificación de ADTs y ISRSs con una duración cromatográfica de 5.58 minutos, en el que los compuestos también fueron divididos en dos grupos, utilizando ligeras modificaciones en el método cromatográfico empleado para cada uno de ellos, haciéndose necesarias 2 inyecciones para el análisis de todos los compuestos [23]. Recientemente, Shinozuka y col. han llevado a cabo la determinación de 20 antidepresivos pertenecientes a distintas familias con un tiempo de análisis de 30 minutos [24]. Asimismo, Kirchherr y col. han desarrollado un método que permite la TDM de 48 antidepresivos y antipsicóticos empleando la misma metodología analítica, si bien la validación del mismo se llevó a cabo estableciendo tres grupos de compuestos según el rango terapéutico de cada uno de ellos [25].

El método propuesto en este trabajo permite la determinación de 13 de los antidepresivos de mayor importancia clínica en el mismo análisis, en un tiempo muy reducido de tan sólo 8 minutos.

#### 6.4.2. Detección mediante espectrometría de masas en tandem

La señal obtenida mediante la utilización de ESI y APCI, en modo positivo y negativo, se ensayó mediante la infusión de los compuestos disueltos en fase móvil (10µg/mL) con una bomba jeringa en “T” con el sistema cromatográfico, como se indicó previamente en descripción de la metodología analítica. Finalmente, se seleccionó como interfase ESI+, y se optimizaron los parámetros de la fuente (Tabla 11, página 154). ESI+ ha sido la interfase empleada en la mayoría de los métodos de LC-MS(/MS) desarrollados para la determinación de antidepresivos, aunque también se ha descrito la utilización de APCI [22,26,27] y, en una ocasión, de SSI [24], también en modo positivo.

Generalmente, la energía de capilar empleada en ESI en los equipos de LC-MS de Micromass (Waters Corp.) es de 2-3kV, de forma que llama particularmente la atención la mayor señal obtenida para todos los compuestos aplicando una energía de capilar relativamente baja, de 0.5kV, observada tanto en el estudio inicial de infusión de los compuestos directamente al masas, como en su detección después de la separación cromatográfica (Figura 20).

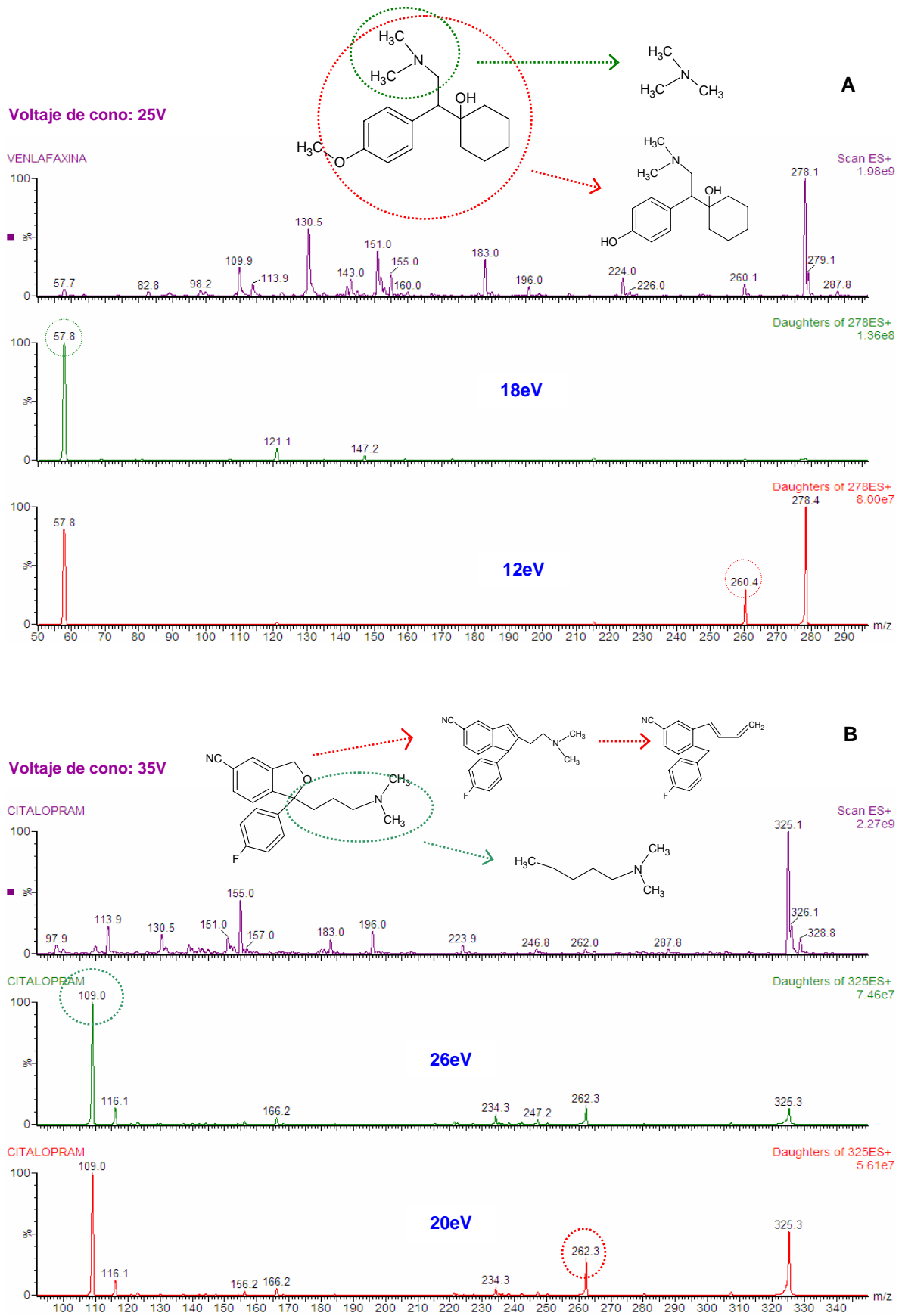


**Figura 20.** Superposición de cromatogramas (*Total ion current*, TIC) obtenidos tras la inyección de los compuestos disueltos en fase móvil aplicando un voltaje de capilar de 0.5kV (fondo negro) y de 3kV (fondo blanco).

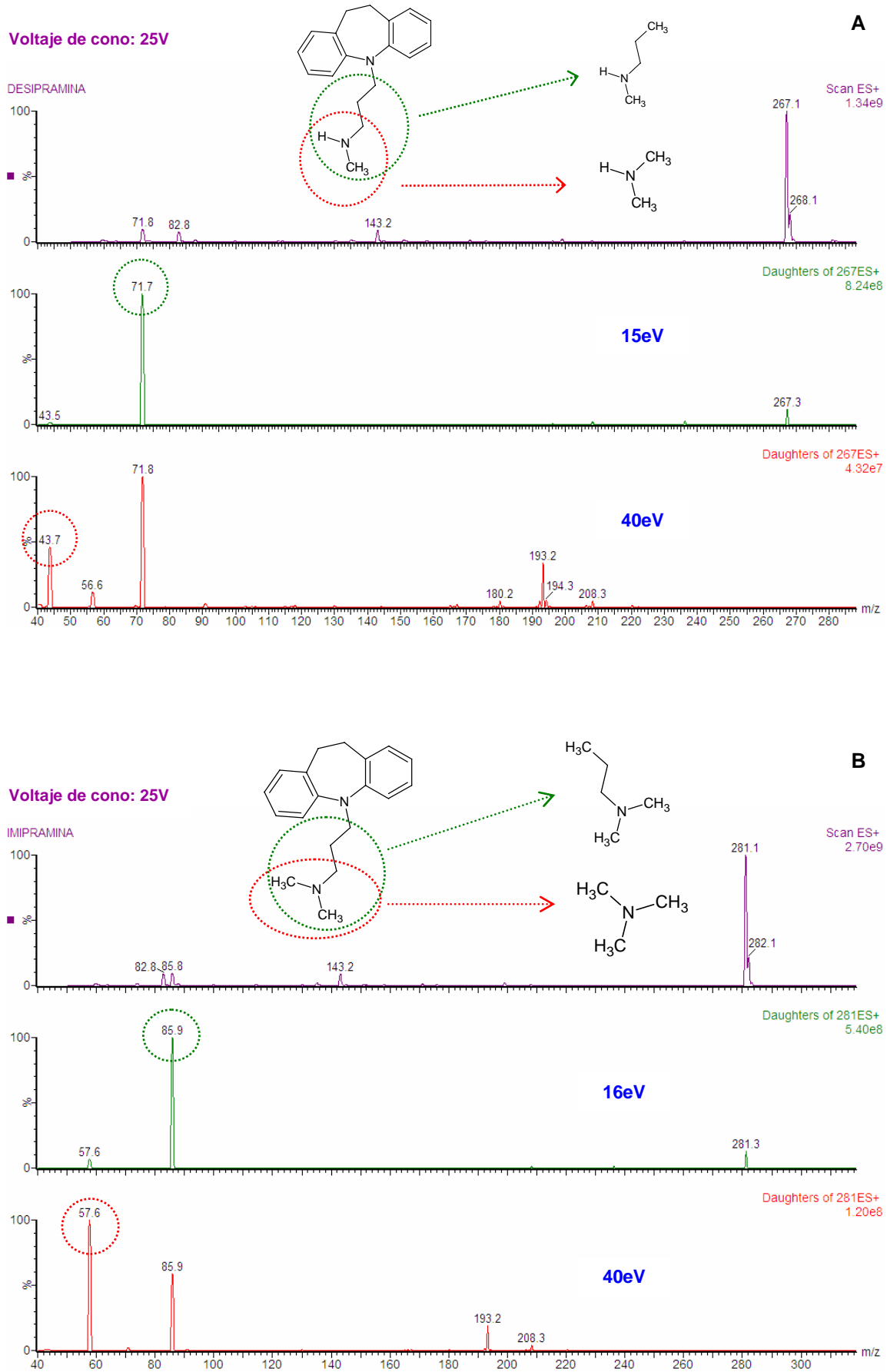
En las interfases de ionización a presión atmosférica (API) se produce la ionización suave de los compuestos, siendo el ion pseudomolecular  $[M+H]^+$  o  $[M+H]^-$  (según se trabaje en modo positivo o negativo) la especie mayoritaria. En un espectrómetro de masas simple, la utilización de la técnica de *disociación por colisión inducida* (CID), que consiste en la aceleración de las moléculas mediante la aplicación de un voltaje en la región de presión intermedia, permite aumentar la selectividad en la detección mediante la obtención de fragmentos de la molécula. En un espectrómetro en tandem, empleado en este trabajo, la fragmentación del ion pseudomolecular seleccionado en el primer cuadrupolo puede realizarse en la celda de colisión situada a continuación, mediante la utilización de un gas inerte y la aplicación de una energía de colisión determinada, separándose los iones “hijos” en el segundo analizador. De esta forma, con un espectrómetro de masas en tandem se consigue disminuir el ruido de fondo (aumentando con ello la relación señal/ruido) y aumentar de forma significativa la selectividad, ya que la detección se basa finalmente en la selección de iones “hijos” procedentes de un determinado ion pseudomolecular (ion “padre”). A esta combinación de pares de  $m/z$ , ion “padre”-ion “hijo”, se le denomina transición. El modo de trabajo basado en la selección de determinadas transiciones se denomina Multiple Reaction Monitoring (MRM), y es el empleado generalmente en el desarrollo de métodos cuantitativos.

En nuestro trabajo, el ion pseudomolecular se utilizó como “ion padre” para todos los compuestos, seleccionando el voltaje de cono con el que obtener la señal de mayor intensidad para cada uno de ellos. Para establecer las transiciones que serían empleadas en la detección, se seleccionó el ion “padre” en el primer cuadrupolo y se hizo un scan de los iones “hijos” en el segundo, aplicando diferentes energías de colisión. Para la detección de cada compuesto se emplearon dos transiciones, una cuantitativa y otra cualitativa, excepto para los patrones internos, para los que una sola transición fue monitorizada. En las Figuras 21-30 se muestran los espectros de masas para cada compuesto, así como el de los fragmentos (iones “hijos”) a las energías de colisión seleccionados en cada caso. Asimismo, se indica el patrón de fragmentación propuesto para cada compuesto.

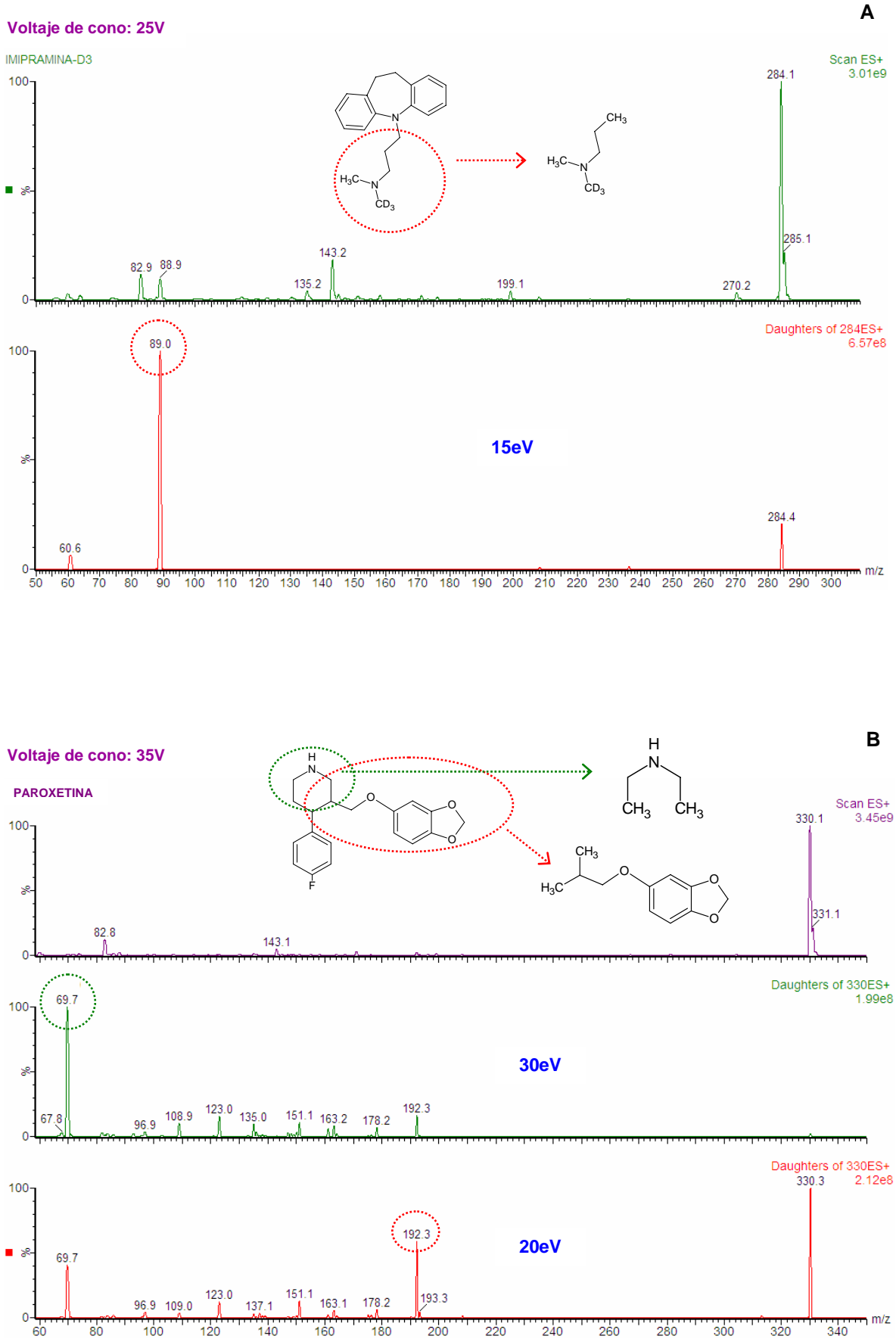




**Figura 21.** Espectro de masas de Venlafaxina (A) y Citalopram (B). Para ambos compuestos, en el espectro superior se muestra el ion "padre" y el voltaje de cono seleccionado. En los dos espectros inferiores, los iones "hijos" y las energías de colisión con las que se obtuvo la señal más intensa para cada uno de ellos.

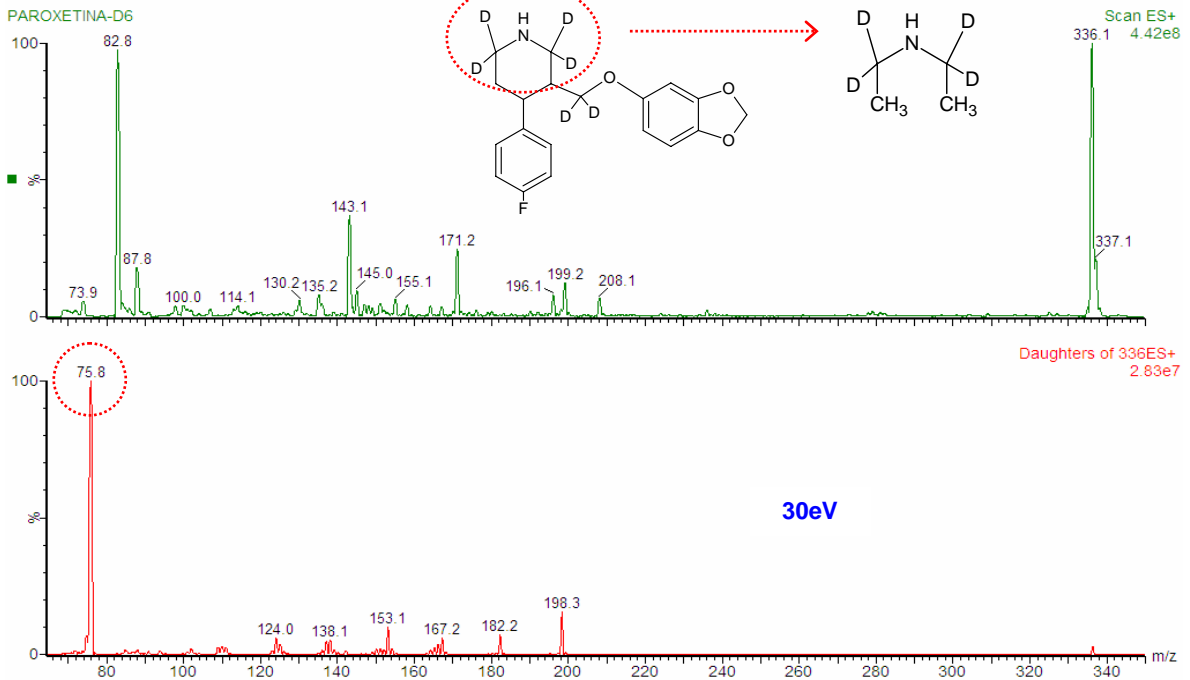


**Figura 22.** Espectro de masas de **Desipramina (A)** e **Imipramina (B)**. Para ambos compuestos, en el espectro superior se muestra el ion "padre" y el voltaje de cono seleccionado. En los dos espectros inferiores, los iones "hijos" y las energías de colisión con las que se obtuvo la señal más intensa para cada uno de ellos.

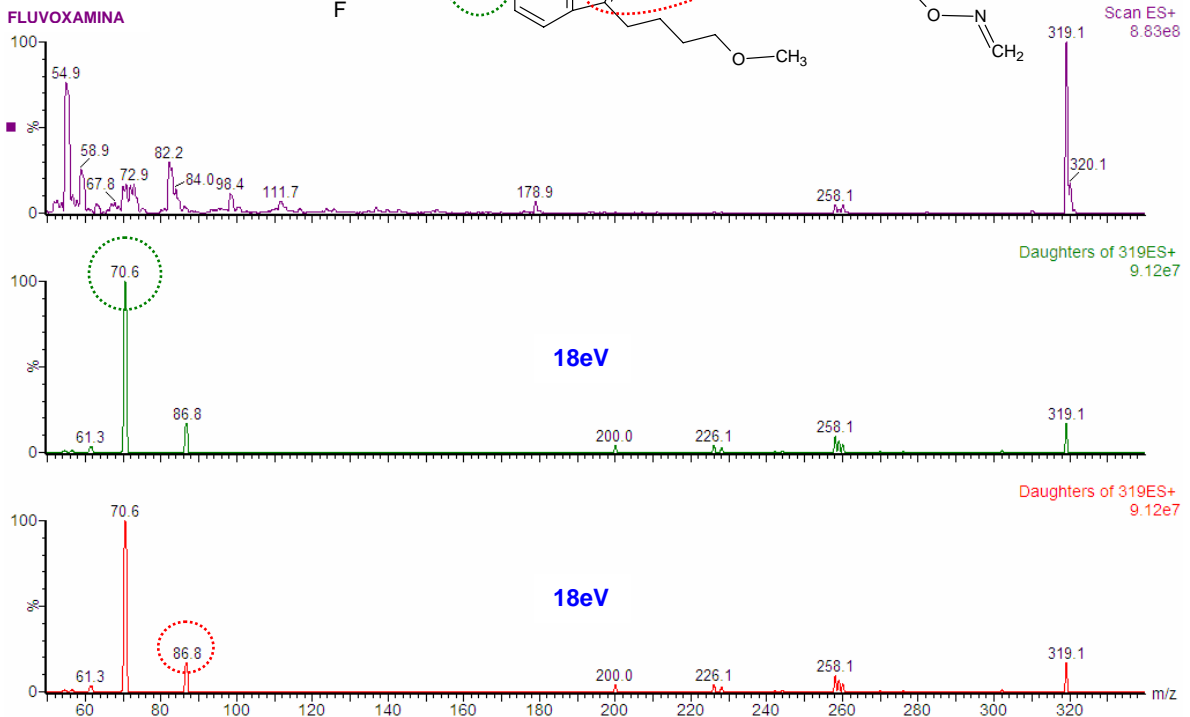


**Figura 23.** Espectro de masas de Imipramina-d3 (A) y Paroxetina (B). Para ambos compuestos, en el espectro superior se muestra el ion “padre” y el voltaje de cono seleccionado. En el(los) espectro(s) inferior(es), el(los) ion(es) “hijo(s)” y la(s) energía(s) de colisión que dan lugar a la señal más intensa.

Voltaje de cono: 35V



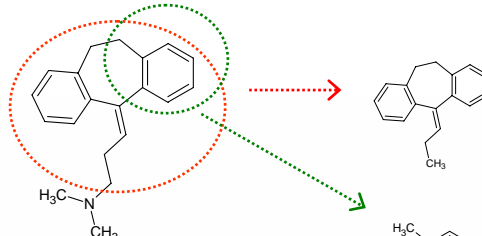
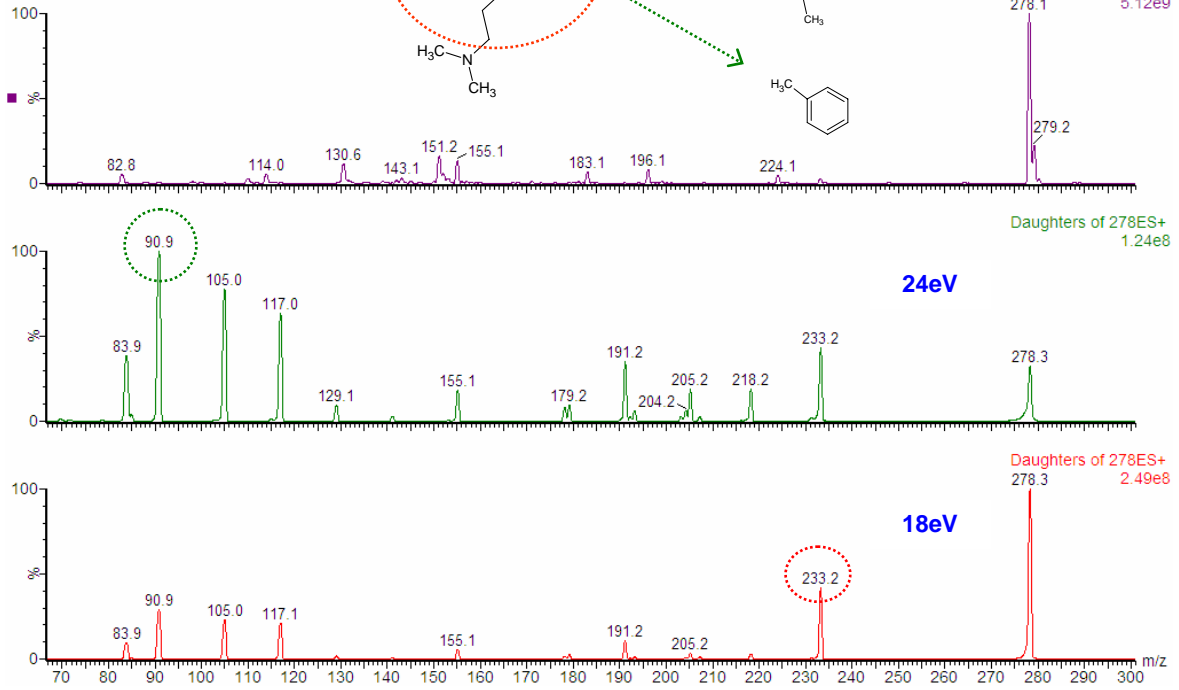
Voltaje de cono: 25V



**Figura 24.** Espectro de masas de Paroxetina-d6 (A) y Fluvoxamina (B). Para ambos compuestos, en el espectro superior se muestra el ion "padre" y el voltaje de cono seleccionado. En el(los) espectro(s) inferior(es), el(los) ion(es) "hijo(s)" y la(s) energía(s) de colisión que dan lugar a la señal más intensa.

Voltaje de cono: 30V

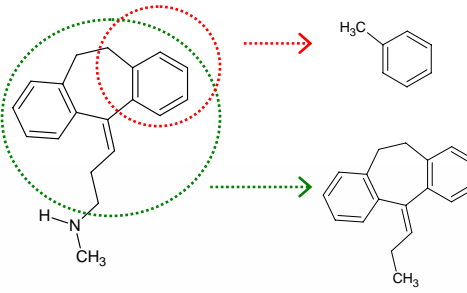
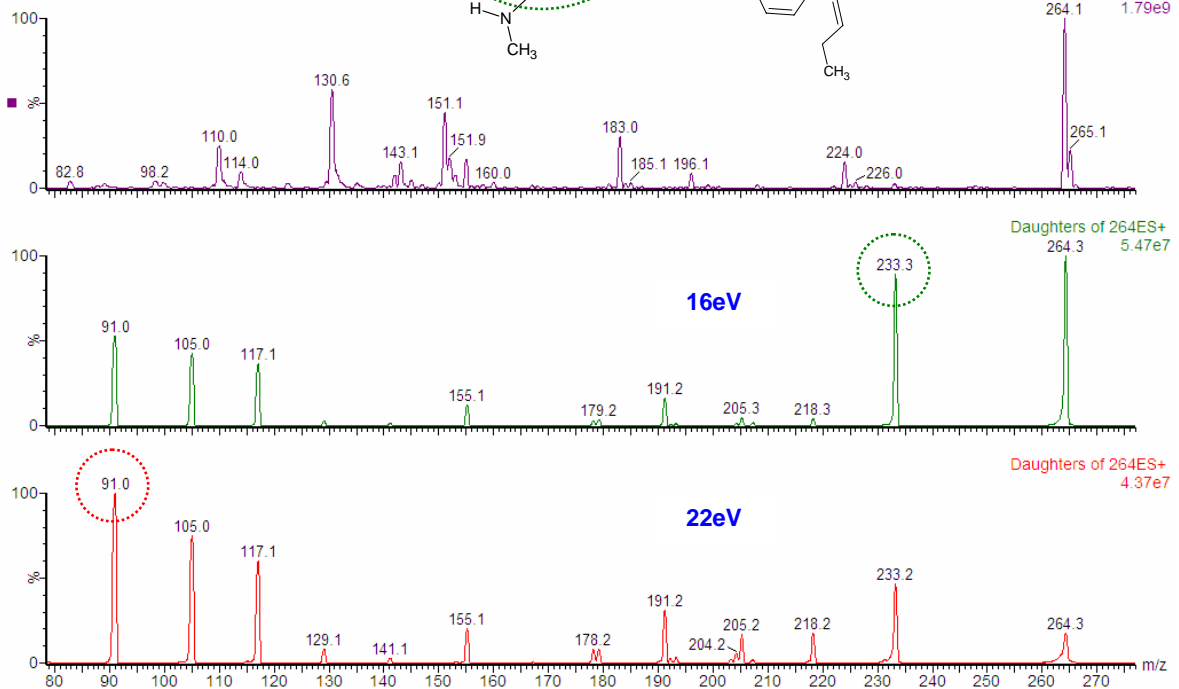
AMITRIPTILINA



A

Voltaje de cono: 25V

NORTRIPTILINA

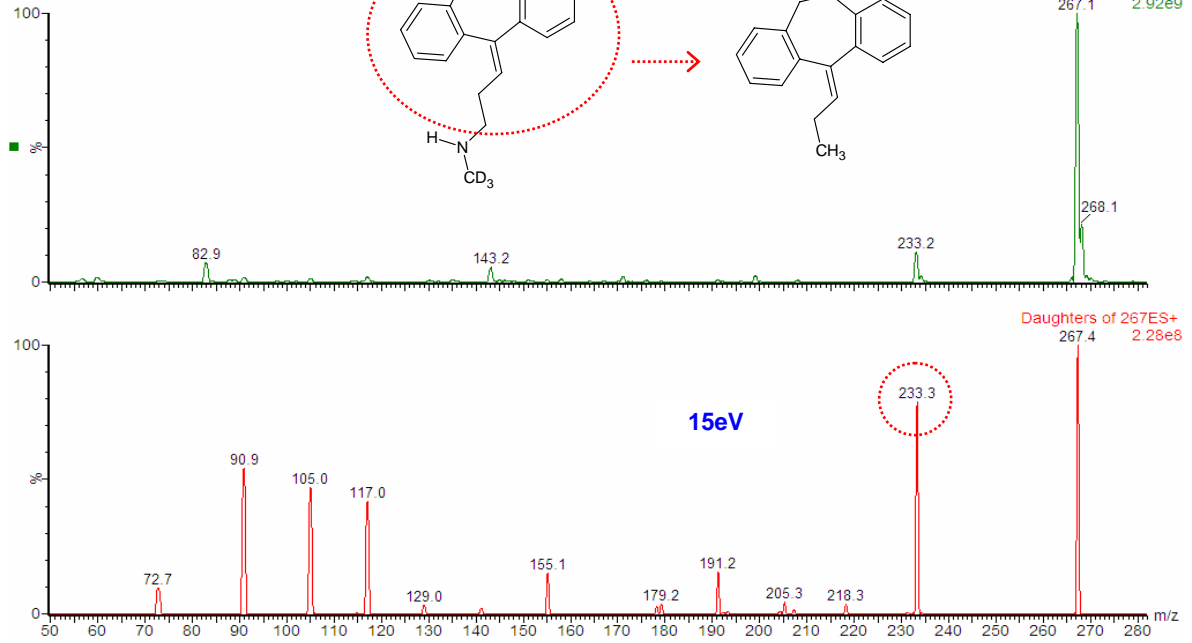


B

Figura 25. Espectro de masas de Amitriptilina (A) e Nortriptilina (B). Para ambos compuestos, en el espectro superior se muestra el ion "padre" y el voltaje de cono seleccionado. En los dos espectros inferiores, los iones "hijos" y las energías de colisión con las que se obtuvo la señal más intensa para cada uno de ellos.

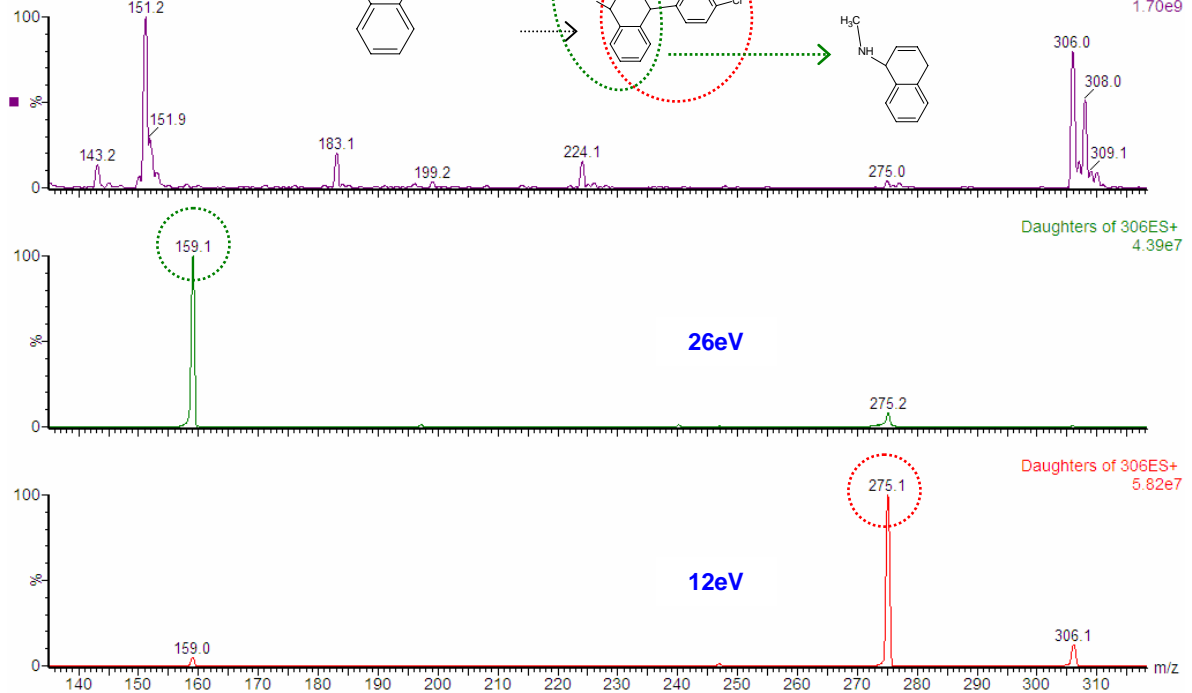
Voltaje de cono: 30V

NORTRIPTILINA-D3

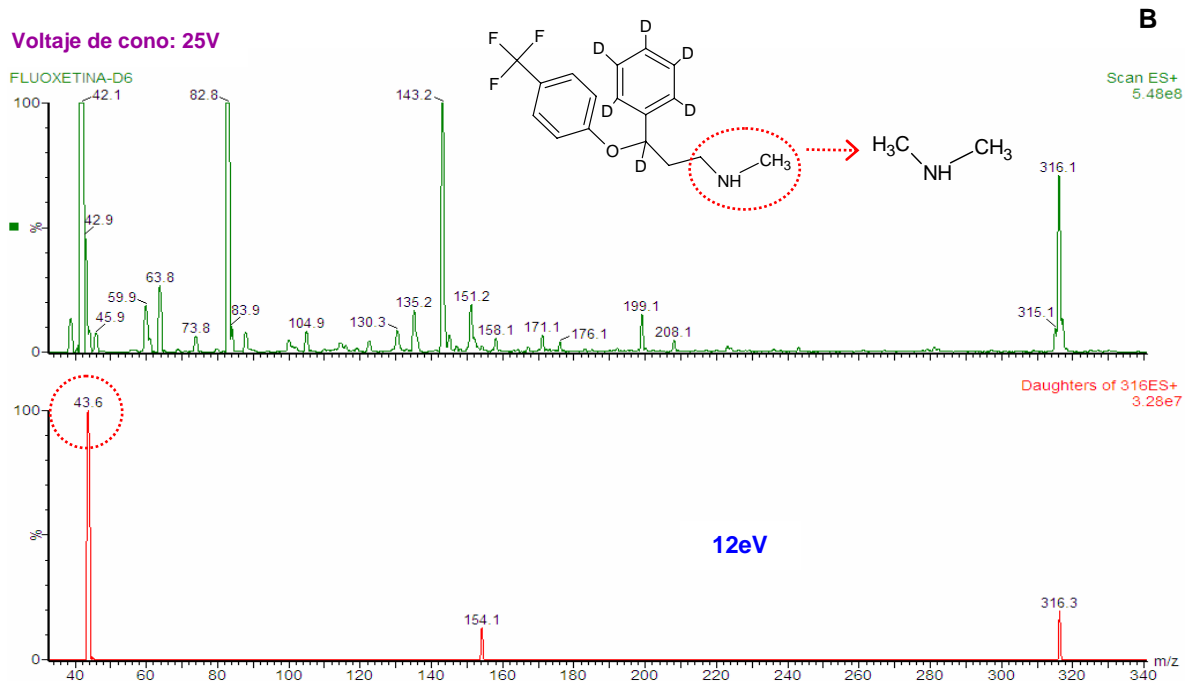
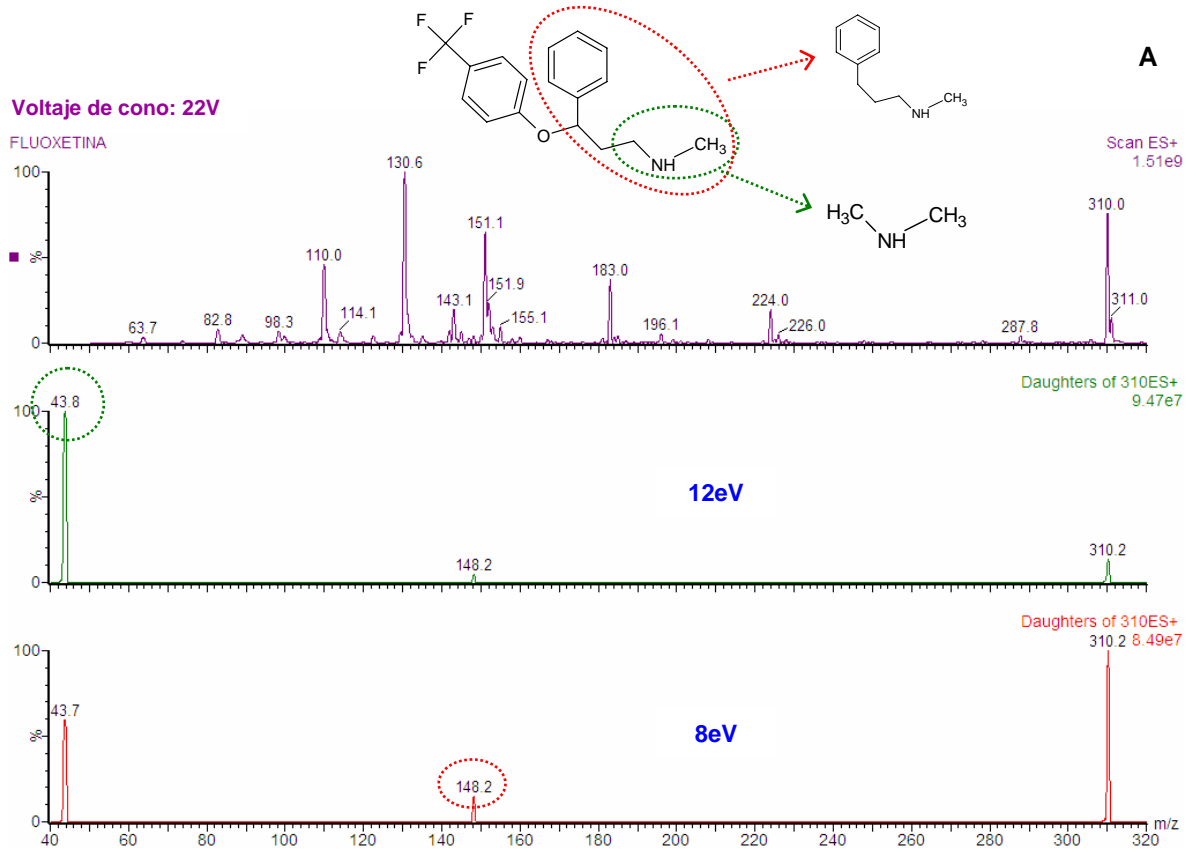


Voltaje de cono: 18V

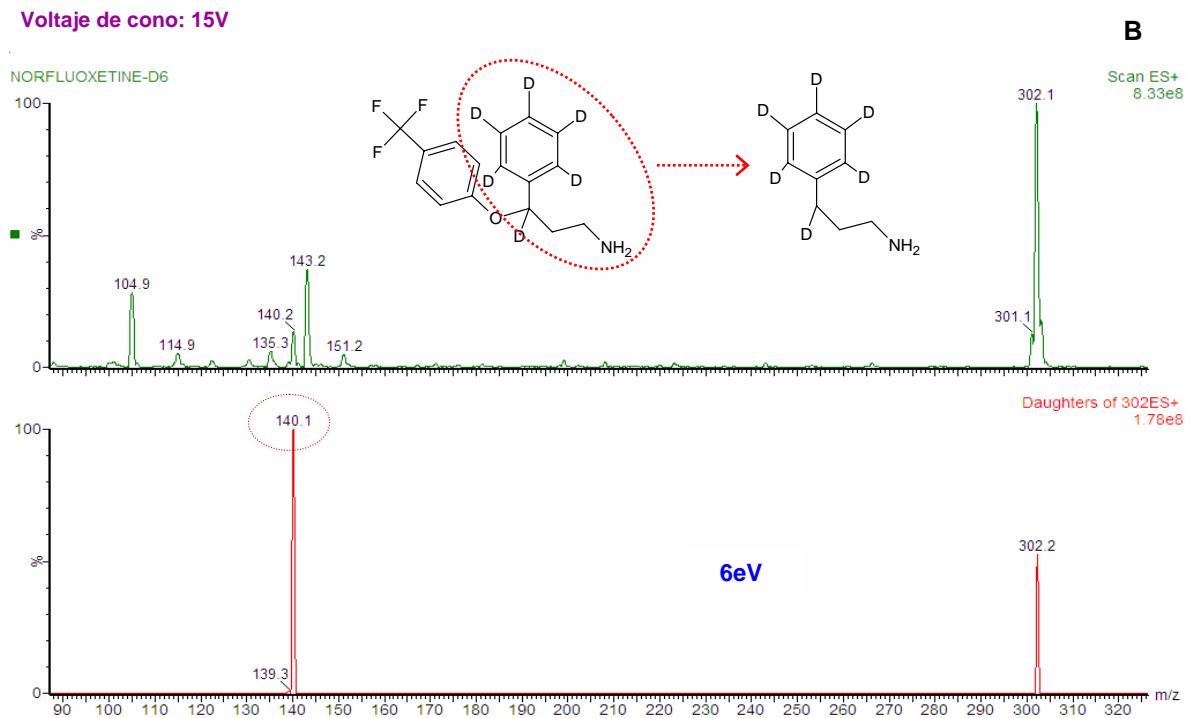
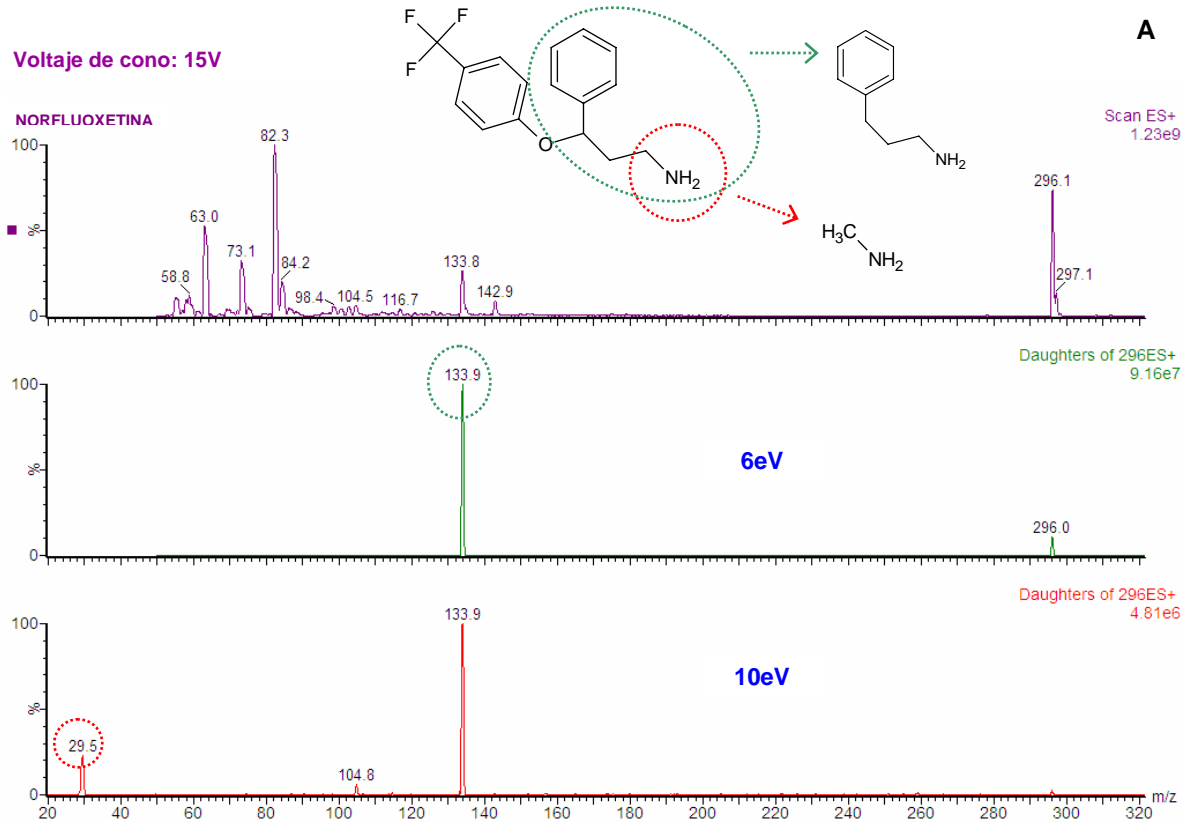
SERTRALINA



**Figura 26.** Espectro de masas de Nortriptilina-d3 (A) y Sertralina (B). Para ambos compuestos, en el espectro superior se muestra el ion "padre" y el voltaje de cono seleccionado. En el(los) espectro(s) inferior(es), el(los) ion(es) "hijo(s)" y la(s) energía(s) de colisión que dan lugar a la señal más intensa.

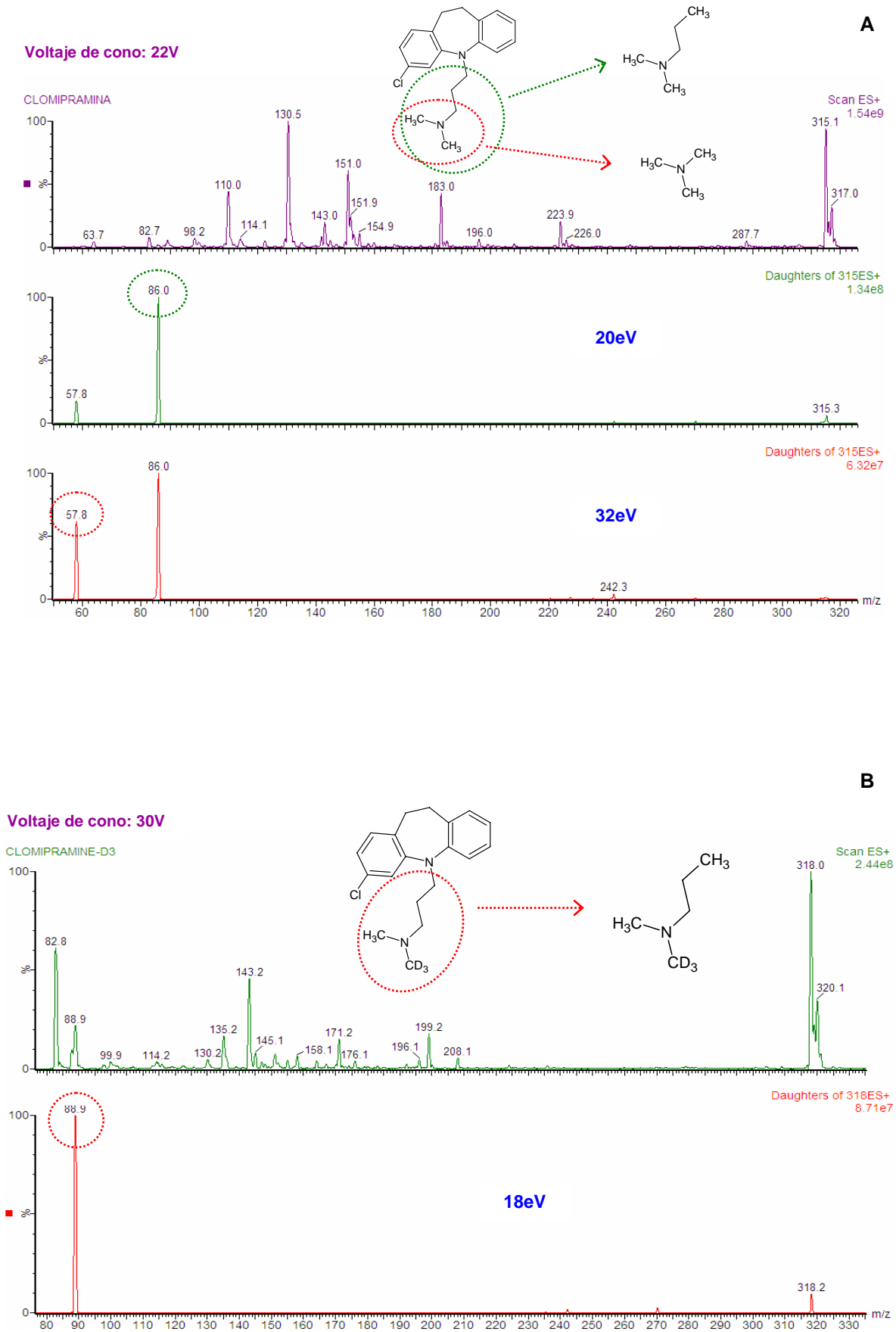


**Figura 27.** Espectro de masas de **Fluoxetina (A)** y **Fluoxetina-d6 (B)**. Para ambos compuestos, en el espectro superior se muestra el ion “padre” y el voltaje de cono seleccionado. En el(los) espectro(s) inferior(es), el(los) ion(es) “hijo(s)” y la(s) energía(s) de colisión que dan lugar a la señal más intensa.

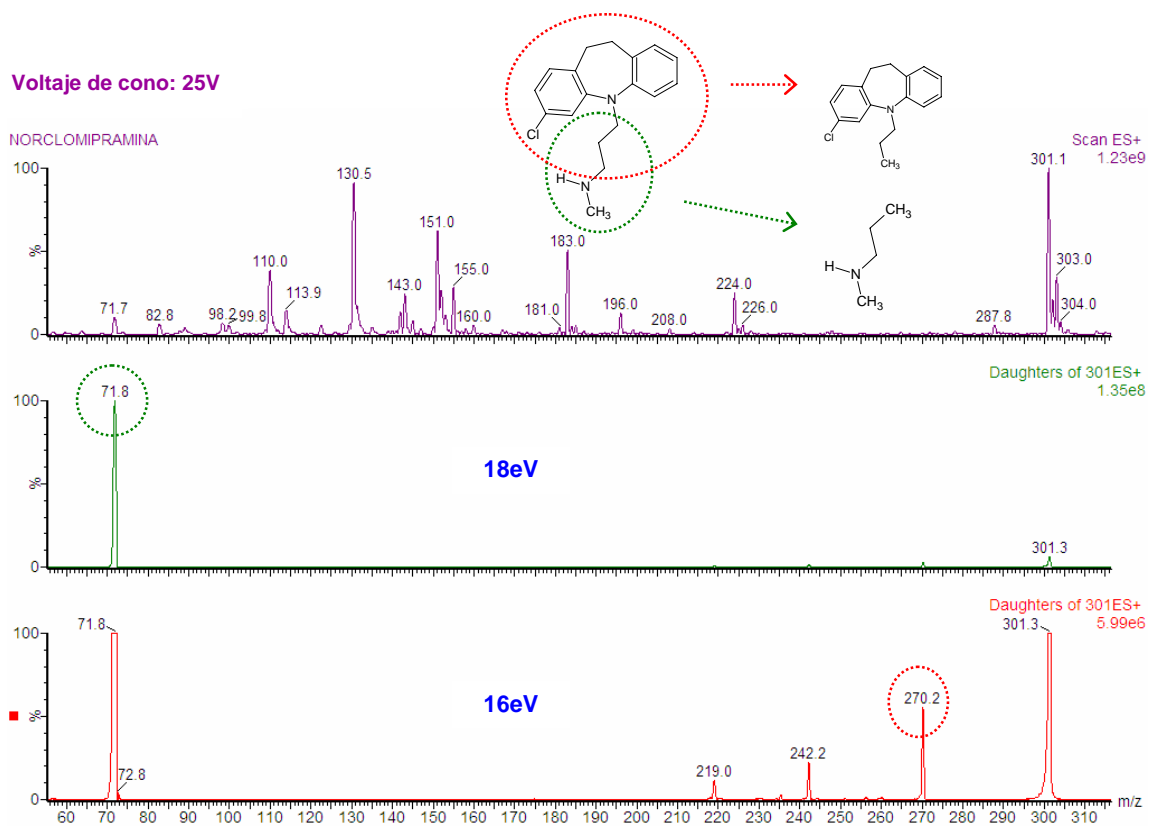


**Figura 28.** Espectro de masas de **Norfluoxetina (A)** y **Norfluoxetina-d6 (B)**. Para ambos compuestos, en el espectro superior se muestra el ion "padre" y el voltaje de cono seleccionado. En el(los) espectro(s) inferior(es), el(los) ion(es) "hijo(s)" y la(s) energía(s) de colisión que dan lugar a la señal más intensa.





**Figura 29.** Espectro de masas de **Clomipramina (A)** y **Clomipramina-d3 (B)**. Para ambos compuestos, en el espectro superior se muestra el ion “padre” y el voltaje de cono seleccionado. En el(los) espectro(s) inferior(es), el(los) ion(es) “hijo(s)” y la(s) energía(s) de colisión que dan lugar a la señal más intensa.



**Figura 30.** Espectro de masas de **Norclomipramina**. En el espectro superior se muestra el ion “padre” y el voltaje de cono seleccionado. En los dos espectros inferiores, los iones “hijos” y las energías de colisión con las que se obtuvo la señal más intensa para cada uno de ellos.

Como se indicó anteriormente, el modo de detección utilizado fue MRM. Para garantizar la reproducibilidad del área bajo la curva obtenida para cada transición seleccionada es necesario que cada una de ellas se adquiriera con un mínimo de 10-14 *scans*. Por ello, en el método de masas suelen establecerse *ventanas o funciones*, monitorizando en cada una de ellas las transiciones de determinados compuestos en función de su tiempo de retención. Otro parámetro que debe seleccionarse es el *dwell time*, que es el tiempo durante el cual se adquiere una determinada transición. En la Tabla 14 se muestra el método MRM utilizado, indicando el voltaje de cono aplicado a cada compuesto, las 2 transiciones y las energías de colisión seleccionadas para cada uno de ellos, el *dwell time* y el tiempo de retención.

Tabla 14. Método de MRM utilizado en la detección de los compuestos en estudio.

Función	Compuesto	VC	transición	EC	dwel time	t <sub>R</sub>	PI
Función 1: 4 transiciones	Venlafaxina	25	<u>278.1&gt;57.8</u>	18	0.15	0.77	Imipramina-d3
			278.1>260.3	12	0.15		
	Citalopram	35	<u>325.1&gt;109.1</u>	26	0.15	2.63	Imipramina-d3
			325.1>262.1	20	0.15		
Función 2: 15 transiciones	Desipramina	25	267>43.8	40	0.05	3.4	Nortriptilina-d3
			<u>267&gt;71.8</u>	15	0.05		
	Imipramina	25	281.1>57.6	40	0.05	3.51	Imipramina-d3
			<u>281.1&gt;85.9</u>	16	0.05		
	Paroxetina	35	<u>330&gt;69.7</u>	30	0.05	3.61	Paroxetina-d6
			330>192.3	20	0.05		
	Nortriptilina	25	264.2>90.8	22	0.05	3.72	Nortriptilina-d3
			<u>264.2&gt;233.3</u>	16	0.05		
	Fluvoxamina	25	<u>319&gt;70.8</u>	18	0.05	3.8	Paroxetina-d6
			319>86.8	18	0.05		
	Amitriptilina	30	<u>278.1&gt;90.8</u>	24	0.05	3.82	Imipramina-d3
			278.1>233.2	18	0.05		
	Imipramina-d3	25	284.1>89	15	0.05	3.51	
	Paroxetina-d6	35	336.1>76	30	0.05	3.59	
	Nortriptilina-d3	30	267.1>233.3	15	0.05	3.72	
Función 3: 13 transiciones	Norfluoxetina	15	296>29.8	10	0.05	4.31	Norfluoxetina-d6
			<u>296&gt;134.1</u>	6	0.05		
	Sertralina	18	<u>306&gt;159.1</u>	26	0.05	4.41	Fluoxetina-d6
			306>275.1	12	0.05		
	Fluoxetina	22	<u>310.1&gt;43.7</u>	12	0.05	4.45	Fluoxetina-d6
			310.1>148.2	8	0.05		
	Norclomipramina	25	<u>301.1&gt;71.8</u>	18	0.05	4.46	Fluoxetina-d6
			301.1>270.2	16	0.05		
	Clomipramina	22	315>57.8	32	0.05	4.63	Clomipramina-d3
			<u>315&gt;85.9</u>	20	0.05		
	Norfluoxetina-d6	15	302.2>140.1	6	0.05	4.27	
	Fluoxetina-d6	25	316.1>43.7	12	0.05	4.41	
	Clomipramina-d3	30	318.1>88.9	18	0.05	4.63	

Las transiciones subrayadas son las que se emplearon como cuantificadoras.

VC: voltaje de cono (V); EC: energía de colisión (eV); t<sub>R</sub>: tiempo de retención (min); PI: patrón interno utilizado para cada compuesto.

Los dos analizadores del espectrómetro de masas en tandem empleado en la elaboración de este método analítico fueron cuadrupolos. Este fue el tipo de espectrómetro utilizado en la mayoría de los métodos desarrollados para la determinación cuantitativa de antidepresivos [15,18,21,23,25,28-32]. Se ha publicado un trabajo en el que se utiliza un espectrómetro en tandem en el que uno de los analizadores es un tiempo de vuelo y el otro un cuadrupolo [33]. Otros autores han empleado espectrómetros de masas con un solo analizador, pudiendo ser éste un cuadrupolo simple, un tiempo de vuelo o una trampa de iones [20,22,24,34,35].

#### **6.4.3. Procedimiento de extracción**

Se probaron inicialmente extracciones líquido-líquido con distintos disolventes de extracción, como metil-tert-butil-éter, éter dietílico, acetato de etilo y hexano, tras la alcalinización previa de la muestra, obteniéndose los mejores resultados con los dos primeros.

La adquisición posterior del sistema de SPE automático ASPEC XL, hizo que nos decantásemos por este tipo de extracción a pesar de los buenos rendimientos obtenidos con la extracción líquido-líquido. Este sistema de extracción automático requiere una manipulación mínima de la muestra, ya que el propio sistema realiza, incluso, la adición del patrón interno y del tampón que deben ser incorporados antes de la extracción, lo que permite optimizar de forma importante el tiempo empleado por el personal en el tratamiento de la muestra.

Se probaron dos tipos de relleno para realizar la SPE: cartuchos Oasis<sup>®</sup> HLB, con relleno de fase reversa, indicado para llevar a cabo una extracción general de compuestos con distintas propiedades ácido-base, y los cartuchos Oasis<sup>®</sup> MCX que, además del mecanismo de fase reversa, actúan a través de un mecanismo de intercambio catiónico, siendo, por tanto, más específicos para la extracción de compuestos de naturaleza alcalina. Éste último relleno fue el seleccionado en la metodología analítica que se describe ya que, además de permitir una extracción más específica, dio lugar a mejores rendimientos de extracción para la mayor parte de los compuestos. Para favorecer la retención

de nuestros analitos mediante el mecanismo de intercambio catiónico, éstos deben estar en forma ionizada, por lo que la muestra se acidificó previamente con tampón acetato sódico a pH 3.6. Siguiendo el mismo argumento, la elución se llevó a cabo en medio alcalino para favorecer la presencia de los compuestos en forma no ionizada. Como disolvente de elución se empleó inicialmente metanol; sin embargo, la aparición de un importante efecto matriz para algunos compuestos hizo que se sustituyera este disolvente por una mezcla de menor fuerza iónica compuesta por diclorometano/isopropanol, que eliminó la presencia de este fenómeno, ofreciendo un buen compromiso entre el rendimiento de la extracción y el efecto matriz. Con estas condiciones, se llevó a cabo la extracción a partir de tan sólo 200µL de muestra, tanto en el caso de plasma como de fluido oral.

Un problema que surgió inicialmente con la utilización del ASPEC XL fue la contaminación del sistema con todos los compuestos estudiados. A pesar de que la señal originada por la contaminación era diez veces inferior a la producida por los compuestos a concentración de 2ng/mL (LOQ para la mayoría de los compuestos), se observaban todas las transiciones monitorizadas (tanto las cuantificadoras como las cualificadoras) tras la extracción de una muestra blanco. Este problema se solucionó mediante la incorporación de tres lavados de la aguja del sistema tras la extracción: dos con metanol con 0.5% de amoníaco, y un último lavado con metanol.

En cuanto a las técnicas empleadas por otros autores en la extracción de antidepresivos, las utilizadas con más frecuencia han sido las extracciones líquido-líquido y las extracciones en fase sólida, en la mayoría de los casos para un número limitado de compuestos, generalmente pertenecientes al mismo grupo antidepresivo. Se han descrito procedimientos de extracción líquido-líquido en medio básico, empleando distintos disolventes orgánicos como hexano, diclorometano, alcohol isoamílico, éter dietílico, acetato de etilo, o mezclas de ellos [22,28,34,36-39]. Para llevar a cabo las extracciones en fase sólida se han empleado, generalmente, sorbentes basados en mecanismos de fase reversa como los C8 ó C18, así como los Oasis<sup>®</sup> HLB rellenos de un copolímero hidrofílico-lipofílico [18,24,40,41,42]. Debido al carácter básico de

estos compuestos, también se ha empleado en la extracción de estos compuestos sorbentes en modo mixto como los Bond Elut Certify<sup>®</sup> y los Oasis<sup>®</sup> MCX, que llevan a cabo la retención de los compuestos por un mecanismo de fase reversa y un mecanismo de intercambio catiónico [43].

Otras técnicas que han sido empleadas en menor número de ocasiones son la microextracción en fase sólida (SPME) [44,45], así como soportes con distintos rellenos (RAM, LPS, soportes monolíticos) acoplados al sistema cromatográfico, que permiten llevar a cabo la inyección directa de la muestra [15,23,26,27]. En el capítulo siguiente de este trabajo se describe la utilización de un sistema de SPE en línea, que realiza todo el proceso de extracción de la muestra y el posterior acoplamiento al sistema cromatográfico automáticamente [46].

#### **6.4.4 Resultados y discusión del estudio de validación del método**

##### **6.4.4.1 Selectividad**

La selectividad del método analítico fue evaluada, como se comentó anteriormente, a varios niveles.

Para descartar interferencias producidas por compuestos endógenos de la matriz biológica se analizaron muestras blanco de plasma y fluido oral procedentes de 10 individuos distintos, siguiendo el procedimiento descrito en la metodología analítica. En la Figura 31 se muestran los cromatogramas de las transiciones cuantificadoras de todos los compuestos incluidos en el método tras el análisis de un blanco de plasma y saliva, observándose la ausencia de interferencias para todos ellos.

La posible contribución de los patrones internos a la señal originada por sus análogos sin deuterar se descartó tras el análisis de muestras blanco conteniendo únicamente patrón interno cada vez que se preparó una curva de calibrado.

En la depresión suelen prescribirse, además, otros fármacos como las benzodiazepinas, con lo que es frecuente la presencia de éstas en las muestras de pacientes a tratamiento con antidepresivos. Por ello, se empleó la metodología descrita para el análisis de muestras reales positivas a benzodiazepinas (y negativas a antidepresivos), descartándose la aparición de interferencias originadas por estos fármacos.

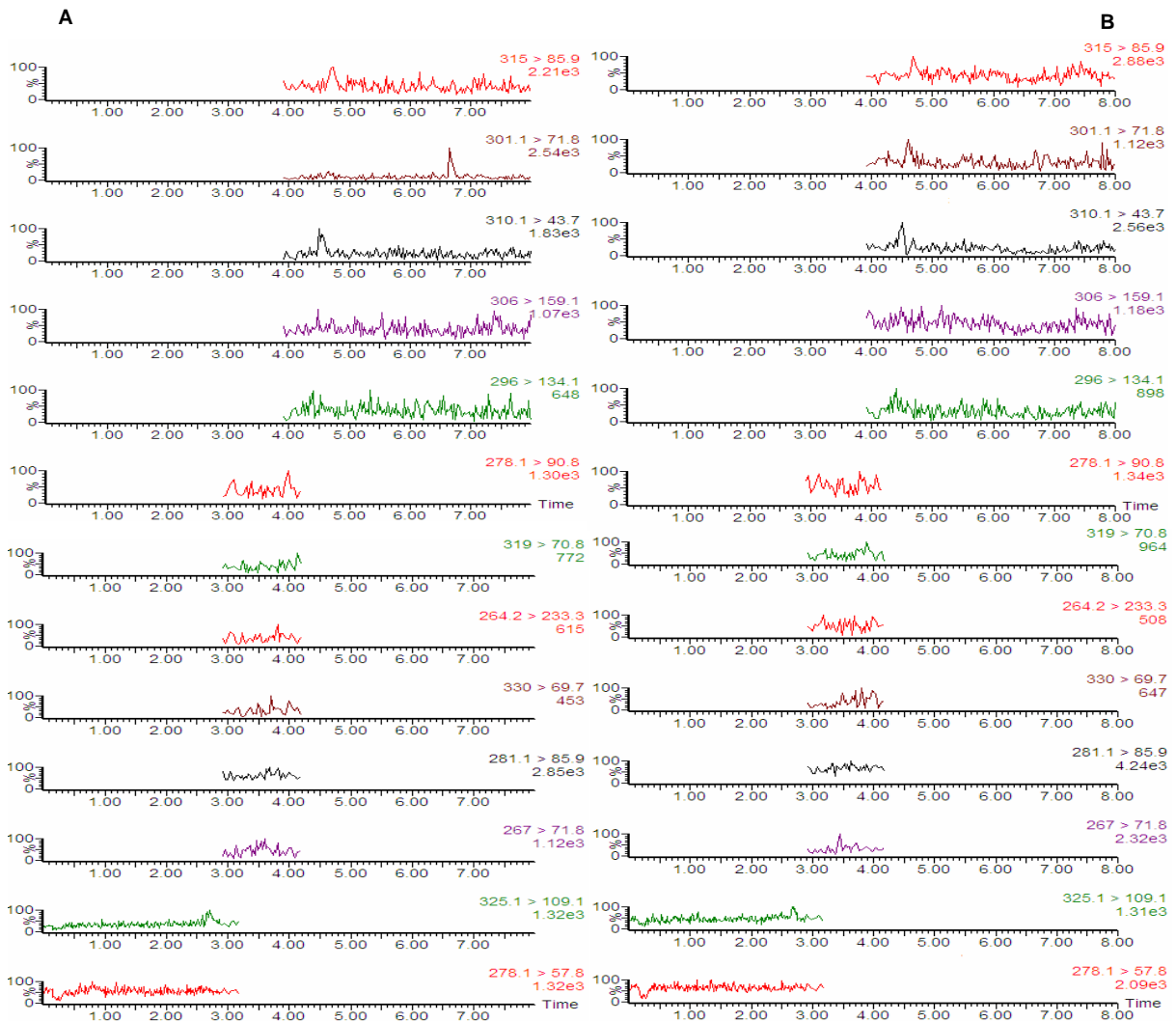


Figura 31. Cromatogramas de las transiciones cuantificadoras seleccionadas para cada uno de los antidepresivos incluidos en la metodología analítica obtenidos tras el análisis de una muestra blanco de plasma (A) y una muestra blanco de fluido oral (B).

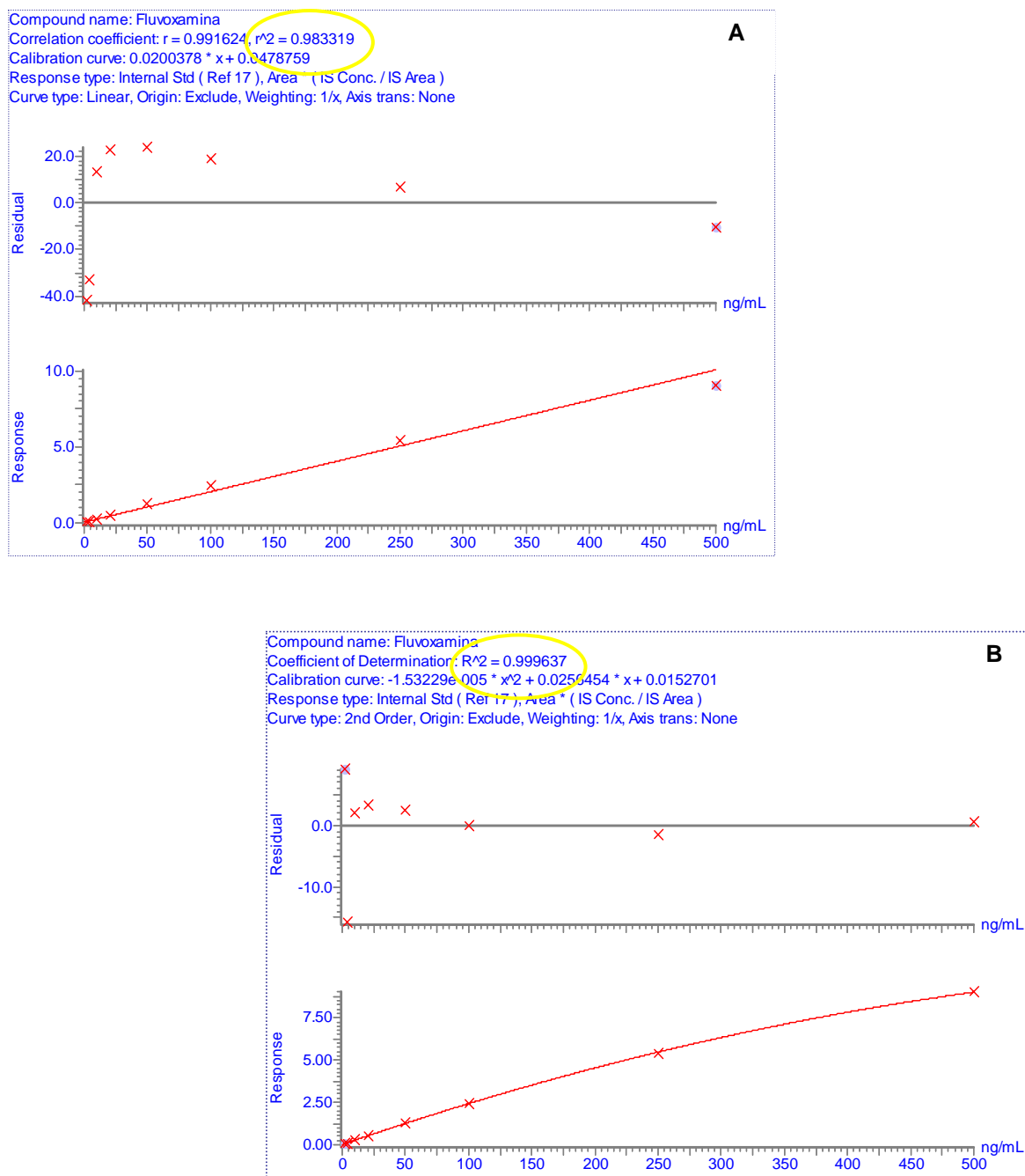
#### 6.4.4.2 Modelo de calibración (Linealidad)

El rango de calibración estudiado se estableció teniendo en cuenta las concentraciones terapéuticas, y ampliando un poco más los niveles estudiados por encima y por debajo de este rango. Para las muestras de plasma, el rango fue de 2 a 1000ng/mL para la mayoría de los compuestos, excepto en el caso de la amitriptilina y la norfluoxetina, para los que el límite inferior fue de 4ng/mL, y para la fluvoxamina, cuyo límite inferior fue de 10ng/mL. Las rectas se elaboraron con 9 niveles de concentración: 2, 4, 10, 20, 50, 100, 250, 500 y 1000ng/mL. En el caso de las muestras de saliva, el rango se redujo hasta 500ng/mL, ya que las concentraciones esperables en este medio biológico son inferiores. Las rectas en saliva se definieron con 8 niveles de calibración para todos los compuestos: 2, 4, 10, 20, 50, 100, 250 y 500ng/mL.

El modelo matemático para la descripción de la relación entre la concentración de analito y la señal producida por el detector para cada uno de los compuestos se seleccionó mediante el estudio de 6 rectas de calibrado, elaboradas en los dos medios biológicos en estudio, en días diferentes.

Tanto en el caso del plasma como del fluido oral, el modelo matemático que mejor se ajustó a los resultados obtenidos para todos los compuestos, a excepción de la fluvoxamina, fue la regresión lineal ponderada  $1/x$ , mediante la representación de la inversa de la concentración frente a la relación entre el área bajo la curva del analito y el área bajo la curva del patrón interno empleado para cada uno de los compuestos (indicado en la Tabla 14). En el caso de la fluvoxamina, la respuesta originada por el detector en función de la inversa de la concentración ( $1/x$ ) siguió un comportamiento cuadrático, es decir, la respuesta al aumentar la concentración no experimentó un incremento proporcional. Gráficamente, se muestra este comportamiento en la Figura 32.





**Figura 32.** Comparación de la aplicación del modelo lineal (A) y cuadrático (B) a los resultados obtenidos para la fluvoxamina.

Puede observarse como al utilizar el modelo cuadrático (b), los valores del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y de las residuales para todas las concentraciones están dentro de los criterios aceptados, a diferencia de lo que ocurre cuando se emplea el modelo lineal (a).

La utilización de modelos lineales es siempre preferible, pero el uso de otros modelos matemáticos como el cuadrático están aceptados e, incluso, aconsejados, cuando describen de manera más correcta el comportamiento que presenta el compuesto. En este caso, debe incluirse un mayor número niveles de concentración para definir el rango de calibración que los requeridos cuando el comportamiento del compuesto es lineal [2,4,5].

Los coeficientes de determinación obtenidos fueron superiores a 0.99 para todos los compuestos, en ambos medios biológicos, y las residuales para las concentraciones estudiadas estuvieron dentro de los límites aceptados en todos los casos.

**Tabla 15.** Ecuaciones de las rectas de calibración de los compuestos que siguieron un comportamiento lineal  $y=a+bx$  ó cuadrático  $y=a+bx^2+cx$  (fluvoxamina) en el rango de concentraciones estudiado en plasma (2 ó 4-1000ng/mL) y fluido oral (2-500ng/mL).

Compuesto	Medio biológico	$y=a+bx$ ó $y=a+bx^2+cx$ (n=6)			
		pendiente 1 (b)	pendiente2 (c)	Intercept (a)	$r^2$
Venlafaxina	Plasma	0.00617±0.00171		0.00112±0.00253	0,9981±0,0016
	Fluido oral	0.0155±0.00068		0.00361±0.00385	0.9972±0.00171
Citalopram	Plasma	0.00582±0.00018		-0.00127±0.00174	0,9970±0.0022
	Fluido oral	0.01591±0.0015		-0.00297±0.00675	0.9973±0.0015
Desipramina	Plasma	0.03142±0.00290		0.02317±0.01465	0.9974±0.0016
	Fluido oral	0.0741±0.005		0.01019±0.04141	0.9971±0.00149
Imipramina	Plasma	0.0097±0.00038		-0.00135±0.00396	0.9978±0.0019
	Fluido oral	0.02496±0.00134		-0.00518±0.01336	0.9971±0.00198
Paroxetina	Plasma	0.00123±0,00054		-0.00512±0.00337	0.9983±0.0013
	Fluido oral	0.03229±0.00147		-0.01642±0.02765	0.9968±0.00183
Nortriptilina	Plasma	0.00129±0.00080		-0.00305±0.00477	0.9981±0.00131
	Fluido oral	0.03405±0.00184		-0.00844±0.02536	0.9973±0.0015
Fluvoxamina	Plasma	0.00914±0.00102	$-2.33 \times 10^{-6} \pm 7 \times 10^{-7}$	0.03814±0.01836	0.9969±0.00132
	Fluido oral	0.02428±0.00165	$-9.99 \times 10^{-6} \pm 3 \times 10^{-6}$	0.00833±0.02520	0.9968±0.00227

Tabla 15. (continuación)

Compuesto	Muestra biológica	y= a + bx		
		Pendiente (b)	Intercept (a)	r <sup>2</sup>
Amitriptilina	Plasma	0.00403±0.00025	0.00365±0.0022	0.9980±0.00092
	Fluido oral	0.01027±0.00056	0.00270±0.00736	0.9960±0.00234
Norfluoxetina	Plasma	0.00863±0.00031	0.00142±0.00845	0.9978±0.00107
	Fluido oral	0.02281±0.00136	-0.00774±0.02313	0.9962±0.00200
Sertralina	Plasma	0.01525±0.00262	-0.00466±0.000668	0.9978±0.00180
	Fluido oral	0.04149±0.00662	-0.02183±0.03957	0.9957±0.00164
Fluoxetina	Plasma	0.01236±0.00087	-0.00389±0.00627	0.9982±0.00124
	Fluido oral	0.03184±0.00214	-0.01989±0.02891	0.9966±0.00193
Norclomipramina	Plasma	0.02001±0.00383	0.00401±0.00686	0.9975±0.00149
	Fluido oral	0.04591±0.01693	-0.00181±0.03951	0.9965±0.00200
Clomipramina	Plasma	0.00779±0.00048	-0.00399±0.00262	0.9983±0.00146
	Fluido oral	0.02082±0.00071	-0.01252±0.01802	0.9968±0.00217

#### 6.4.4.3 Precisión y exactitud

Como se describió anteriormente, se estudió la precisión y la exactitud, tanto en plasma como en fluido oral, a 4 niveles de concentración (LLOQ, concentración baja, media y alta), en el mismo día y en días diferentes. En la Tabla 16 aparecen recogidos los resultados de la precisión y la exactitud intra e interdía en plasma para todos los compuestos, expresados en términos de C.V. (precisión) y M.R.E. (exactitud). La Tabla 17 muestra los resultados obtenidos en fluido oral. En todos los casos se cumplieron los criterios de aceptación, es decir, valores de C.V. y M.R.E. inferiores al 15%, excepto para el LOQ, para el que se aceptan valores inferiores al 20%.

**Tabla 16.** Principales parámetros de validación del método analítico en plasma. La precisión, exactitud y la intensidad relativa de iones se calcularon a LOQ (2 ó 4ng/mL), concentración baja (20ng/mL), concentración media (500ng/mL) y concentración alta (1000ng/m) con respecto al rango estudiado. El rendimiento de la extracción se calculó a 20 y 800ng/mL.

Compuesto	Concentración (ng/mL)	Rendimiento extracción (%)	Precisión y exactitud intradía (n=5)		Precisión y exactitud interdía (n=5)		Intensidad relativa de iones (n=5)	
			C.V.	M.R.E.	C.V.	M.R.E.	Media	C.V.
Venlafaxina	LOQ=2	67.29	8.72	-15.99	14.73	-1.96	2.56	10.71
	4		3.86	1.39	8.77	3.16	2.52	9.56
	20		1.84	4.50	3.67	-1.22	2.50	9.65
	500	69.56	1.84	4.50	3.67	-1.22	2.42	9.49
	800		6.84	6.09	2.36	2.35	2.43	9.52
	1000		5.43	4.79	6.18	15.31	2.68	5.17
Citalopram	LOQ=2	73.6	3.24	3.54	9.08	3.13	2.70	5.40
	4		1.53	3.88	5.47	-3.59	2.71	4.02
	20		5.49	-10.17	5.47	-10.17	2.69	4.63
	500	68.60	5.65	11.45	2.20	3.40	2.7	4.66
	800		6.92	-14.97	12.27	-9.97	16.18	11.17
	1000		2.94	-0.93	10.16	-9.65	16.00	6.20
Desipramina	LOQ=2	71.95	0.80	10.92	6.00	2.91	15.25	7.21
	4		4.42	-7.97	2.11	0.32	15.93	5.50
	20		3.11	4.79	1.90	-0.26	15.74	2.94
	500	68.34	6.99	-2.06	8.22	11.23	4.46	2.67
	800		2.96	-1.39	10.88	-2.51	4.51	1.89
	1000		1.32	-2.23	5.05	-3.18	4.47	0.47
Imipramina	LOQ=2	70.29	6.48	-11.21	2.95	-0.89	4.45	1.58
	4		5.31	8.3	2.39	1.97	4.45	1.64
	20		6.88	-1.64	4.39	17.29	1.44	9.35
	500	75.81	3.16	1.54	11.23	-6.19	1.44	9.61
	800		0.93	-6.95	5.03	-7.12	1.53	11.44
	1000		5.73	-10.02	2.58	2.14	1.46	7.12
Paroxetina	LOQ=2	71.19	4.98	5.88	1.28	0.48	1.45	8.42
	4		8	-2.98	5.27	12.14	1.08	6.77
	20		4.53	1.07	11.03	-5.12	1.08	3.69
	500	69.30	1.68	0.01	5.84	-5.04	1.09	1.19
	800		6.13	-7.93	2.91	1.13	1.08	1.54
	1000		4.23	7.17	1.81	0.77	1.09	1.40
Nortriptilina	LOQ=10	74.94	6.63	-4.90	8	-1.6	6.81	4.58
	20		1.47	-15.61	3.51	-0.95	6.77	2.88
	500	74.49	5.44	-3.97	1.32	0.95	6.77	2.79
	800							
	1000							

Tabla 16. (continuación)

Compuesto	Concentración (ng/mL)	Rendimiento extracción (%)	Precisión y exactitud intradía (n=5)		Precisión y exactitud interdía (n=5)		Intensidad relativa de iones (n=5)	
			C.V.	M.R.E.	C.V.	M.R.E.	Media	C.V.
Amitriptilina	LOQ=4		2.06	-8.39	11.52	-18.94	1.17	2.83
	20	73.83	1.53	3.88	6.22	3.14	1.16	1.98
	500		5.76	-8.49	2.38	-0.24	1.16	1.61
	800	73.42						
	1000		5.61	8.26	1.95	-0.85	1.15	3.33
Norfluoxetina	LOQ=4		3.78	-10.79	13.21	-18.06	10.35	22.79
	20	74.59	1.79	2.27	6.21	-0.36	10.24	18.42
	500		7.56	-4.63	2.85	0.19	11.55	23.02
	800	74.77						
	1000		4.47	7.56	3.26	-2.71	11.66	23.02
Sertralina	LOQ=2		5.34	7.48	9.87	9.37	1.14	7.84
	4		3.77	-3.86	14.70	-8.96	1.13	5.24
	20	66.87	1.42	-4.35	10.34	-3.90	1.14	5.30
	500		7.08	-5.88	3.01	0.15	1.13	4.16
	800	71.29						
	1000		8.04	13.92	2.37	0.63	1.14	4.73
Fluoxetina	LOQ=2		10.26	-2.81	7.69	11.19	3.09	15.24
	4		6.4	-4.74	13.88	-12.02	2.78	11.57
	20	68.43	2.91	-2.20	5.1	-3.47	3.01	13.09
	500		7.32	-7.51	1.64	0.71	2.88	13.91
	800	68.65						
	1000		3.79	2.96	1.99	0.45	2.87	14.52
Norclomipramina	LOQ=2		10.01	-8.14	5.03	5.58	19.61	5.84
	4		3.60	1.85	13.68	-9.46	19.78	12.43
	20	68.25	2.07	-3.32	6.09	-1.44	21.03	7.40
	500		5.60	-7.69	3.48	1.01	20.26	9.07
	800	68.48						
	1000		8.04	13.92	2.46	0.13	20.1	9.46
Clomipramina	LOQ=2		7.48	-0.93	9.42	16.81	4.29	7.33
	4		1.10	-1.50	12.82	-7.83	4.37	4.54
	20	67.29	1.25	-5.21	4.89	-6.60	4.35	4.22
	500		6.89	-7.60	2.82	1.18	4.37	3.17
	800	69.56						
	1000		4.71	7.28	1.38	0.66	4.36	1.87

**Tabla 17.** Principales parámetros de validación del método analítico en fluido oral. La precisión, la exactitud y la intensidad relativa de iones se estudiaron al LOQ (2ng/mL), concentración baja (4ng/mL), concentración media (100ng/mL) y concentración alta (500ng/ml) con respecto al rango estudiado. El rendimiento de la extracción (R.E.) se calculó a 10 y 250ng/mL.

Compuesto	Concentración (ng/mL)	R.E	Precisión y exactitud intradía (n=5)		Precisión y exactitud interdía (n=5)		Intensidad relativa de iones (n=5)	
			C.V.	M.R.E.	C.V.	M.R.E.	Media	C.V.
Venlafaxina	LOQ=2		3.45	2.91	9.13	-4.84	2.41	5.36
	4		3.92	5.35	6.60	6.94	2.37	4.63
	10	68.02						
	100		6.84	3.57	10.01	1.64	2.34	4.11
	250	72.36						
	500		6.34	9.30	2.35	0.70	2.37	4.23
Citalopram	LOQ=2		0.92	7.69	8.05	10.54	2.69	3.96
	4		2.46	1.03	7.36	3.70	2.67	1.96
	10	64.82						
	100		7.95	-0.57	6.53	3.92	2.66	1.28
	250	70.04						
	500		5.14	7.61	2.49	2.32	2.68	1.76
Desipramina	LOQ=2		2.79	-6.38	13.45	-3.64	15.96	6.18
	4		7.72	-1.13	9.58	0.45	15.96	5.94
	10	61.25						
	100		7.95	-0.57	6.53	3.92	15.22	3.48
	250	67.79						
	500		7.36	12.94	2.49	-0.22	15.52	4.95
Imipramina	LOQ=2		1.81	1.50	10.55	5.52	4.37	3.07
	4		3.90	-2.01	7.82	1.49	4.52	1.79
	10	61.51						
	100		6.52	-2.58	7.99	2.00	4.37	1.24
	250	69.47						
	500		4.49	7.12	2.51	1.17	4.42	1.68
Paroxetina	LOQ=2		1.25	-1.67	16.03	7.19	1.50	7.50
	4		6.03	-2.20	6.78	-0.005	1.5	4.45
	10	57.00						
	100		-3.95	7.05	1.22	-3.95	1.45	5.22
	250	66.88						
	500		4.09	10.72	3.16	1.59	1.47	5.14
Nortriptilina	LOQ=2		5.21	-0.34	14.60	3.62	1.08	4.16
	4		9.07	-4.18	8.29	-0.12	1.09	1.88
	10	58.48						
	100		8.97	-2.46	6.14	2.37	1.09	3.55
	250	67.24						
	500		6.42	11.03	2.13	0.61	1.09	3.23
Fluvoxamina	LOQ=2		10.56	-17.33	16.78	-6.91	6.55	15.99
	4		7.30	-7.81	16.78	-7.89	7.15	11.93
	10	61.36						
	100		5.61	-1.80	7.25	-0.29	6.70	1.57
	250	72.33						
	500		10.63	8.75	1.41	0.56	6.78	1.85

Tabla 17. (continuación)

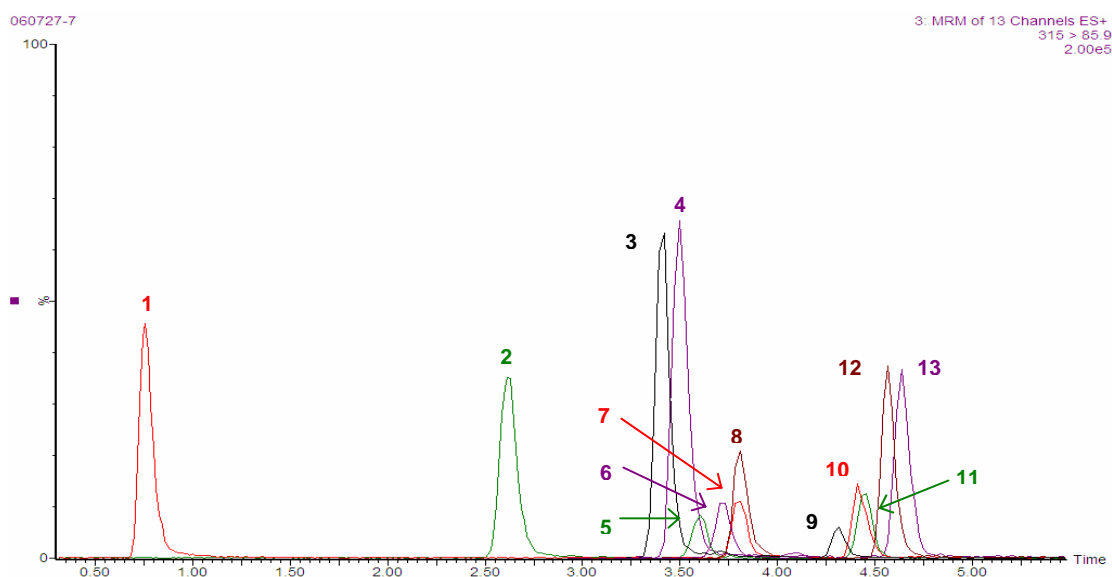
Compuesto	Concentración (ng/mL)	R.E.	Precisión y exactitud intradía (n=5)		Precisión y exactitud interdía (n=5)		Intensidad relativa de iones (n=5)	
			C.V.	M.R.E.	C.V.	M.R.E.	Media	C.V.
Amitriptilina	LOQ=2		4.74	-16.37	18.78	-7.93	1.24	7.00
	4		9.41	-6.66	8.04	-5.79	1.18	5.38
	10	61.95						
	100		5.15	2.54	8.36	6.83	1.23	6.14
	250	70.36						
	500		4.47	4.14	3.39	-0.44	1.20	5.27
Norfluoxetina	LOQ=2		11.14	-9.25	15.63	0.96	10.27	19.11
	4		9.69	-6.52	12.71	-12.24	11.99	9.92
	10	48.72						
	100		5.41	0.47	7.40	5.09	12.24	11.85
	250	65.03						
	500		4.67	11.33	2.61	-0.08	12.05	12.78
Sertralina	LOQ=2		6.42	-2.77	8.59	9.71	1.10	8.53
	4		13.78	-10.68	10.44	-7.75	1.12	9.21
	10	49.51						
	100		7.31	-1.84	7.63	4.16	1.12	4.46
	250	65.00						
	500		8.91	3.02	1.71	1.91	1.13	4.68
Fluoxetina	LOQ=2		9.09	-9.09	12.19	6.69	2.93	13.81
	4		4.80	-3.70	14.93	-5.42	2.89	5.78
	10	49.21						
	100		6.55	0.05	8.42	2.01	2.85	7.81
	250	66.09						
	500		4.29	10.52	2.26	1.53	2.88	9.01
Norclomipramina	LOQ=2		3.37	-0.88	18.64	-8.09	19.59	10.42
	4		6.20	-6.08	9.47	-8.37	20.00	8.21
	10	53.19						
	100		8.40	1.00	8.38	5.81	19.68	4.54
	250	66.18						
	500		3.66	7.41	2.82	0.52	19.52	4.79
Clomipramina	LOQ=2		4.42	2.26	16.44	10.20	4.21	5.03
	4		8.61	0.80	8.21	-2.58	4.28	4.53
	10	53.52						
	100		7.59	-4.78	7.18	0.16	4.33	4.53
	250	66.36						
	500		4.67	6.74	2.40	1.80	4.31	2.47

#### 6.4.4.4 Límites

El límite de detección (LOD) se calculó teniendo en cuenta la concentración de analito que dio lugar a una señal 3 veces superior a la señal ruido, pudiéndose distinguir a esta concentración las dos transiciones monitorizadas para cada compuestos. De esta forma, el LOD se estableció en 0.5ng/mL en ambos medios biológicos, de forma que todos los compuestos estudiados cumpliesen ambos requisitos.

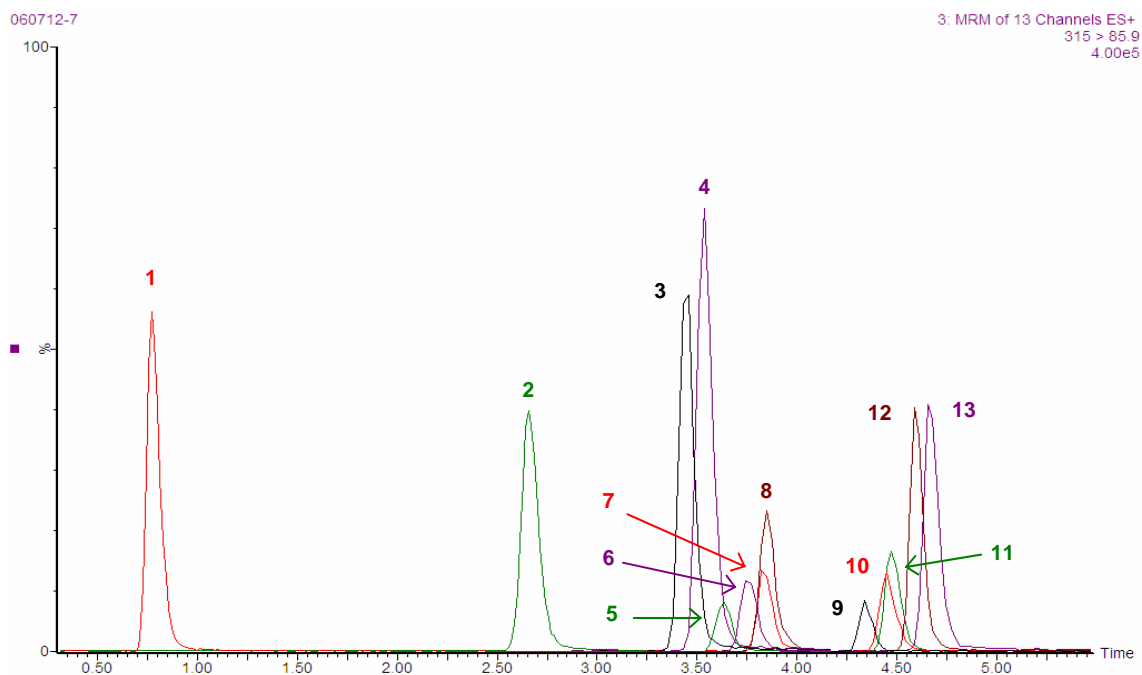
El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se determinó teniendo en cuenta la concentración de analito que pudo ser cuantificado con adecuada precisión y exactitud, es decir, con un C.V. y un M.R.E.  $\leq 20\%$ . Así, el LLOQ en plasma fue de 2ng/mL, excepto para amitriptilina, norfluoxetina y fluvoxamina, cuyo LLOQ fue de 4ng/mL. En fluido oral, el LLOQ fue de 2ng/mL para todos los compuestos. En las Figuras 33 y 34 se muestran los cromatogramas de todos los compuestos a una concentración de 2ng/mL en plasma y fluido oral, respectivamente.

El límite superior de cuantificación (ULOQ) se corresponde con concentración más alta del rango de calibración estudiado, siendo de 1000ng/mL en plasma y de 500ng/mL en fluido oral.



**Fig. 33.** Cromatogramas superpuestos de las transiciones cuantificadoras de los antidepresivos en plasma a 2ng/mL (concentración correspondiente al LLOQ más bajo). 1:Venlafaxina, 2:Citalopram, 3:Desipramina, 4:Imipramina, 5:Paroxetina, 6:Nortriptilina, 7:Fluvoxamina, 8:Amitriptilina, 9:Norfluoxetina, 10:Sertralina, 11:Fluoxetina, 12:Norclomipramina, 13:Clomipramina.





**Fig. 34.** Cromatogramas superpuestos de las transiciones cuantificadoras de los antidepresivos en fluido oral a 2ng/mL (LLOQ). 1:Venlafaxina, 2:Citalopram, 3:Desipramina, 4:Imipramina, 5:Paroxetina, 6:Nortriptilina, 7:Fluvoxamina, 8:Amitriptilina, 9:Norfluoxetina, 10:Sertralina, 11:Fluoxetina, 12:Norclomipramina, 13:Clomipramina.

#### 6.4.4.5 Rendimiento de la extracción

Este parámetro se calculó a una concentración baja y una alta dentro del rango estudiado, mediante la comparación de muestras dopadas con los analitos antes y después de realizar la extracción, y añadiendo el patrón interno después de la extracción en todos los casos (cinco replicados). En plasma, se calculó a 20 y 800ng/mL, y en fluido oral a 10 y 250ng/mL. Los valores de este parámetro estuvieron comprendidos entre el 49% y el 72%. El rendimiento obtenido ha sido un poco bajo para la mayoría de los compuestos; sin embargo, estos valores son aceptables, ya que permitieron llevar a cabo la cuantificación de modo preciso y exacto a todas las concentraciones, incluyendo el LLOQ, cumpliéndose el principal criterio exigido [1,4,5].

#### 6.4.4.6 Intensidad relativa de los iones

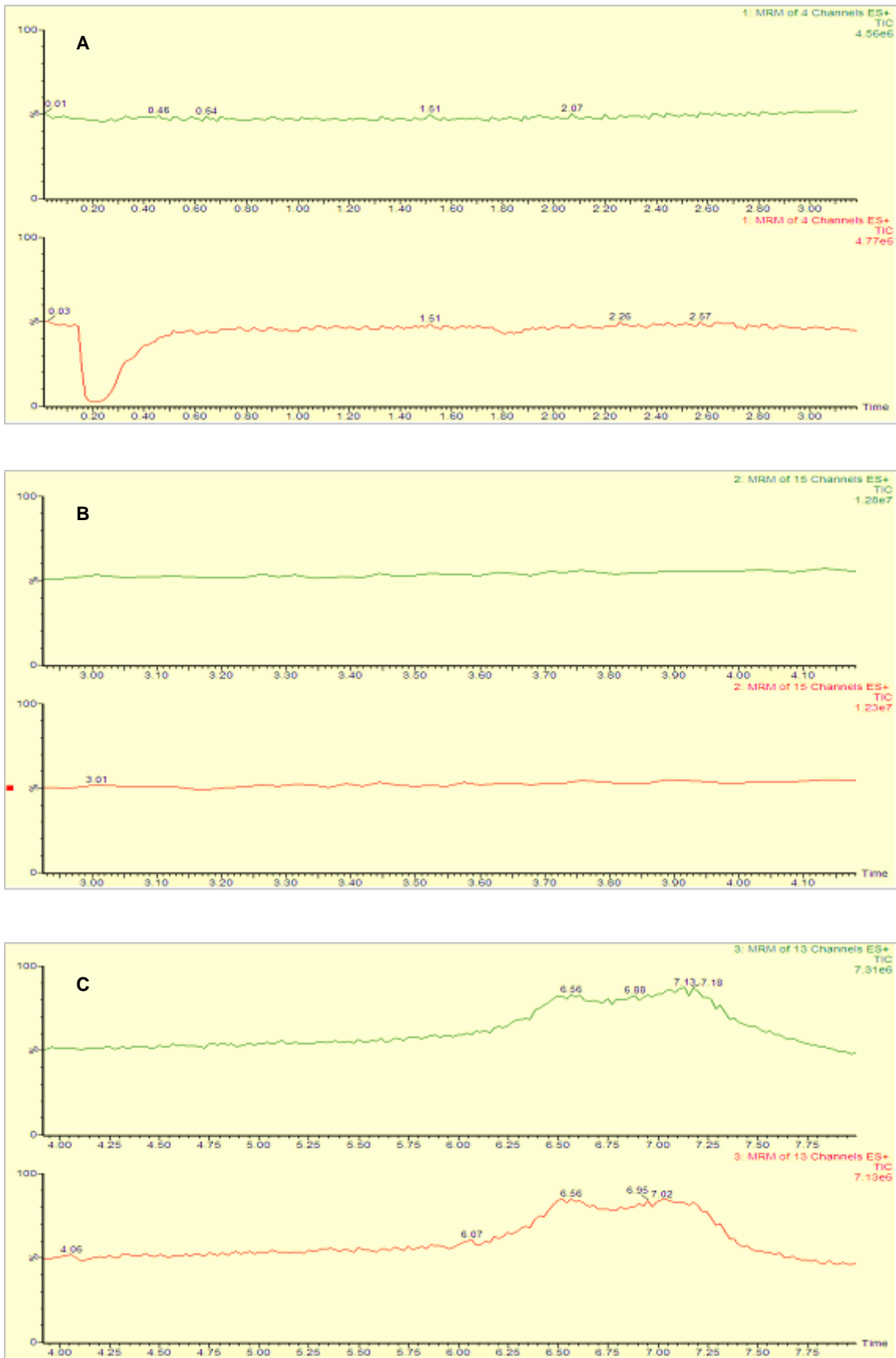
Las Tablas 16 y 17 muestran el valor medio de la intensidad relativa de las transiciones monitorizadas para todos los compuestos, en plasma y saliva, respectivamente, así como el C.V. de los valores obtenido en cinco días

diferentes, a cuatro concentraciones distintas. Los valores de C.V. estuvieron comprendidos entre 0.47-16%, excepto para norfluoxetina, para el que los fueron del 18-23%. Estos resultados indican la gran utilidad de este parámetro como criterio cualificador adicional a la presencia de las 2 transiciones monitorizadas para cada compuesto y al tiempo de retención.

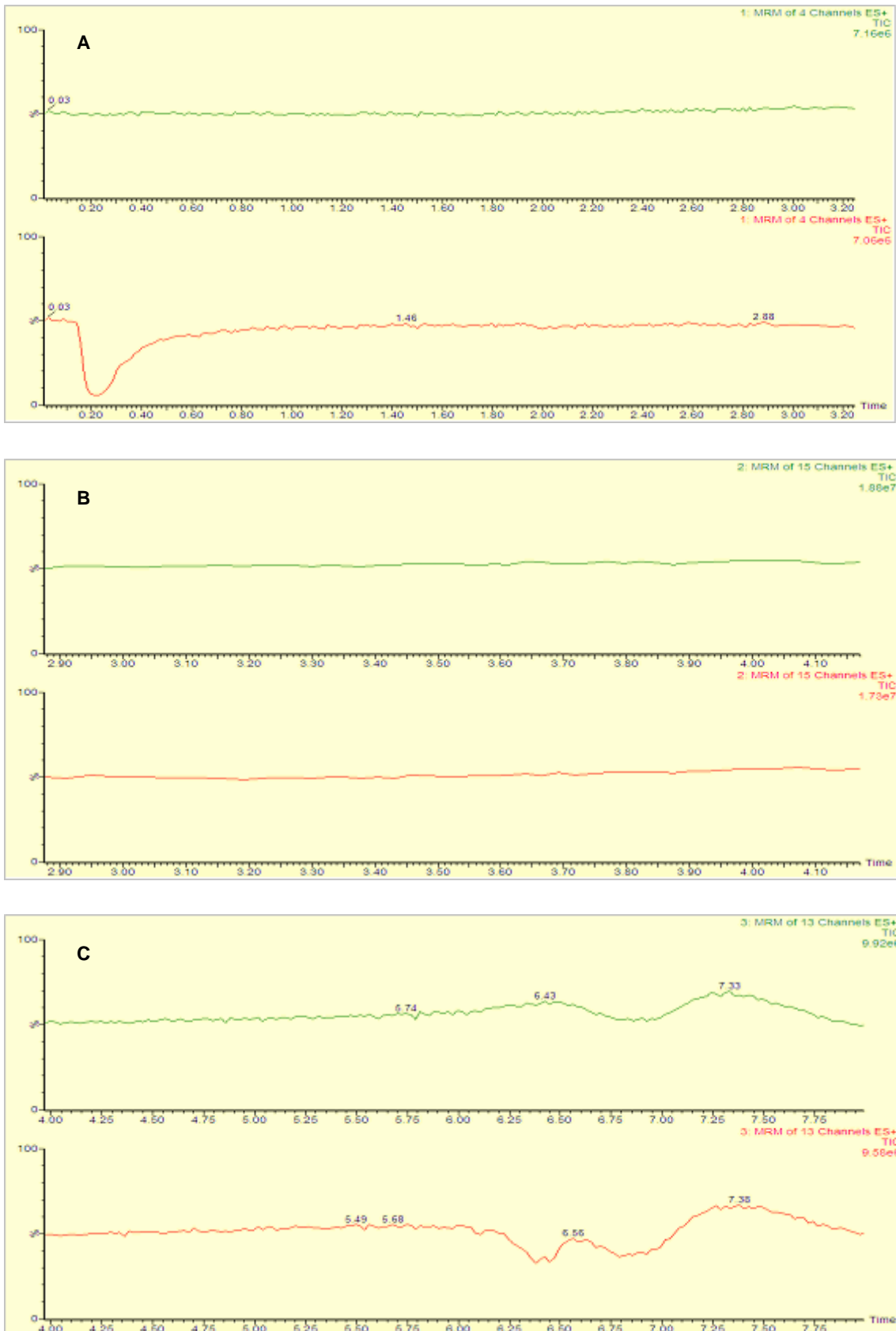
#### **6.4.4.7 Efecto matriz**

La evaluación de la posible presencia de un fenómeno de efecto matriz se realizó empleando las mismas condiciones que las utilizadas en la metodología analítica. Como se explicó previamente, el experimento se realizó mediante la infusión post-columna continua de los analitos en estudio y los patrones internos (1µg/mL en fase móvil), en "T" con el eluyente del sistema cromatográfico. Con esta configuración, se compararon los cromatogramas obtenidos tras la inyección de fase móvil con los obtenidos tras la inyección de muestras de plasma y saliva blancos, previamente extraídas según el procedimiento anteriormente descrito.

En todos los casos, la señal obtenida tras la inyección de las muestras blanco de plasma o saliva fue similar a la obtenida tras la inyección de fase móvil (efecto matriz cero) a los tiempos de retención de los analitos, lo que indica la ausencia de supresión o aumento de la señal de los mismos en presencia de la matriz biológica, sea ésta plasma o fluido oral, al emplear esta metodología (Figuras 35 y 36). En ambas matrices, sí se dio este fenómeno en los primeros 0.5 minutos (Figuras 35.A y 36.A). En el caso del fluido oral, puede apreciarse también un descenso de la señal tras la elución de los compuestos, entre el minuto 6 y 6.75 (Figura 36.C).



**Figura 35.** Cromatogramas del TIC, es decir, conteniendo todas las transiciones monitorizadas, obtenidos tras la inyección de fase móvil (parte superior, en verde) y de una muestra blanco de plasma extraída (parte inferior, en rojo), simultánea a la infusión post-columna de los analitos. **A:** Cromatogramas del TIC de la primera función del MRM: **B:** cromatogramas del TIC de la función 2 de MRM: **C:** cromatogramas del TIC de la función 3 de MRM.



**Figura 36.** Cromatogramas del TIC, es decir, conteniendo todas las transiciones monitorizadas, obtenidos tras la inyección de fase móvil (parte superior, en verde) y de una muestra blanco de fluido oral extraída (parte inferior, en rojo), simultánea a la infusión post-columna de los analitos. **A:** Cromatogramas del TIC de la primera función del MRM; **B:** cromatogramas del TIC de la función 2 de MRM; **C:** cromatogramas del TIC de la función 3 de MRM.

#### 6.4.4.8 Estabilidad

Se llevó a cabo el estudio de estabilidad de los compuestos en la matriz biológica tras someterlos a tres ciclos de congelado/descongelado, congelando a -20 °C, y descongelando a temperatura ambiente y protegidos de la luz.

Los resultados mostrados en las Tablas 18 (en plasma) y 19 (en saliva) indican la estabilidad de los compuestos tras exponerlos a estas condiciones, excepto en el caso de la sertralina en saliva, para la que se encontró un ligero descenso de la señal a concentración de 250ng/mL.

**Tabla 18.** Resultados de la estabilidad de los antidepresivos en estudio en plasma al someter las muestras a tres ciclos de congelado/descongelado. Se muestran los valores de precisión (C.V.) y exactitud (M.R.E) con respecto a los resultados obtenidos para las muestras control.

Compuesto	10ng/mL		500ng/mL	
	C.V.	M.R.E.	C.V.	M.R.E.
Venlafaxina	4.49	3.27	2.76	-1.20
Citalopram	5.89	0	0.74	-1.51
Desipramina	5.00	-5.78	3.74	-4
Imipramina	6.77	-15.28	0.94	-0.45
Paroxetina	5.94	2.5	3.73	4.87
Nortriptilina	4.52	-8.22	3.2	0.16
Fluvoxamina	13.2	2.81	11.87	16.32
Amitriptilina	7.81	-16.72	8.30	-4.33
Norfluoxetina	4.76	21.98	0.42	1.9
Sertralina	6.21	-19.49	8.23	6.21
Fluoxetina	4.81	17.22	2.57	3.53
Norclomipramina	6.45	1.39	1.06	-0.41
Clomipramina	6.44	-14.03	2.31	1.02

**Tabla 19.** Resultados de la estabilidad de los antidepresivos en estudio en fluido oral al someter las muestras a tres ciclos de congelado/descongelado. Se muestran los valores de precisión (C.V.) y exactitud (M.R.E) con respecto a los resultados obtenidos para las muestras control.

Compuesto	10ng/mL		250ng/mL	
	C.V.	M.R.E.	C.V.	M.R.E.
Venlafaxina	4.20	0.40	2.97	3.84
Citalopram	1.57	2.17	3.56	2.17
Desipramina	1.66	4.00	2.64	-2.04
Imipramina	3.26	-6.95	3.04	-4.22
Paroxetina	1.89	10.03	3.08	-11.47
Nortriptilina	3.39	3.67	2.57	-7.87
Fluvoxamina	6.40	8.31	7.40	-10.23
Amitriptilina	8.00	-13.64	2.46	-11.5
Norfluoxetina	4.40	9.59	3.43	-18.00
Sertralina	10.81	-9.60	6.03	-33.40
Fluoxetina	6.02	11.81	4.15	-16.35
Norclomipramina	5.16	1.77	2.37	-17,25
Clomipramina	8.21	-11,32	1.65	-20.35

## 6.5. Aplicación de la metodología al análisis de muestras reales

### 6.5.1 Análisis de muestras clínicas y forenses

La metodología analítica descrita en este trabajo se aplicó como técnica de confirmación y cuantificación al análisis de casos reales remitidos al Servicio de Toxicología del Instituto Medicina Legal de la Universidad de Santiago de Compostela durante los años 2005 y 2006.

Los casos en los que se encontraron antidepresivos representaron el 1.4% de los registrados en el Servicio durante estos dos años. Un 69.6% de los casos positivos a antidepresivos fueron mujeres, y la procedencia de las muestras fue mayoritariamente hospitalaria (76.8% de los casos). Los niveles de antidepresivos encontrados fueron superiores a los terapéuticos en un 25% de los casos, y se encontraron otras sustancias, generalmente, benzodiazepinas, en el 50% de ellos.

Figura 37. Número de casos en los que se encontró cada antidepresivo incluido en el método analítico utilizado.

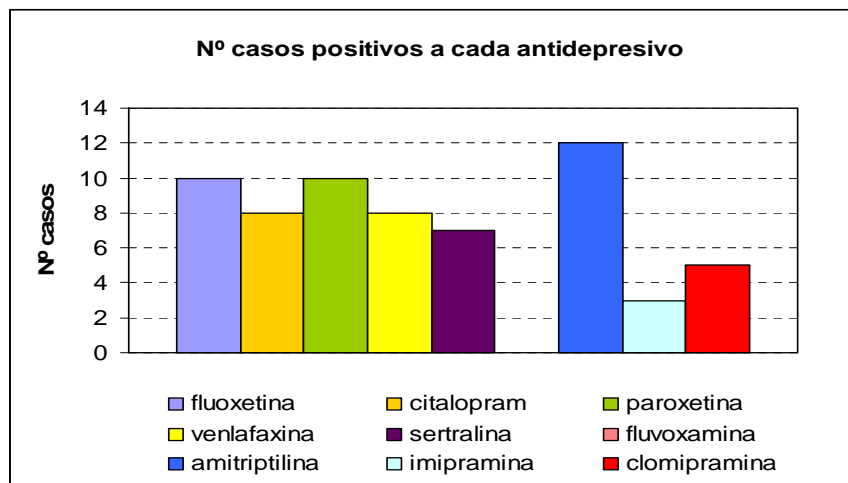


Tabla 20. Casos positivos a antidepresivos durante los años 2005 y 2006.

Nº caso/año	Edad/Sexo	Procedencia	Antidepresivo (ng/mL)	Otras sustancias presentes (pl/sa)
90/05	64/Mujer	Hospital Clínico Universitario-Urg. (Santiago)	fluoxetina= 33.4 norfluoxetina= 38.2	fenotoina= 11.02µg/mL
554/05	53/Mujer	Hospital Provincial Conxo (Santiago)	fluoxetina= 174.6 norfluoxetina= 47.3	diacepam= 5.66ng/mL
1043/05	19/Mujer	Hospital Clínico Universitario-Urg. (Santiago)	citalopram= 424	-
1104/05	57/Mujer	Hospital do Barbanza-Urg. (Ribeira)	amitriptilina= 13.9 nortriptilina= 26.8	-
1111/05	39/Mujer	Hospital do Barbanza-Urg. (Ribeira)	citalopram= 118.6	alprazolam= 61.62ng/mL
1215/05	32/Mujer	Hospital Clínico Universitario-Urg. (Santiago)	citalopram= 684.4 paroxetina=15.7	alprazolam= 305.3ng/mL
1245/05	70/Mujer	Juzgado de Órdenes	fluoxetina= 299.1 Norfluoxetina= 273.9 amitriptilina= 47.1 nortriptilina= 69.07	diacepam=43.8ng/mL
1346/05	70/Mujer	Juzgado de Lalín	imipramina= 592 desipramina= 660 paroxetina= 32	-

Tabla 20. (continuación)

Nº caso/año	Edad/Sexo	Procedencia	Antidepresivo (ng/mL)	Otras sustancias presentes (pl/sa)
1367/05	22/Hombre	Hospital Clínico Universitario-Urg. (Santiago)	fluoxetina= 74.25 norfluoxetina= 13.6	diacepam= 209.7ng/mL
1383/05	43/Mujer	Hospital Clínico Universitario-Urg. (Santiago)	fluoxetina= 314 norfluoxetina= 265	bromacepam= 815.7ng/mL
1892/05	48/Hombre	Hospital Psiquiátrico Conxo-UAE (Santiago)	amitriptilina= 10ng/mL sertralina= 5ng/mL	tetracepam= 92.66ng/mL bromacepam= 90.88ng/mL
1903/05	34/Mujer	Hospital do Barbanza-Urg. (Ribeira)	citalopram= 204.4 paroxetina= 765	bromacepam= 214.73ng/mL alprazolam= 137.42ng/mL
1947/05	75/Hombre	Juzgado Nº 2 de Noia	sertralina= 495	-
1988/05	34/Mujer	Hospital do Barbanza-Urg. (Ribeira)	paroxetina= 813	alprazolam= 1218ng/mL bromacepam= 452ng/mL Loracepam= 174ng/mL
2009/05	57/Hombre	Juzgado de Muros	amitriptilina= 36.5 nortriptilina= 28	-
2106/05	34/Mujer	Hospital Clínico Universitario-UCI A (Santiago)	venlafaxina= 1671.6	alprazolam= 670.8ng/mL loracepam= 428.3ng/mL midazolam= 148.5ng/mL
2117/05	34/Mujer	Hospital do Barbanza-Urg. (Ribeira)	venlafaxina= 651.2	-
2/06	31/Mujer	Hospital Clínico Universitario-Urg (Santiago)	clomipramina= 1633.2 norclomipramina= 316.4	alprazolam= 344.65ng/mL
17/06	39/Mujer	Hospital do Barbanza-Urg. (Ribeira)	venlafaxina= 3929.4	alprazolam= 207.2ng/mL
69/06	39/Hombre	Hospital do Barbanza-Urg. (Ribeira)	sertralina=82.5	alprazolam= 25.3ng/mL alcohol etílico= 0.86g/L
88/06	62/Hombre	Hospital Provincial Conxo-UCI (Santiago)	venlafaxina=29.48 clomipramina= 20.34	midazolam= 48.6ng/mL metamizol, mepivacaína
179/06	29/Hombre	Hospital Provincial Conxo-UCI	fluoxetina= 26.33 norfluoxetina= 39.98	metamizol, lamotrigina
207/06	31/Mujer	Hospital Clínico Universitario-UCI A (Santiago)	clomipramina=443 norclomipramina=113.58	alprazolam= 199.4ng/mL
237/06	28/Mujer	Hospital Provincial Conxo-Urg. (Santiago)	sertralina= 503.7	-
290/06	38/Hombre	Hospital Psiquiátrico Conxo (Santiago)	citalopram= 45.66	-
300/06	26/Mujer	Hospital Clínico Universitario-Urg. (Santiago)	venlafaxina= 2514.3	alprazolam= 214ng/mL



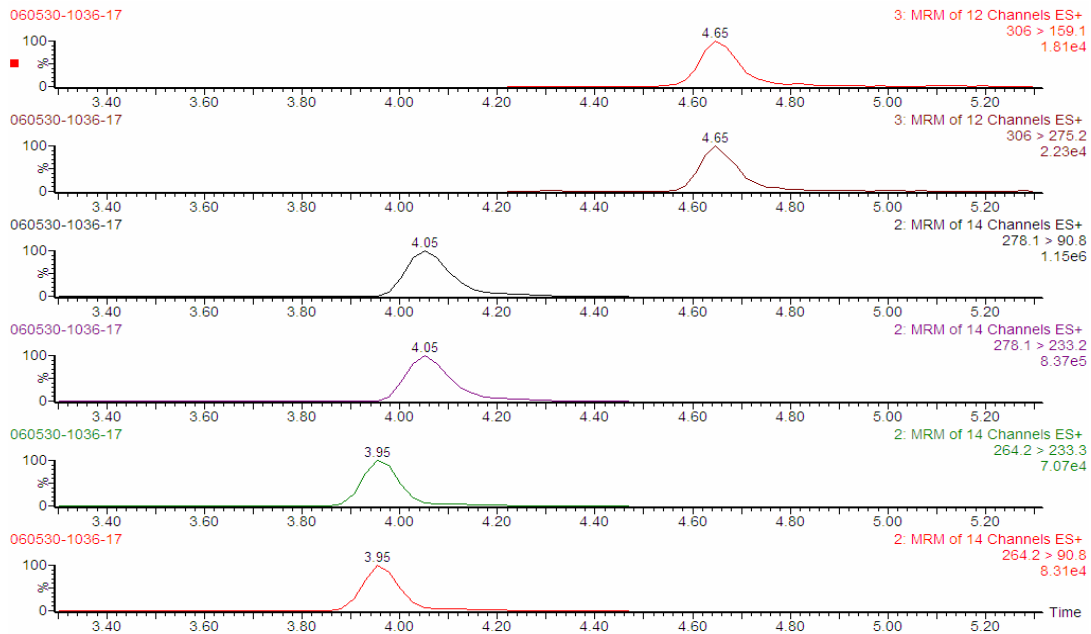
Tabla 20. (continuación)

Nº caso/año	Edad/Sexo	Procedencia	Antidepresivo (ng/mL)	Otras sustancias presentes (pl/sa)
349/06	65/Hombre	Juzgado Nº2 de Cambados	citalopram= 48.5	-
374/06	21/Mujer	Hospital do Barbanza-Urg. (Ribeira)	paroxetina=5.4 amitriptilina= 448.2 nortriptilina= 135.27	diacepam= 95.25ng/mL
749/06	65/Hombre	Juzgado Nº 2 de Cambados	citalopram= 48.6	-
780/06	27/Hombre	Hospital Clínico Universitario-Urg. (Santiago)	citalopram= 221.4	alcohol etílico= 2.41ng/mL
806/06	35/Mujer	Hospital do Barbanza-Urg. (Ribeira)	citalopram= 38.04	-
868/06	86/Hombre	Hospital Clínico Universitario-Urg. (Santiago)	amitriptilina= 494.2 nortriptilina=71.9	-
869/06	58/Mujer	Hospital Clínico Universitario-Urg. (Santiago)	amitriptilina= 304 nortriptilina= 144.4	-
870/06	14/Mujer	Hospital Clínico Universitario-Urg. Ped. (Santiago)	amitriptilina= 341.8 nortriptilina= 171.4	alcohol etílico= 2.16g/L
917/06	40/Mujer	Hospital Clínico Universitario-Urg. (Santiago)	paroxetina= 38.1	alprazolam= 48.4ng/mL
957/06	38/Mujer	Hospital do Barbanza-Urg. (Ribeira)	venlafaxina= 271.9	alprazolam= 7.62ng/mL loracepam= 64.41ng/mL benzoilecgonina= 401.8ng/mL
989/06	28/Hombre	Hospital Clínico Universitario-Urg. (Santiago)	citalopram= 12.5	alcohol etílico= 2.34g/L alprazolam= 45.16ng/mL
1036/06	46/Mujer	Hospital Clínico Universitario-Urg. (Santiago)	sertralina= 68.3 amitriptilina= 1176.6 nortriptilina= 127.3	-
1063/06	66/Mujer	Hospital Clínico Universitario-Urg. (Santiago)	amitriptilina= 337.2 nortriptilina= 245.3	diacepam= 381.7ng/mL loracepam= 6.6ng/mL
1194/06	47/Mujer	Hospital do Barbanza-Urg. (Ribeira)	clomipramina= 354.75 norclomipramina= 253	-
1224/06	29/Mujer	Hospital Clínico Universitario-Urg. (Santiago)	fluoxetina= 53.51 norfluoxetina= 128.86	alprazolam= 27.88ng/mL
1299/06	48/Mujer	Hospital Clínico Universitario-Urg. (Santiago)	sertralina= 6.2	-
1312/06	29/Mujer	Hospital Clínico Universitario-Urg. (Santiago)	paroxetina= 68	diazepam= 2ng/mL

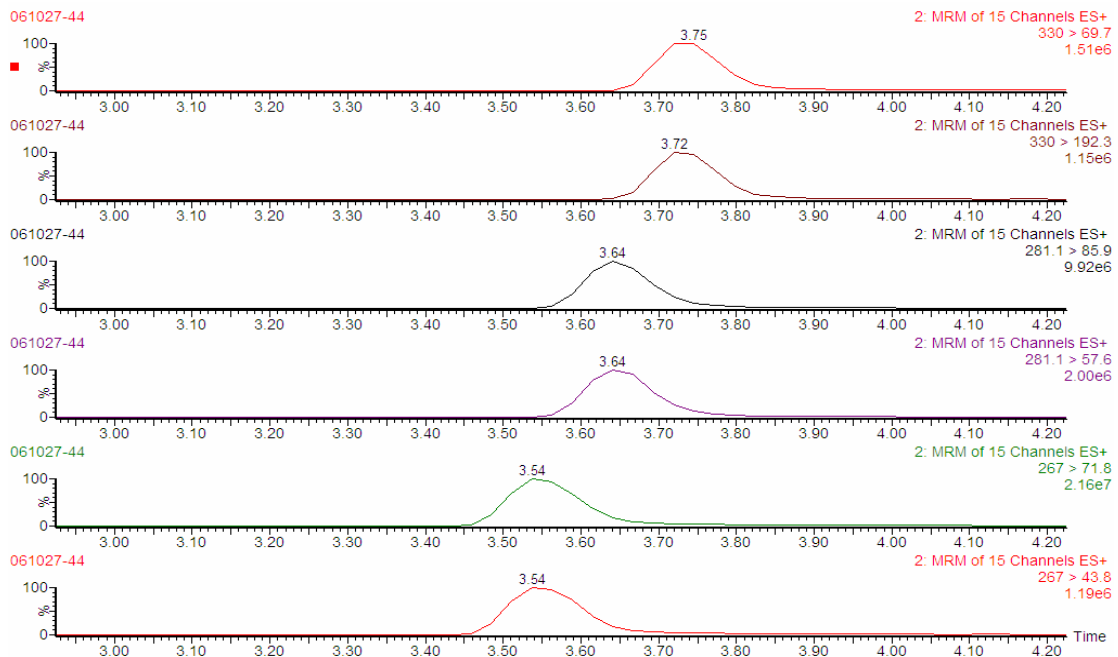
Tabla 20. (continuación)

Nº caso/año	Edad/Sexo	Procedencia	Antidepresivo (ng/mL)	Otras sustancias presentes (pl/sa)
1352/06	39/Mujer	Hospital Clínico Universitario-Urg. (Santiago)	venlafaxina= 236.14 amitriptilina= 87.59 nortriptilina= 125.33	bromacepam= 318.28ng/mL
1359/06	28/Mujer	Juzgado Nº 1 de Ortigueira	sertralina= 3.7 clomipramina= 205.75 norclomipramina= 375.27	loracepam= 62.45ng/mL
1469/06	12/Mujer	Hospital Clínico Universitario-Ped Esc. (Santiago)	fluoxetina< LOD norfluoxetina= 8	-
1476/06	36/Hombre	Hospital Barbanza-Urg. (Ribeira)	sertralina= 8.45 imipramina< LOD desipramina= 20.48	-
1533/06	44/Mujer	Hospital Clínico Universitario-Urg. (Santiago)	fluoxetina= 30.3 norfluoxetina< LOD	loracepam= 17.5ng/mL diacepam= 197.7ng/mL
1576/06	0/Hombre	Hospital Clínico Universitario-Urg. Ped. (Santiago)	citalopram= 28.2ng/mL	-
1580/06	46/Mujer	Juzgado Nº 3 de Santiago	amitriptilina= 1279 nortriptilina= 1216.8	-
1581/06	69/Hombre	Juzgado de Negreira	venlafaxina= 740.12	-
1848/06	66/Mujer	Juzgado de Órdenes	paroxetina= 311 imipramina= 205.93 desipramina= 788.5	-
1893/06	39/Mujer	Juzgado Nº 3 de Santiago	amitriptilina= 2980.15 nortriptilina= 3700.78	-
1952/06	26/Mujer	Hospital Clínico Universitaria-Urg. (Santiago)	paroxetina= 83.93	-
5631/05-Chus	19/Hombre	Juzgado Nº 5 de Vigo	paroxetina= 26	cannabis= 336ng/mL
5678/06-Chus	31/Mujer	Juzgado Nº 1 de Betanzos	amitriptilina= 411.7 nortriptilina= 147.72	lormetacepam= 47.4ng/mL alprazolam= 187.96ng/mL loracepam= 15.62ng/mL metadona= 920ng/mL

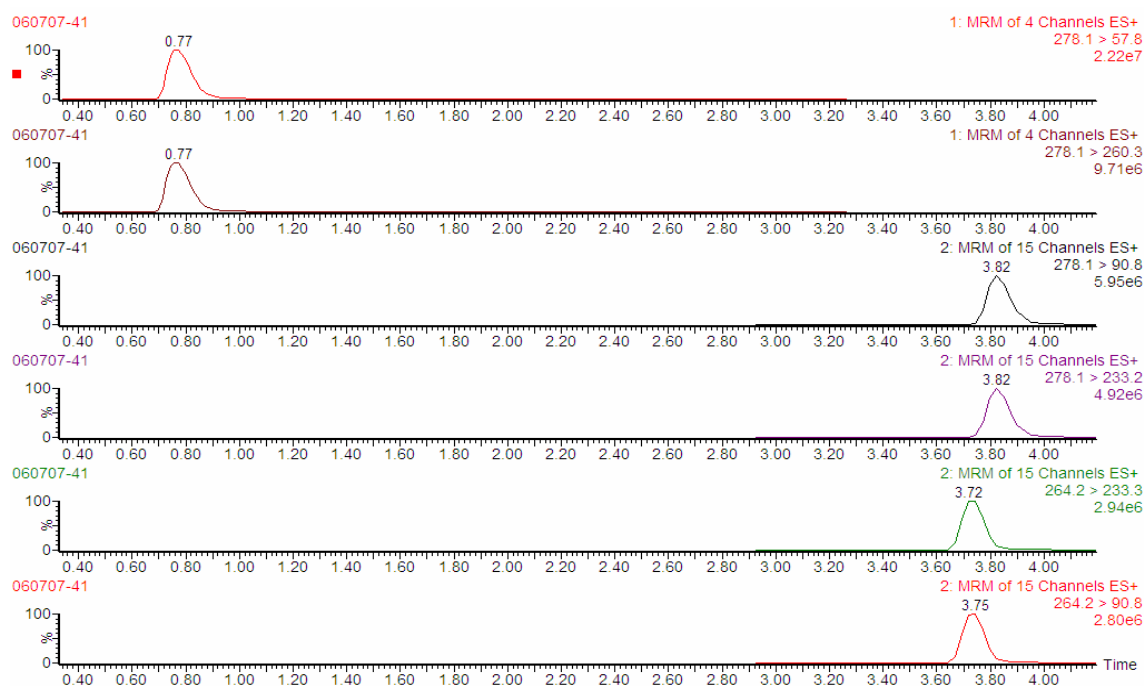
En las figuras 38-40 se muestran, como ejemplo, los cromatogramas de las transiciones cualificadoras y cuantificadoras de los antidepresivos hallados en el análisis tres casos reales distintos.



**Figura 38.** Caso 1036/06, que presentó concentraciones de sertralina= 68.3ng/mL, amitriptilina= 1176.6ng/mL y nortriptilina= 127.3ng/ml. En la imagen se muestran los cromatogramas de las dos transiciones monitorizadas para cada uno de estos compuestos obtenidos tras el análisis de la muestra.



**Figura 39.** Caso 1848/06, que presentó concentraciones de paroxetina= 311ng/mL, imipramina= 205.93ng/mL y desipramina= 788.5ng/ml. En la imagen se muestran los cromatogramas de las dos transiciones monitorizadas para cada uno de estos compuestos obtenidos tras el análisis de la muestra.



**Figura 40.** Caso 1352/06, que presentó concentraciones de venlafaxina= 236.14ng/mL, amitriptilina= 87.59ng/mL y nortriptilina= 125.33ng/ml. En la imagen se muestran los cromatogramas de las dos transiciones monitorizadas para cada uno de estos compuestos obtenidos tras el análisis de la muestra.

### 6.5.2 Estudio preliminar de la correlación entre los niveles de antidepresivos en plasma y saliva

En esta etapa de muestreo preliminar nos encontramos con una serie de problemas que tendrán que ser solventados en el futuro:

- Las muestras fueron recogidas durante un periodo de 3 meses, pero aún así sólo se han reunido muestras de ocho pacientes.
- De estos ocho pacientes, sólo en 4 ocasiones se dispuso de muestra de plasma y fluido oral de dos semanas consecutivas. Esto se debió a que en dos pacientes sólo se tomó muestra la primera semana por coincidir la segunda toma con periodo vacacional. En un tercer paciente, el volumen de saliva recogido con el Salivette® fue nulo.

Los resultados obtenidos tras el análisis de las muestras disponibles se recogen en la Tabla 21. Las conclusiones que pueden derivarse de estos resultados son las siguientes:

- En 5 de los seis pacientes para los que se analizó la muestra de plasma de dos semanas distintas, los niveles plasmáticos intraindividuales del fármaco administrado se mantuvieron constantes. En el caso N° 7 la falta de concordancia en los niveles plasmáticos de las dos semanas se debió a un aumento en la dosis administrada la segunda semana.
- De los 5 pacientes para los que se dispuso de muestras de dos semanas distintas, el antidepresivo administrado en dos de los casos fue la venlafaxina (casos 1 y 7), y en un tercer caso, citalopram (caso 8), encontrándose en todos ellos una buena correlación entre los niveles de fármaco en plasma y fluido oral en las dos semanas. En los dos casos restantes, los antidepresivos administrados fueron sertralina y clomipramina (casos 3 y 5, respectivamente), y no se encontró correlación en los niveles plasma/fluido oral en ninguno de ellos.
- El tiempo de vida media no parece que juegue un papel relevante en lo referente a las correlaciones plasma/fluido oral. La buena correlación que obtuvimos en el paciente 8 a tratamiento con citalopram, así como en los pacientes 1 y 7, a tratamiento con venlafaxina, fármacos con muy diferente valor de  $t_{1/2}$ , permite encaminarnos hacia esa conclusión, aunque esta afirmación debe realizarse con ciertas precauciones, ya que el número de pacientes incluidos hasta el momento no es elevado, y no permite extraer conclusiones definitivas a ese respecto. Por ello, algunos parámetros como el intervalo de muestreo deberán ser incluidos en los próximos estudios.

**Tabla 21.** Concentraciones de antidepresivos encontradas en plasma y saliva, así como la correlación de los niveles obtenidos en ambos medios en los casos en los que se dispuso de muestra en las dos semanas.

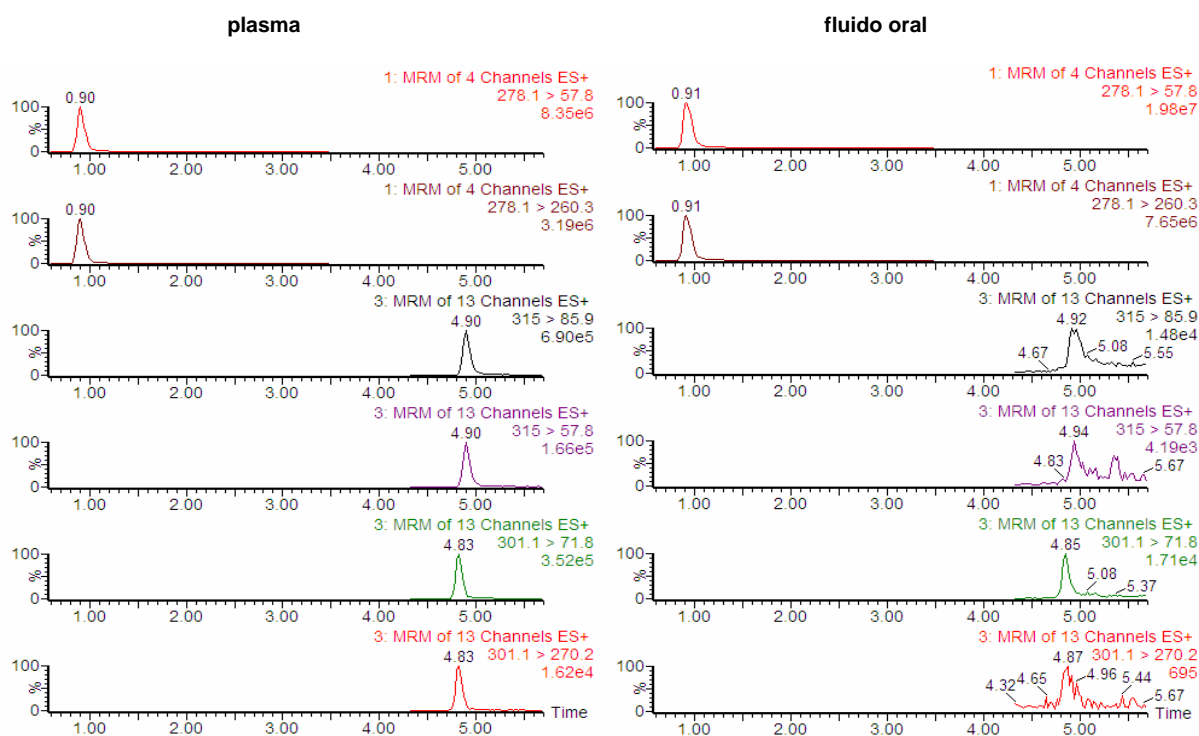
Nº caso	Edad/sexo	AD administrado	Semana	Plasma (ng/mL)	Fluido oral (ng/mL)	Relación PL/FO
1	60/mujer	venlafaxina 150mg retard 1 dosis/día	1	venlafaxina= 179.79 clomipramina= 12.05 norclomipramina=13.40	venlafaxina= 234.484	0.767
			2	venlafaxina= 152.81 clomipramina= 2.76 norclomipramina= 2.49	venlafaxina= 206.952	0.738
2	44/hombre	sertralina 100mg 3 dosis/día	1	sertralina= 308.71 citalopram= 9.363	sertralina= 2.68 citalopram< LOD	115.276
			2	sertralina= 332.388 citalopram= 16.8	MND	-
3	44/mujer	sertralina 100mg 1 dosis/día	1	sertralina= 43.09	sertralina= 4.2	10.26
			2	sertralina= 40.54	sertralina= 1.8	22.49
4	73/mujer	Sertralina 100mg 1 dosis/día	1	sertralina= 17.41	sertralina= 1.28	13.62
			MND	-	-	-
5	47/hombre	clomipramina 75mg 1 dosis/día	1	clomipramina= 42.42	clomipramina= 4.4	9.65
				norclomipramina= 130.65	norclomipramina= 14.76	8.85
			2	Clo+norclo= 57.12	Clo+norclo=18.56	9.03
				clomipramina= 51.1	clomipramina= 0.8	63.87
6	¿	¿	1	norclomipramina= 110.02	norclomipramina= 2.6	42.31
			MND	-	-	-
7	37/hombre	venlafaxina 150mg retard 1 dosis/día	1	Clo+norclo= 161.12	Clo+norclo= 3.4	47.39
			2	venlafaxina= 62.6 citalopram= 83.4	venlafaxina= 346.3 citalopram= 161.0	0.18
8	37/mujer	Citalopram 20mg Retard 1 dosis/día	1	venlafaxina= 186.2 citalopram= 11	venlafaxina= 792.8 citalopram= 14.8	0.23
			2	citalopram= 49.3	citalopram= 16.5	2.99
				citalopram= 46.6	citalopram= 14.4	3.24

AD: antidepresivo; PL: plasma; FO: fluido oral; MND: muestra no disponible

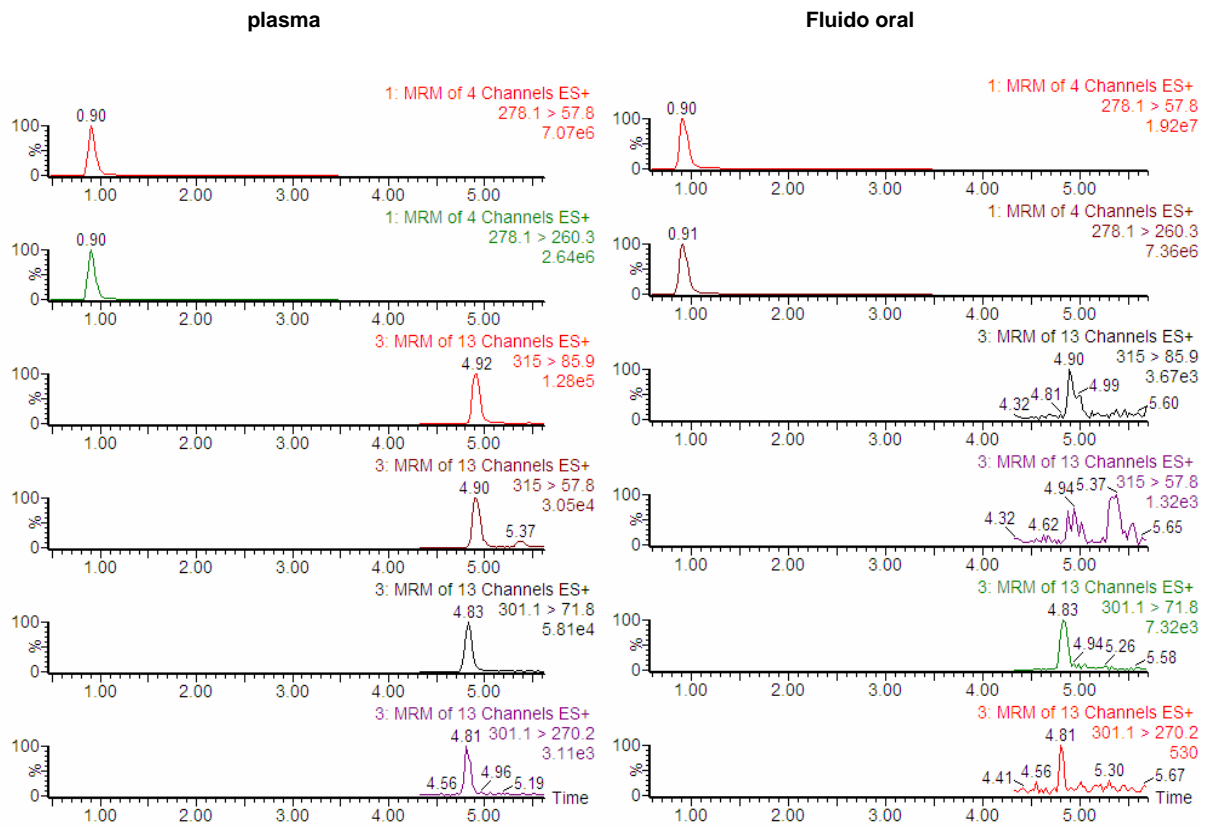
Debido a los problemas encontrados, esta primera fase, más que resultados concluyentes en cuanto a la correlación de los niveles, lo que nos permitió es efectuar un cambio en el protocolo establecido en el estudio, de forma que en el futuro:

- Se incluirán más centros en el suministro de muestras.
- Los dispositivos empleados hasta ahora en la recolección de las muestras de saliva, Salivette<sup>®</sup>, serán sustituidos por el Quantisal<sup>™</sup>, que permiten detectar cuando se ha alcanzado el volumen adecuado de muestra mediante la aparición de una banda coloreada.
- Se estudiarán distintos intervalos de muestreo para evaluar la influencia de la vida media de los fármacos en la correlación de las concentraciones entre plasma y saliva.

Las Figuras 41 y 42 muestran los cromatogramas de las transiciones cualificadoras y cuantificadoras de los antidepresivos encontrados en uno de los pacientes participantes, en plasma y en fluido oral, en las semanas 1 y 2, respectivamente.



**Figura 41.** Cromatogramas de las transiciones empleadas en la detección de venlafaxina, clomipramina y norclomipramina obtenidos tras el análisis de las muestras de plasma (A) y fluido oral (B) del caso N° 1 la semana 1.



**Figura 42.** Cromatogramas de las transiciones empleadas en la detección de venlafaxina, clomipramina y norclomipramina obtenidos tras el análisis de las muestras de plasma y fluido oral del caso N° 1 la semana 2.



**BIBLIOGRAFÍA**

- [1] F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Musshoff. Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.*, 2006. *In press, corrected proof.*
- [2] F.T. Peters, H. Maurer. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology. *Accred. Qual. Assur.*, 2002; 7: 441-449.
- [3] D. Dadgar, P.E. Burnett, M.G. Choc, K. Gallicano, J.W. Hopper. Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1995; 13 (2): 89-97.
- [4] C. Hartmann, J. Smeyers-Verbeke, D.L. Massart, R.D. McDowall. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998; 17: 193-218. [12] International Conference on Harmonization (ICH). Validation of analytical methods: methodology, ICH Q2 B, 1996.
- [5] V.P. Shah, K.K. Midha, J.W. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonelli, C.T. Viswanathan, A. Yacobi. Bioanalytical method validation-A revisit with a decade of progress. *Pharm. Res.*, 2000; 17: 1551-1557.
- [6] W. Linder, I.W. Wainer. Requirements for initial assay validation and publication in *J. Chromatogr. B* (editorial). *J. Chromatogr. B*, 1998; 707: 1-2.
- [7] F.T. Peters, M. Hartung, M. Herbold, G. Schmitt, T. Daldrup, SW. Musshoff. Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxicologischen Untersuchungen, Anhang C: Anforderungen an die Durchführung von Analysen, 1. Validierung, Toxichen. *Krimtech.*, 2004; 71: 146-154.
- [8] International Conference on Harmonization (ICH). Validation of analytical methods: methodology, ICH Q2 B, 1996.
- [9] L. Rivier. Chapter 5: Identification and confirmation criteria for LC-MS, in: *Applications of LC-MS in Toxicology*. Ed. Pharmaceutical Press, London, 2006.

- [10] World Anti-doping Agency. International Standard for Laboratories (Version 2). Montreal: WADA, 2003. [www.wada-ama.org](http://www.wada-ama.org)
- [11] T.M. Annesley. Ion supresión in mass spectrometry. *Clin. Chem.*, 2003; 49 (7): 1041-1044.
- [12] P.J. Taylor. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.*, 2005; 38: 328-334.
- [13] R. Dams, M.A. Huestis. Matrix effects in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003; 14: 1290-1294.
- [14] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng. Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analysis of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogrm per millilitre concentrations. *Anal. Chem.*, 1998; 70: 882-889.
- [15] S. Souverain, S. Rudaz, J.L. Veuthey. Matriz effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. *J. Chromatogr. A*, 2004; 1058: 61-66.
- [16] H.R. Liang, R.L. Foltz, M. Meng, et al. Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2003; 14: 1290-1294.
- [17] S. Heller, C. Hiemke, G. Stroba, A. Rieger-Gies, E. Daum-Kreysch, J. Sachse, S. Härtter. Assesment of storage and transport stability of new antidepressant and antipsychotic drugs for a natiowide TDM service. *Ther. Drug Monit.*, 2004; 26 (4): 459-461.

- [18] R. Green, R. Houghton, J. Scarth, C. Gregory. Determination of fluoxetine and its major active metabolite norfluoxetine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, 2002; 55: S-133-S-136.
- [19] W. Naidong, A. Eerkes. Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the analysis of paroxetine in human plasma. *Biomed. Chromatogr.*, 2004; 18: 28-36.
- [20] A. Eerkes, W. Naidong, M King, A. Du, W.Z. Shou. A sensitive and high-throughput LC/MS/MS method using a silica column and an aqueous-organic mobile phase for the analysis of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma. *J. Liq. Chrom. And Rel. Technol.*, 2002; 25 (8): 1215-1227.
- [21] Z. Shen, S. Wang, R. Bakhtiar. Enantiomers separation and quantification of fluoxetine (Prozac<sup>®</sup>) in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using liquid-liquid extraction in 96-well plate format. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002; 16: 332-338.
- [22] U. Gutteck, K.M. Rentsch. Therapeutic drug monitoring of 13 antidepressant and five neuroleptic drugs in serum with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2003; 41 (12): 1571-1579.
- [23] F.L. Sauvage, J.M. Gaulier, G. Lâchatre, P. Marquet. A fully automated turbulent-flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry technique for monitoring antidepressants in human serum. *Ther. Drug Monit.*, 2006; 28 (1): 123-129.
- [24] T. Shinozuka, M. Terada, E. Tanaka. Solid-phase extraction and analysis of 20 antidepressant drugs in human plasma by LC/MS with SSI method. *Forensic Sci. Int.*, 2006; 162: 108-112.
- [25] H. Kirchherr, W.N. Kühn-Velten. Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass

spectrometry: a multi-level, single-sample approach. *J. Chromatogr. B*, 2006; 843: 100-113.

[26] M. Kollroser, C. Schober. Simultaneous determination of seven tricyclic antidepressant drugs in human plasma by direct-injection HPLC-APCI-MS-MS with an ion trap detector. *Ther. Drug Monit.*, 2002; 24: 537-544.

[27] M. Kollroser, C. Schober. An on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of citalopram, fluvoxamine, and paroxetina in human plasma. *Chromatographia*, 2003; 57: 133-138.

[28] F.C.W. Sutherland, D. Bandenhorst, A.D. de Jager, T. Scanes, H.K.L. Hundt, K.J. Swart, A.F. Hundt. Sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of fluoxetine and its primary active metabolite norfluoxetine in human plasma. *J. Chromatogr. A*, 2001; 914: 45-51.

[29] C. Li, Z. Ji, F. Nan, Q. Shao, P. Liu, J. Dai, J. Zhen, H. Yuan, F. Xu, J. Cui, B. Huang, M. Zhang, C. Yu. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of fluoxetine and its main active metabolite norfluoxetine in human plasma with deuterated fluoxetine as internal standard. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, 2002; 16: 1844-1850.

[30] S.R. Needham, P.R. Brown, K. Duff, D. Bell. Optimized stationary phases for the high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric analysis of basic pharmaceuticals. *J. Chromatogr. A*, 2000; 869: 159-170.

[31] Z. Zhu, L. Neirinck. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of paroxetina in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 2002; 780: 295-300.

[32] P. Massaroti, N.M. Cassiano, L.F. Duarte, D.R. Campos, M.A.M. Marchioretto, G. Bernasconi, S. Calaffati, F.A.P. Barros, E.C. Meurer, J. Pedrazzoli. Validation of a selective method for determination of paroxetina in human plasma by LC-MS/MS. *J. Pharmaceut. Sci.*, 2005; 8 (2): 340-347.

[33] W.F. Smyth, J.C. Leslie, S. McClean, B. Hannigan, H.P. McKenna, B. Doherty, C. Joyce, E. O'Kane. The characterization of selected antidepressant drugs using electrospray ionisation with ion trap mass spectrometry and with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and their determination by high-performance liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006; 20: 1637-1642.

[34] H. Zhang, K. Heinig, J. Henion. Atmospheric pressure ionization time-of-flight mass spectrometry coupled with fast liquid chromatography for quantitation and accurate mass measurement of five pharmaceutical drugs in human plasma. *J. Mass Spectrom.*, 2000; 35: 423-431.

[35] M. Segura, J. Ortuño, M. Farré, R. Pacifici, S. Pichini, J. Juglar, J. Segura, R. de la Torre. Quantitative determination of paroxetine and its 4-hydroxy-3-methoxy metabolite in plasma by high-performance liquid chromatography/electrospray ion trap mass spectrometry: application to pharmacokinetic studies. *Rapid commun. Mass Spectrom.*, 2003; 17: 1455-1461.

[36] S. Ertürk, S.M. Çetin, S. Atmaca, L. Ersoy, G. Baktir. A sensitive HPLC method for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma with fluorescence detection. *Ther. Drug Monit.*, 2005; 27: 38-43.

[37] K.E. Goeringer, L. Raymond, G.D. Christian, B.K. Logan. Post-mortem forensic toxicology of selective serotonin reuptake inhibitors: a review of pharmacology and report of 168 cases. *J. Forensic Sci.*, 2000; 45 (3): 633-648.

[38] K. Kudo. Selective determination of amitriptyline and nortriptyline in human plasma by HPLC with UV and PB mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, 1997; 21: 185-189.

[39] E. Lacassie, J.M. Gaulier, P. Marquet, J.F. Rabatel, G. Lachâtre. Methods for the determination of seven selective serotonin reuptake inhibitors and three active metabolites in human serum using high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *J. Chromatogr. B*, 2000; 742: 229-238.

[40] D.S. Jain, M. Sanyal, G. Subbaiah, U.C. Pande, P. Shrivastav. Rapid and sensitive method for the determination of sertralina in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J. Chromatogr. B*, 2005; 829: 69-74.

[41] H. Juan, Z. Zhiling, L. Huande. Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography-electrosprayionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI). *J. Chromatogr. B*, 2005; 820 (1): 33-39.

[42] I. Kristoffersen, A. Bugge, E. Lundanes, L. Slørdal. Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine, paroxetine and their metabolites in plasma and whole blood by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, 1999; 734: 229-246.

[43] A.M. Martínez, C. Sánchez de la Torre, E. Almarza. A comparative solid-phase extraction study for the simultaneous determination of fluvoxamine, mianserin, doxepin, citalopram, paroxetine, and etoperidone in whole blood by capillary gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J. Anal. Toxicol.*, 2004; 28 (3): 174-180.

[44] X.P. Lee, T. Kumazawa, O. Suzuki. Detection of tricyclic antidepressants in whole blood by headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, 1997; 35 (7): 302-308.

[45] C. Salgado-Petinal, J.P. Lamas, C. García-Jares, M. Llompart, R. Cela. Rapid screening of selective serotonin re-uptake inhibitors in urine samples using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005; 382: 1351-1359.

[46] A. de Castro, M.M. Ramírez, M. Laloup, N. Samyn, G. De Boeck, M. López-Rivadulla. A high-throughput on-line SPE-LC-MS/MS for the analysis of 14 antidepressants and metabolites in plasma. Presentado en el 44º Congreso Internacional de la Asociación Internacional de Toxicólogos Forenses (TIAFT), Eslovenia, 28 agosto-1 septiembre de 2006.

**VII. EXPERIMENTAL PART (2): ON-LINE SPE-LC-MS/MS METHOD  
FOR THE DETERMINATION OF ANTIDEPRESSANTS IN PLASMA**





## 7.1. THE IMPROVEMENT ON HIGH-THROUGHPUT BY MEANS OF ON-LINE SPE TECHNIQUES

Three main stages can be distinguished in the development of an analytical method: the sample preparation, the analytes separation-detection, and the handling of the results.

With the introduction of atmospheric pressure interphases (API), LC-MS(/MS) has reached an important recognition in the bioanalytical field, since it combines the power of separation provided by the LC with the great selectivity of mass spectrometry detection [1,2]. Both advantages have made it possible to develop very rapid and efficient analysis with this technique, allowing for the evaluation in only minutes [3,4]. In addition, the majority of these instruments incorporate software(s) which facilitate the data process and the interpretation of the results.

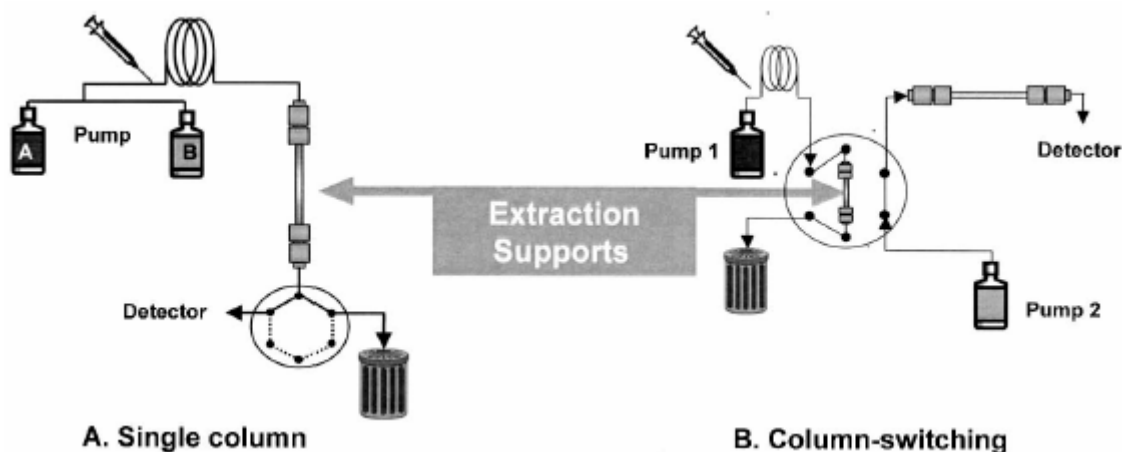
As a result of the above, sample clean up has become the rate-limiting step of the analytical process, limiting the throughput of current fast LC-MS(/MS) analysis [2,5]. Despite the high selectivity provided by LC-MS, the direct injection of complex biological matrices should be avoided since macromolecules present in the sample, such as proteins, quickly damage the supports for the analytical separation and cause the system to clog. In addition, an inconvenience associated with the use of LC-MS, mainly in the ESI mode, is the matrix effect that endogenous components of the sample may cause, giving rise to signal suppression or enhancement resulting from competition with the analytes ionization process. Therefore, the sample treatment process can not be completely avoided in order to ensure the reliability of the quantitative results obtained.

For sample clean up, different sample preparation procedures have been used. Some of them included simple filtration or the protein precipitation and/or centrifugation, techniques normally not sufficiently efficient to remove all substances that cause matrix effect [6]. Thus, conventional extraction techniques such as liquid-liquid extraction or solid-phase extraction continue being the ones employed in most of the developed methodologies. However,

these techniques are generally performed off-line, being time-consuming and, therefore, a limiting factor in the high-throughput analysis. One approach to facilitate these processes has been the design of automatic systems to carry out the extraction, with the introduction of SPE robots and 96-well plates.

The introduction of on-line SPE-LC-MS procedures has really pushed forward the fast bioanalytical determination for high-throughput, allowing the automation of the entire analytical process without compromising sensibility and precision. Moreover, sensibility relatively to other techniques such as filtration or precipitation is increased as the whole sample can be injected into the LC-MS system.

One alternative that allowed for direct injection was the development of supports, since large molecules from the biological matrix can readily pass through the column while the analytes of interest can be retained under aqueous conditions, and subsequently eluted by with the use of high organic solvents. There are different supports, such as the so-called restricted access media (RAM), large particle size (LPZ) and the monolithic supports, which can be used in the single column configuration or, more frequently, in the column-switching approach. Several papers have been published using these systems [5,7,8,9], including some which allow the analysis of one or different types of antidepressants [10-13].



**Figure 43.** Representation of the on-line SPE by means of an extraction support. In the column-switching configuration (B), the extraction support is moved in line with the analytical column when the clean-up has already finished (from [2]).

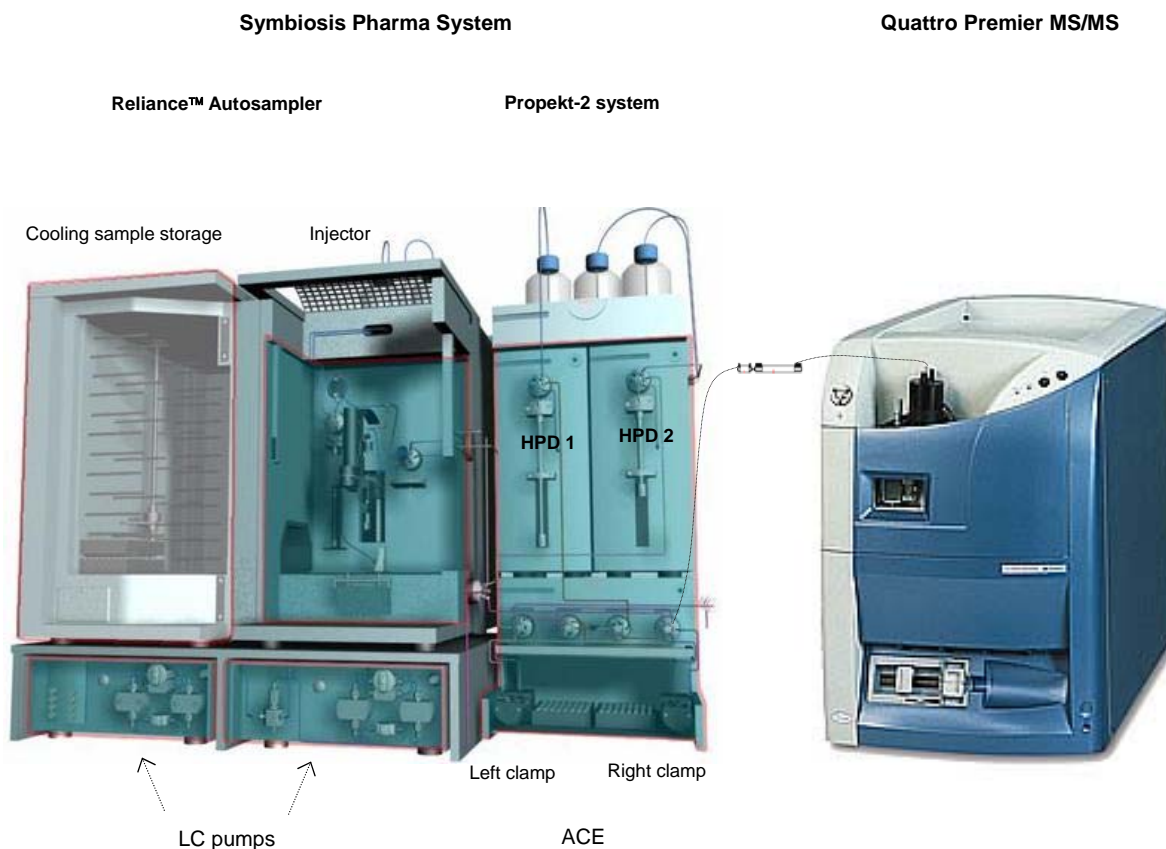
A different approach is the utilization of automated on-line SPE systems with the use of disposable cartridges, which accomplish the entire process of conditioning, sample loading, washing and elution at constant flow rates, yielding better precision relative to off-line driven extraction procedures and without the need of a pre-concentration step as the whole eluate is introduced into the LC column. These systems have one clamp where the SPE is carried out to, subsequently, perform the elution by transferring the cartridge to a second clamp, leaving the first one free so that a second sample can be extracted while the previous is being analysed. This way, SPE can be performed in parallel with the LC-MS run, eliminating the extra time that the SPE involves. Another advantage is the possibility of minimizing carry-over employing several washing steps of the system after extraction, as well as the utilization one-use cartridges. This alternative has been successfully employed for the analysis of different compounds [14-16], as described in the following section sample case.

## 7.2. METHODOLOGY DESCRIPTION

### 7.2.1 Instrumentation

Sample extraction was performed using the on-line SPE Symbiosis™ Pharma System (Spark Holland™, Emmen, The Netherlands). The system is composed of two integrated units: the Reliance™ autosampler with two binary LC pumps integrated and the on-line SPE unit Propekt-2 system (consisting of the automated cartridge exchange (ACE) unit and two high-pressure dispensers (HPD)). The entire system was operated by the SparkLink™ software (version 3.10, Spark Holland™).

A Quattro Premier triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, Waters Corp.) was employed. All aspects of data acquisition were controlled by MassLynx NT 4.0 software with automated data processing using the TargetLynx™ software (Waters Corp.).



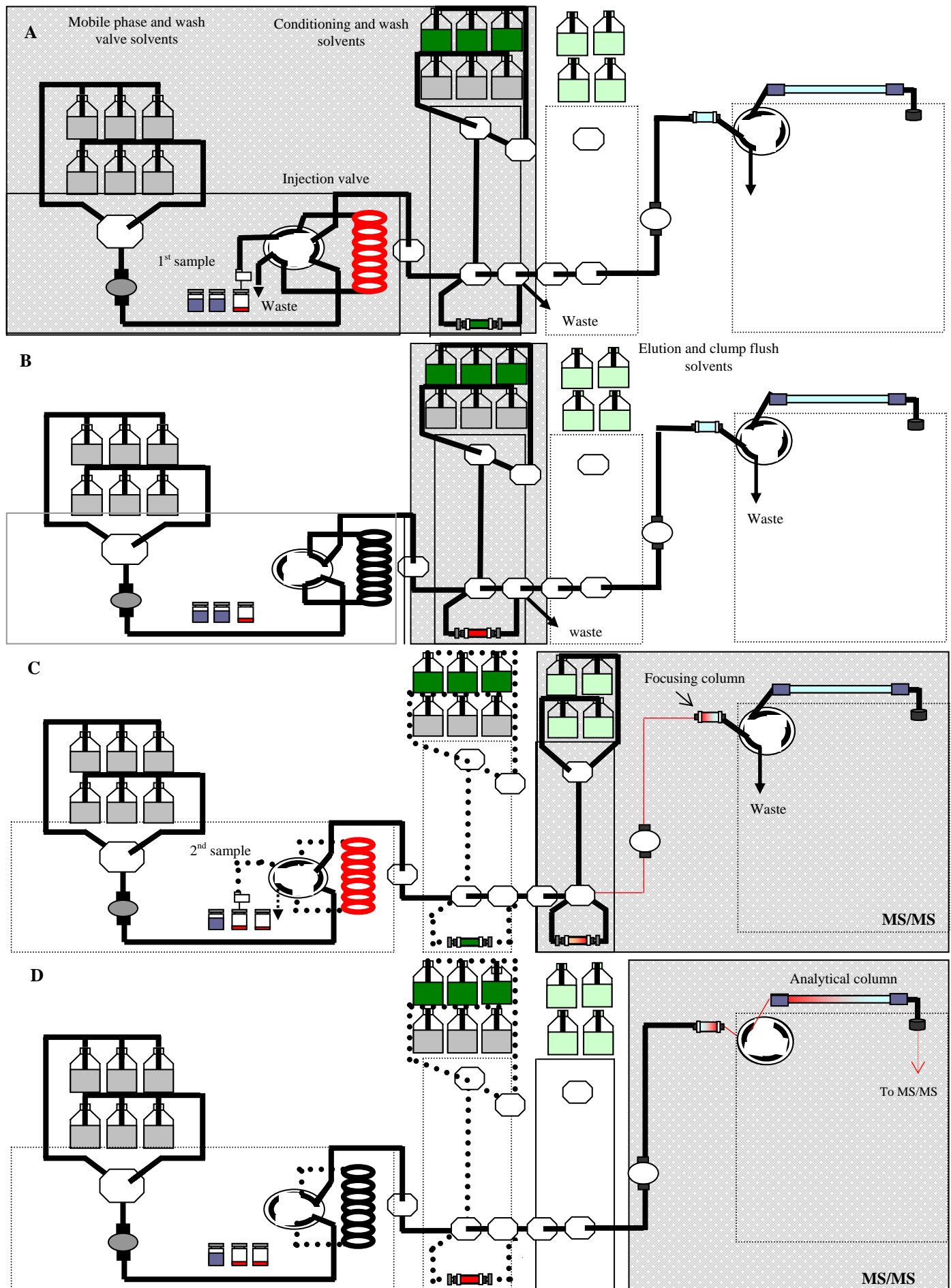
**Figure 44.** On-line SPE Symbiosis Pharma System coupled to Quattro Premier tandem mass spectrometer.

## 7.2.2. On-line SPE- LC-MS/MS

### 7.2.2.1. Sample Extraction: On-line SPE

Oasis MCX (cation exchange mode) Prospekt™ cartridges (Waters Corp.) were employed. The extraction was performed from 50µL of plasma sample, which was previously diluted with 950µL of 0.1% formic acid, the later to allow the compounds to be in the ionized form and favour their retention by the extraction columns. Before extraction, 50µL of a mixture of the internal standads (imipramine-d3, desipramine-d3, clomipramine-d3, fluoxetine-d6 and paroxetine-d6) at a concentration of 0.1mg/mL was added.

The following SPE program was subsequently used (Figure 44): after conditioning of the cartridges with 1mL of methanol, 1mL of water and 1mL of 0.1% formic acid (Figure 44.A), 100µL of the diluted plasma sample was applied onto the MCX extraction column using 1mL of 0.1% formic acid as transport solvent. Clean up was accomplished with successive 1mL washes of 0.1% formic acid and methanol in order to wash out salts and endogenous interferences present in the biological sample (Figure 44.B). The cartridge was then physically moved with a robotic arm to the elution clamp (right) in line with the LC pumps, leaving the extraction clamp (left) ready to start with a new sample. While the elution step was being performed, a new cartridge was conditioned, loaded and washed in the left clamp. The elution was performed with 300µL of 5% ammonia in methanol (at 100µL/min). Following the elution step, several automated clamp and valve washes were carried out to avoid contamination between samples. The time needed for the entire extraction process was 20 minutes.



**Figure 45.** Scheme of the on-line SPE-LC system coupled to the MS/MS. (A) While loading the sample into the sample loop, the first SPE cartridge is being conditioned in the left clamp. (B) Loading of the sample onto the cartridge followed by the washing steps. (C) The cartridge is moved to the right clamp, where the sample is eluted; the analytes are subsequently retained on the focussing column. Simultaneously, a second sample is subjected to the initial procedure of extraction in the left clamp. (D) After the elution step, the MS valve is switched and the analytes are directed to the analytical column in connection to the MS/MS. Following the analysis of the first sample, the second SPE cartridge is transferred to the right clamp in order to be eluted and analysed.

### 7.2.2.2. Chromatographic conditions

Focussing of the eluate was simultaneously performed as the compounds were eluted from the SPE cartridge by the use of a focussing column, Gemini C18 guard column (4 x 2.0 mm, 5 $\mu$ m) (Phenomenex, Torrance, CA, USA), and a gradient elution with 10 mM ammonium bicarbonate (pH 10) (A) and acetonitrile (B) (Figure 44.C). The gradient was carried out starting from 0% B and a flow rate of 1 mL/min for 3 min, as the eluate was diverted to the waste using the MS/MS Rheodyne<sup>®</sup> switching valve. At minute 3.01, a switch of the valve delivered the eluent to the analytical Gemini C18 column (150 x 2 mm, 5 $\mu$ m) (Phenomenex) (Figure 44.D) to start with the separation of the compounds at a flow rate of 0.3mL/min and 50% B over the next minute. From minute 4 to 5, B was subsequently increased to 70%, and then kept for 6.5 min. At minute 11.5, B was increased to 95% in 1.5 minutes before returning to 50% within 0.5 minutes and equilibrating for 4.5 minutes. At minute 18, a switch of the MS/MS valve diverted again the eluent to the waste, returning to the initial conditions to be ready for the analysis of the following sample. The applied gradient allows the elution of all the compounds within 14 minutes.

The SPE and the LC-MS/MS analysis are performed in parallel. As the time required for both processes is the same, when the analysis of the first sample is finished, the second sample is ready to start the chromatographic process, avoiding the extra time which involves the off-line sample preparation.

### 7.2.2.3. Tandem Mass Spectrometry

A Quattro Premier triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, Waters Corp.) was used. Ionization was achieved using electrospray in positive mode (ESI+). Nitrogen was used as nebulisation and desolvation gas at a flow rate of 800L/h and heated to 350°C. Capillary voltage and source block temperature were 1 kV and 120°C, respectively.

The appropriate multiple reaction monitoring (MRM) conditions for the individual compounds were established by infusion of standard solutions (200ng/mL, in 10mM ammonium bicarbonate (pH 10) - acetonitrile (50:50, v/v))

into the mass spectrometer and the cone voltage (CV) optimised to maximise the intensity of the protonated molecular species  $[M+H]^+$ . The signal of the most abundant product ions for each compound to be used in the MRM method were optimized maintaining the collision gas (argon) pressure at  $3.5 \times 10^{-3}$  mBar and adjusting the applied collision energy. Two transitions were monitored for each antidepressant studied. For the corresponding deuterated analogues, only one transition was monitored.

**Table 22.** Selected MRM conditions, retention time and internal Standard used for each compound.

MRM Function	Compound	Selected transition	CV	CE	t <sub>R</sub>	IS
Function 1: MRM of 2 transitions	Trazodone	372.1→147.9	40	35	6.9	Imipramine-d3
		<u>372.1→176.0</u>		25		
Function 2: MRM of 11 transitions	Fluvoxamine	<u>319.1→70.8</u>	25	15	7.4	Paroxetine-d6
		319.1→86.8		15		
	Norfluoxetine	296.1→30.0	15	8	7.8	Fluoxetine-d6
		<u>296.1→133.9</u>		6		
	Paroxetine	<u>330.1→69.8</u>	40	28	7.9	Paroxetine-d6
		330.1→192.1		20		
	Paroxetine-d6	<u>284.2→88.8</u>	32	35	7.9	
	Citalopram	<u>325.1→108.8</u>	30	25	8.0	Imipramine-d3
		325.1→115.8		25		
	Venlafaxine	<u>278.1→57.8</u>	20	18	8.4	Imipramine-d3
		278.1→260.1		12		
Function 3: MRM of 16 transitions	Fluoxetine	<u>310.1→43.9</u>	20	12	9.1	Fluoxetine-d6
		310.1→147.9		8		
	Fluoxetine-d6	316.1→43.9	12	20	9.1	
	Desipramine	267.2→44.0	25	30	9.6	Desipramine-d3
		<u>267.2→71.8</u>		15		
	Desipramine-d3	270.2→74.8	15	25	9.6	
	Nortryptiline	<u>264.1→90.8</u>	25	20	10.3	Desipramine-d3
		264.1→233.2		15		
	Norclomipramine	301.1→43.9	25	35	10.9	Clomipramine-d3
		<u>301.1→71.8</u>		20		
	Imipramine	281.2→57.7	25	35	11.4	Imipramine-d3
		<u>281.2→85.7</u>		10		
	Imipramine-d3	284.2→88.8	18	25	11.4	
	Sertraline	<u>306.1→158.8</u>	15	30	11.7	Fluoxetine-d6
		306.1→275.0		12		
	Function 4: MRM of 16 transitions	Amitryptiline	<u>278.1→90.8</u>	30	25	12.5
278.1→104.8			20			
Clomipramine		315.1→57.9	30	30	13.8	Clomipramine-d3
		<u>315.1→85.8</u>		18		
Clomipramine-d3	318.1→88.8	20	30	13.8		

Underlined transitions were used for quantifying purpose.

CV: cone voltage (V); CE: collision energy (eV); t<sub>R</sub>: Retention time (min); IS: internal standard used for each compound



### 7.2.3. Method validation

The validation process was performed in accordance to the criteria established by international associations in the papers cited in chapter 6.

#### 7.2.3.1. Selectivity

The selectivity of the method against endogenous interferences was verified by examination of the chromatograms obtained after the extraction of six different blank plasma samples conserved in two different anticoagulants (sodium citrate (n=3) and sodium fluoride (n=3)). The selectivity was also adequate when analysing plasma samples spiked with a solution containing 27 benzodiazepines at 2µg/mL.

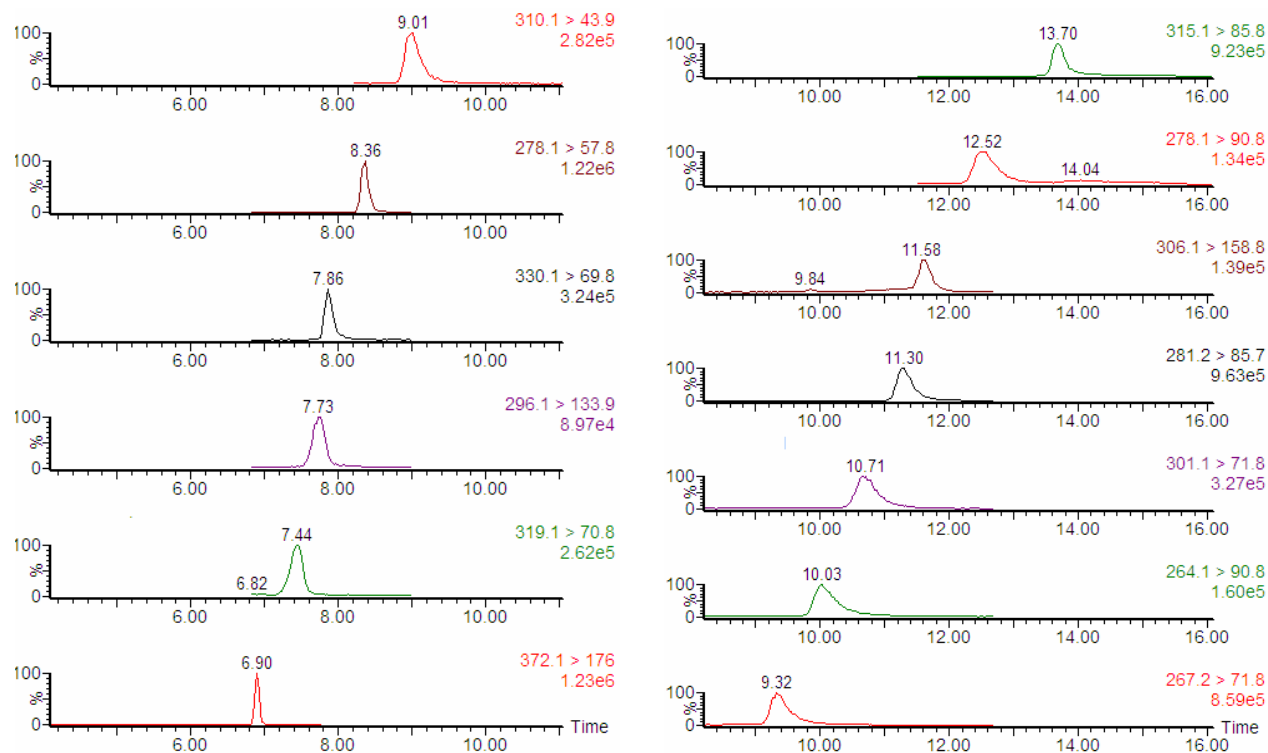
#### 7.2.3.2. Calibration model

The calibration model which best described the relationship between the theoretical concentration and the mass spectrometer response for each compound was studied in the range from 10 up to 1000ng/mL by analysing freshly prepared standard curves at 7 calibration levels (10, 25, 50, 125, 250, 500 and 1000ng/mL), on six different days.

Quantitation was performed by integration of the area under the most prominent MRM transition for each compound in reference to the integrated area of the deuterated analogues. A weighted (1/x) linear regression line was applied for all the compounds, except for trazodone, nortriptyline and norclomipramine, for which a quadratic response was found to be more suitable, obtaining determination coefficients ( $r^2$ ) > 0.99 in all cases.

#### 7.2.3.3. Limit of quantitation

The limit of quantitation (LOQ) was selected taken into account the lower calibrator for which the calculated concentration was within 20% of the nominal value and the relative standard deviation (RSD) was less than 20%. Thus, the selected LOQ was 10ng/mL for all the compounds.



**Figure 46.** Chromatograms of the quantifying transitions for all the antidepressants at the LOQ= 10ng/mL.

#### 7.2.3.4. Precision and accuracy

Intra-assay precision and accuracy were evaluated by analysing five replicates of plasma QCs at three concentration levels (40, 200 and 800ng/mL) on the same run. Inter-assay precision and accuracy were evaluated by replicated analysis of the three QCs on six different days. The results obtained, expressed in terms of C.V. (precision) and M.R.E. (accuracy), fulfilled the accepted criteria in all cases.

#### 7.2.3.5. Recovery

In order to optimize the elution conditions *i.e.* elution volume and flow rate, a 1000 µg/L calibrator (n=3) was injected in the absence of both the analytical and focusing column. As such the compounds achieve directly the MS/MS as they elute from the SPE cartridge. In a second experiment, performed to

calculate the total recovery, a 1000 µg/L calibrator (n=3) was loaded and washed in a first SPE cartridge while a second cartridge was placed in series to determine the breakthrough of the first one. Both cartridges were subsequently eluted independently. Recovery was considered to be the ratio between the response obtained after elution of the first cartridge and the total response (sum of both, the first and the second SPE cartridge).

That way, recovery was calculated to be higher than 99% for all the compounds.

**Table 23.** Main validation parameter results, including calibration model, matrix effect and intra and inter-assay precision and accuracy for all the compounds.

Compound	Concentration (ng/mL)	Matrix effect (%)	Intra-assay precision and accuracy (n=5)		Inter-assay precision and accuracy (n=6)	
			C.V.	M.R.E.	C.V.	M.R.E.
trazodone	LOQ=10	10.9	5.9	6	10.0	0.4
	40		6.1	9.0	11.5	2.5
	200		1.5	16.6	7.0	-0.2
	800		4.7	-13.4	13.2	-15.8
	1000					
Calibration curve (n=6): slope x <sup>2</sup> = -0.00018±0.00018, Slope x=0.51466±0.17751, intercept=0.3562±0.539678, r <sup>2</sup> =0.9984±0.0012						
fluvoxamine	LOQ=10	16.8	3.5	-9.3	4.3	-16.6
	40		7.2	4.8	10.9	-8.8
	200		3.3	8.3	7.6	-5.3
	800		3.8	5.5	8.7	0.9
	1000					
Calibration curve (n=6): Slope x=1.41972±0.28316, intercept=0.3562, r <sup>2</sup> =0.9981±0.00166						
norfluoxetine	LOQ=10	0.5	18.2	-4.0	15.3	-1.8
	40		7.5	14.0	14.3	2.8
	200		3.8	18.1	15.0	-3.4
	800		7.5	10.1	8.6	0.2
	1000					
Calibration curve (n=6): Slope x <sup>2</sup> = -0.00003±0.00005, Slope x=0.23949±0.06704, intercept=0.3562, r <sup>2</sup> =0.9974±0.00223						
paroxetine	LOQ=10	6.7	4.3	-6.0	5.5	-7.8
	40		6.4	2.0	6.5	-3.8
	200		2.2	6.4	7.2	-3.2
	800		4.3	0.9	8.8	0.7
	1000					
Calibration curve (n=6): Slope x=0.90145±0.04974, intercept=0.3562, r <sup>2</sup> =0.9987±0.00142						

Table 23. (continuation)

Compound	Concentration (ng/mL)	Matrix effect (% signal reduction)	Within-day precision and accuracy (n=5)		Between-day precision and accuracy (n=5)	
			C.V.	M.R.E.	C.V.	M.R.E.
citalopram	LOQ=10		6.23	-1.50	4.4	-2.6
	40		4.4	10.3	7.8	7.8
	200		2.0	11.0	7.8	0.7
	800		2.8	-0.4	10.1	-2.4
	1000	5.9				
Calibration curve (n=6): Slope $x=0.35105\pm0.03558$ , intercept= $0.13407\pm0.4376234$ , $r^2=0.9977\pm0.00174$						
venlafaxine	LOQ=10		1.9	-3.0	10.9	0.4
	40		5.6	10.0	12.5	7.8
	200		1.7	13.7	10.4	-0.8
	800		5.5	-2.4	13.0	-1.8
	1000	10.6				
Calibration curve (n=6): Slope $x=0.56466\pm0.04281$ , intercept= $0.28126\pm1.28545305$ , $r^2=0.9975\pm0.00046$						
fluoxetine	LOQ=10		5.7	1.5	14.2	-0.2
	40		7.3	9.5	10.7	0.0
	200		3.0	10.0	9.8	-1.8
	800		8.3	2.1	9.9	1.8
	1000	12.1				
Calibration curve (n=6): Slope $x=1.15306\pm0.10708$ , intercept= $0.3562$ , $r^2=0.9986\pm0.0011$						
desipramine	LOQ=10		3.5	9.5	11.1	1.8
	40		5.4	8.2	5.4	1.3
	200		3.1	6.9	6.2	-2.8
	800		3.2	3.8	11.1	-1.1
	1000	9.1				
Calibration curve (n=6): Slope $x=1.19887\pm0.07724$ , intercept= $-0.14990\pm0.8318427$ , $r^2=0.9990\pm0.00099$						
nortriptyline	LOQ=10		11.4	1.8	7.8	-7.2
	40		6.4	4.3	8.4	-4.8
	200		3.6	5.5	8.3	-4.0
	800		5.1	1.7	13.6	0.0
	1000	11.8				
Calibration curve (n=6): Slope $x=0.31639\pm0.02680$ , intercept= $0.3562$ , $r^2=0.9985\pm0.0011$						
norclomipramine	LOQ=10		10.5	-0.5	6.3	-10.6
	40		6.5	0.0	15.4	-8.5
	200		15.5	13.5	7.0	-1.5
	800		3.4	-0.2	5.5	1.1
	1000	10.4				
Calibration curve (n=6): Slope $x^2=0.00011\pm0.00006$ , Slope $x=0.45436\pm0.0548$ , intercept= $0.3562$ , $r^2=0.9968\pm0.00337$						
imipramine	LOQ=10		3.0	5.5	6.5	1.4
	40		2.3	8.5	6.4	0.3
	200		1.3	13.1	7.4	-1.0
	800		3.8	3.4	11.4	0.8
	1000	7.1				
Calibration curve (n=6): Slope $x=1.20045\pm0.06889$ , intercept= $-0.11744\pm2.0591444$ , $r^2=0.9972\pm0.0028$						

Table 23. (continuation)

Compound	Concentration (ng/mL)	Matrix effect (% signal reduction)	Within-day precision and accuracy (n=5)		Between-day precision and accuracy (n=5)	
			C.V.	M.R.E.	C.V.	M.R.E.
sertraline	LOQ=10		3.9	-5.5	8.8	-7.4
	40		5.2	5.5	14.1	-7.0
	200		3.5	11.0	9.2	-3.1
	800		5.5	6.3	7.6	3.1
	1000	15.2				
Calibration curve (n=6): Slope $x=0.72268\pm0.07656$ , intercept=0.3562, $r^2=0.9975\pm0.00305$						
amitriptyline	LOQ=10		6.1	-12.8	17.0	-6.0
	40		5.9	-4.3	10.1	12.0
	200		3.1	1.6	9.2	-9.1
	800		4.2	0.7	9.7	-2.5
	1000	22.8				
Calibration curve (n=6): Slope $x=0.36453\pm0.05850$ , intercept=0.3562, $r^2=0.9977\pm0.00128$						
clomipramine	LOQ=10		3.2	-7.5	12.0	-4.2
	40		6.5	9.8	9.9	3.8
	200		1.7	9.6	7.5	3.6
	800		5.1	-4.5	10.3	1.0
	1000	17.7				
Calibration curve (n=6): Slope $x=0.82176\pm0.36736$ , intercept=0.3562, $r^2=0.9973\pm0.00268$						

### 7.2.3.6. Assessment of matrix effect

The potential effect of the sample matrix in the response of the analytes was evaluated on two different ways. One of them consisted of the standard post-column infusion experiment previously described on chapter 6. Thus, a mixture of the drugs and their internal standards (10ng/mL at a flow rate of 10 $\mu$ L/min) was continuously infused to produce a constant elevated response in the MRM channels. The interference of this constant response was monitored following the injection of plasma samples [in two different anticoagulants: sodium citrate (n=3) and sodium fluoride (n=3)] and compared to the response following the injection of mobile phase. The second type of experiment compares the peak responses after the analysis of a blank plasma sample spiked at 1000ng/mL calibrator (n=3) to those obtained from water spiked at the same concentration level.

Matrix effect was calculated to be less than 20% in all cases, except for amitriptyline, for which a reduction in the signal about 23% was found (Table 24).

#### **7.2.3.7. Stability studies**

The stability of the drugs was evaluated by analysing diluted plasma samples after *48 hours of storage at  $6 \pm 2^\circ\text{C}$  in the autosampler*. For this purpose, samples of blank plasma (50 $\mu\text{L}$ ) were diluted with 950 $\mu\text{L}$  of formic acid 0.1% and spiked at concentrations of 40, 200 and 800ng/ml. Three of them at each concentration level (control samples) were spiked with the internal standards (IS) and analyzed immediately. The same procedure (n=3) at the three QC levels was performed after the storage of the samples for 24 and 48 hours in the autosampler. The stability after *three freeze/thaw cycles* was also investigated. Control samples (n=3) and stability samples were prepared at concentration of 40 and 200ng/mL. Then, the IS were added to the control samples and they were analyzed immediately. The stability samples (n=3 at each concentration level) were subjected to three freeze/thaw cycles by freezing at  $-20^\circ\text{C}$  for 24 h, thawed, and then maintained at ambient temperature for 1 h after being frozen again. After the three cycles, the samples were spiked with the IS and analyzed.

The mean values obtained at the studied levels for the stability samples were within a limit of confidence  $>80\%$  and  $<120\%$  with respect to the mean values obtained for the control samples at the same concentration.

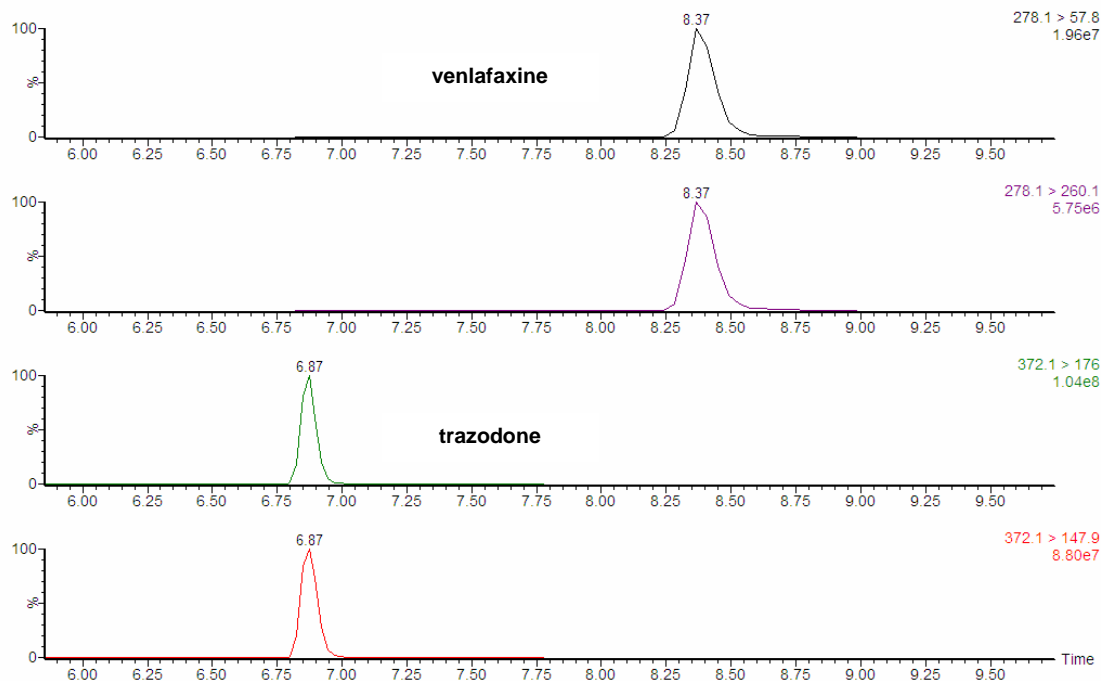
#### **7.2.4. Analysis of real cases.**

This methodology was applied to the analysis of 11 authentic samples from clinical cases which were previously analysed by liquid chromatography coupled to a diode array detector (LC-DAD) using a routine screening method.

The results obtained are shown in Table 24.

**Table 24.** Results from the real cases after the screening analysis and their confirmation and quantitation after their analysis with the on-line SPE-LC-MS/MS method.

Case N°	Results LC-DAD (Screening)	Results SPE-LC-MS/MS
51026/792	Trazodone (+)	Trazodone: 946ng/mL
	Venlafaxine (+)	Venlafaxine : 191.4ng/mL
051109/927	Fluoxetine (+)	Fluoxetine : 214ng/mL
	Norfluoxetine (+)	Norfluoxetine : 170ng/mL
051111/954	Trazodone (+)	Trazodone: 1963ng/mL
051104/874	Fluoxetine (+)	Fluoxetine: 381ng/mL
	Norfluoxetine (+)	Norfluoxetine: 95ng/mL
051029/816	Amitryptiline (+)	Amitryptiline: 132ng/mL
	Nortryptiline (+)	Nortryptiline: 90ng/mL
051102/862	Trazodone (+)	Trazodone: 1284ng/mL
051102/857	Amitryptiline (+)	Amitryptiline: 1542ng/mL



**Figure 47.** Chromatograms of the selected transitions for venlafaxine and trazodone after the analysis of case number 51026/792. Concentrations found for both compounds are specified in table 26.

## REFERENCES

- [1] K. Georgi, K.S. Boos. Control of matrix effects in bioanalytical MS/MS using on-line multidimensional solid-phase extraction. *LC•GC Eur.*, 2004; n17 (11a): 21-24.
- [2] J.L. Veuthey, S. Souverain, S. Rudaz. Column-switching procedures for the fast analysis of drugs in biological samples. *Ther. Drug Monit.*, 2004; 26: 161-166.
- [3] G. Hopfgartner, E. Bourgoigne. Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, 2003; 22: 195-214.
- [4] M. Jemal. High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS. *Biomed. Chromatogr.*, 2000; 14: 422-429.
- [5] H. Zeng, J-T. Wu, S.E. Unger. The investigation and the use of high flow column-switching LC/MS/MS as a high-throughput approach for direct plasma sample analysis of single and multiple components in pharmacokinetic studies. *J. Pharm. and Biomed. Anal.*, 2002; 27: 967-982.
- [6] E. Koster, P. Ringeling, B. Ooms. Denaturing solid-phase extraction for reduced protein interference in bioanalytical SPE-LC-MS. *LC•GC. The Applications Book*, September 2002. [www.lcgceurope.com](http://www.lcgceurope.com).
- [7] J.L. Herman. Generic method for on-line extraction of drugs substances in the presence of biological matrices using turbulent flow chromatography. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002; 16: 421-426.
- [8] S. Waite, A. Dixon, K. Kallury. Three minutes for the extraction, aggressive clean-up and analysis of the strongly polar drug acyclovir from plasma using strata™ X on-line cartridges. *LC•GC. The Applications Book*, May 2004. [www.lcgceurope.com](http://www.lcgceurope.com)



- [9] L. Ynddal, S.H. Hansen. On-line turbulent-flow chromatography-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for fast sample preparation and quantitation. *J. Chromatogr. A*, 2003; 1020: 59-67.
- [10] S. Souverain, M. Mottaz, S. Cherkaoui, J.L. Veuthey. Rapid analysis of fluoxetine and its metabolite in plasma by LC-MC with column-switching approach. *Ana. Biomed. Chem.*, 2003; 377: 880-885.
- [11] M. Kollroser, C. Schober. Simultaneous determination of seven tricyclic antidepressant drugs in human plasma by direct-injection HPLC-APCI-MS-MS with an ion trap detector. *Ther. Drug Monit.*, 2002; 24: 537-544.
- [12] M. Kollroser, C. Schober. An on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of citalopram, fluvoxamina, and paroxetine in human plasma. *Chromatographia*, 2003; 57: 133-138.
- [13] F.L. Sauvage, J.M. Gaulier, G. Lachâtre, P. Marquet. A fully automated turbulent-flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry technique for monitoring antidepressants in human serum. *Ther. Drug Monit.*, 2006; 28: 123-130.
- [14] T. Koal, M. Sibum, E. Koster, K. Resch, V. Kaefer. Direct and fast determination of antiretroviral drugs by automated online solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry in human plasma. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2006; 44: 299-305.
- [15] J.Y.K. Hsieh, L. Lin, B.K. Matuszewski. High-throughput liquid chromatographic determination of rofecoxib in human plasma using fully automated on-line solid-phase extraction system. *J. Liquid Chromatogr. And Rel. Technol.*, 2001; 24: 799-812.
- [16] M.J. Hilhorst, E.H.M. Koster, J.A. Ooms, H.A.G. Niederländer. G.J. de Jong. Determination of clozapine and desmethylclozapine in serum by high throughput on-line SPE-LC-MS. *LC•GC. The Applications Book*, April 2002.



## VIII. CONCLUSIONES



1. Se ha desarrollado una metodología empleando la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS) que permite la determinación simultánea de 9 antidepresivos y 4 de sus principales metabolitos a partir de muestras de plasma y fluido oral, previa extracción de los compuestos a partir de dichos medios biológicos mediante la utilización de un sistema automático de extracción en fase sólida.
2. El método ha sido satisfactoriamente validado de acuerdo con las normas propuestas en guías publicadas a este fin por organismos reconocidos a nivel internacional. Los parámetros estudiados han sido la linealidad (2, 4 ó 10-1000ng/mL en plasma y 2-500ng/mL en fluido oral, con  $r^2 > 0.99$ ), la precisión y la exactitud intra e interdía (CV y MRE < 15%), el límite de detección (0.5ng/mL) y el límite de cuantificación (2, 4 ó 10ng/mL), la recuperación (49-72%), la intensidad relativa de los iones (CV < 20%), el efecto matriz (ausencia de supresión o aumento de la señal) y la estabilidad después de tres ciclos de congelación/descongelación (CV y MRE < 20%), cumpliéndose los criterios establecidos para cada uno de ellos en todos los casos.
3. Se ha aplicado la metodología descrita al análisis de muestras reales remitidas al Servicio de Toxicología del Instituto de Medicina Legal de la Universidad de Santiago de Compostela. La procedencia de la mayor parte de las muestras positivas a antidepresivos fue hospitalaria (76.8%), tratándose en un 69.7% de los casos de mujeres. En el 25% de los casos los niveles de antidepresivos detectados estuvieron por encima de los terapéuticos, y en el 50% de las muestras se encontraron otras sustancias, generalmente benzodiazepinas.
4. Se ha iniciado un estudio para evaluar la posible correlación entre los niveles de antidepresivos en plasma y saliva mediante la aplicación de la metodología descrita al análisis de muestras procedentes de pacientes psiquiátricos a tratamiento con estos fármacos. En esta primera fase se han procesado muestras procedentes de ocho pacientes, de los cuales sólo en seis casos se dispuso de ambos tipos de especímenes de dos

semanas distintas, por lo que este estudio deberá continuarse hasta procesar un número de muestras significativo desde el punto de vista estadístico. Este estudio preliminar ha llevado a la obtención de ciertas conclusiones acerca de correcciones en el protocolo a seguir en un futuro en cuanto a la toma de muestras.

5. La utilización de LC-MS(/MS) ha demostrado una gran utilidad en la determinación de antidepresivos, cuyo análisis mediante otras técnicas requiere un tratamiento más complejo, así como en su aplicación a la determinación a partir de medios biológicos alternativos como el fluido oral que, debido a los bajos niveles presentes en el mismo, requieren de técnicas que suministren una elevada sensibilidad.

## **IX. PERSPECTIVAS**





El estudio que se presenta en esta memoria representa los primeros eslabones de un proyecto más ambicioso, y que pretende abarcar otros objetivos más complejos, entre los que figuran:

- En primer lugar, se pretende adaptar el método descrito a la determinación de antidepresivos en otros medios biológicos como orina (mediante la detección de glucurónidos) y en pelo, ya que no siempre que se solicita un análisis toxicológico se dispone de las muestras de plasma para las que la metodología ha sido validada.
- Se pretende, asimismo, continuar con el estudio preliminar iniciado sobre la correlación de concentraciones entre plasma y saliva. Por ello, se continuará con la recolección de ambos especímenes, modificando el protocolo establecido, tal y como se comentó previamente.
- Finalmente, la metodología desarrollada será una de las herramientas utilizadas en un estudio farmacogenético cuyo objetivo será identificar las bases genéticas de las diferencias interindividuales halladas en la respuesta a los antidepresivos. Estas diferencias heredadas, basadas fundamentalmente en las enzimas que llevan a cabo la metabolización de estos fármacos, han demostrado tener una importante repercusión tanto en la eficacia terapéutica como en la toxicidad de estos fármacos.



**ANEXOS**





# Determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in oral fluid using high performance liquid chromatography with native fluorescence detection

Marta Concheiro, Ana de Castro, Oscar Quintela,  
Manuel López-Rivadulla, Angelines Cruz\*

*Forensic Toxicology Service, Institute of Legal Medicine, University of Santiago de Compostela,  
c/ San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain*

Received 24 November 2004; received in revised form 2 December 2004; accepted 2 December 2004  
Available online 6 April 2005

## Abstract

This paper describes the analytical methodology for the determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in oral fluid. After a liquid–liquid extraction, the analysis was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC), with fluorescence detection. The detector wavelength was fixed at 285 nm for excitation and 320 nm for emission. The mobile phase, a mixture of phosphate buffer (pH = 5) and acetonitrile (75:25), and the column, Kromasil 100 C8 5  $\mu\text{m}$  250 mm  $\times$  4.6 mm, allowed good separation of the compounds in an isocratic mode in only 10 min. The method was validated and showed good limits of detection (2 ng/mL) and quantitation (10 ng/mL) for all the amphetamine derivatives. No interfering substances were detected. A stability study of these compounds in oral fluid stored at three different temperatures (–18, 4 and 20 °C) over 10 weeks was conducted, showing a time-dependent degradation of the four compounds.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** MDMA; MDA; MDEA; MBDB; Oral fluid; HPLC; Fluorescence

## 1. Introduction

Drug dependency is a very serious health problem in the world. Many substances are used as recreational drugs including the amphetamine derivatives, MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine), MDA (3,4-methylenedioxyamphetamine), MDEA (3,4-methylenedioxyethylamphetamine) and MBDB (*N*-methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butamine), as stimulants or hallucinogens. Their use is increasing sharply in the last few years. In Spain the number of tablets confiscated increased 62% between 2001

and 2002, whereas the number of abuse and dependent ecstasy treatments increased from 226 in 1996 to 335 in 2001 [1].

For these reasons it is very useful to have a very quick, sensitive and specific procedure for detecting these drugs in biological samples in clinical and forensic settings.

Oral fluid (OF) is considered as the main alternative matrix to blood to document recent use of medicines or drugs of abuse [2]. OF contains saliva and other fluids and substances which are present in oral cavity. Substances tend to be detectable in OF for shorter periods than in urine, typically for the 12–24 h after consumption [3]. The greatest advantages of OF are non-invasive sample collection and staff can directly observe patients when they produce the samples, usually by placing a collection tube or device in

\* Corresponding author. Tel.: +34 981582327;  
fax: +34 981580336.

*E-mail address:* [apimlgel@usc.es](mailto:apimlgel@usc.es) (A. Cruz).

their mouth; this assures staff that the sample comes from the patient and the procedure respects the patients' dignity. The disadvantage of OF is that people are sometimes unable to produce sufficient amounts of fluid for analysis.

Only a few studies have published the detection of amphetamine derivatives in OF. The technologies applied were GC–MS [2,4] and LC–MS/MS [5–7]. GC–MS is a very sensitive and specific method, but its main disadvantage is that amphetamines need derivatization, which is time consuming and expensive. LC–MS/MS is one of the best technologies but there are a lot of toxicology laboratories that cannot afford such instrumentation.

HPLC with fluorescence detection is among the most used techniques for the analysis of MDMA and analogue compounds. In the literature Sadeghipour and Veuthey developed a method in serum and tablets [8], Herráez-Hernández et al. in plasma and urine [9], Clauwaert et al. in whole blood, serum, vitreous humor and urine [10], da Costa and da Matta Chasin in urine [11], Tagliaro et al. [12] and Kaddoumi et al. [13] in hair. Mancinelli et al. [14] applied a fluorimetric procedure for the determination of amphetamines in biological matrices and street samples, and gave a brief reference to OF.

Stability must be included in the method validation. Knowledge of the stability of a drug is of importance for toxicologists in several situations, limitations of a logistic nature often introduce variable time intervals between sampling of the matrices and analysis. Even in these kinds of situations, the toxicologist should be able to determine if interpretation of the obtained quantitative data can be performed reliably [15]. Only two stability studies were found in the literature. Garret et al. [16] investigated the stability of MDA and MDMA during 47 days in frozen plasma, and Clauwaert et al. [15] studied the stability of MDA, MDMA, MDEA and MBDB over a period of 21 weeks in serum, whole blood, water and urine. No references were found on the stability of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in OF.

We present a rapid, simple and specific validated method that allows the simultaneous determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in OF using HPLC with fluorescence detection, including a preliminary stability study of amphetamine derivatives over a period of 10 weeks in OF.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals

All the reagents were of analytical-reagent grade. Acetonitrile, methanol, potassium dihydrogen phosphate, sodium hydroxide were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), and sodium sulphate anhydride from Panreac (Barcelona, Spain). Standards of MDMA, MDA, MDEA and MBDB were obtained from Lipomed (Arlesheim, Switzerland). Standard solutions of each compound were prepared

at a concentration of 1 mg/mL in methanol. Tox tubes A<sup>®</sup> from Varian (Middelburg, The Netherlands) were used for the liquid–liquid extraction.

### 2.2. Equipment and chromatography

The chromatographic system used was a model 616 Pump, model 717 plus Autosampler and model 474 Scanning Fluorescence Detector from Waters (Milford, Massachusetts). The detector wavelength was fixed at 285 nm for excitation and 320 nm for emission, Gain 100. A Kromasil 100 C8 5  $\mu\text{m}$  250 mm  $\times$  4.6 mm column from Teknokroma (Barcelona, Spain) was used for the separation of analytes and, as guard cartridge, a Spherisorb<sup>®</sup> S5 C8 4.6 mm  $\times$  10 mm from Waters (Milford, Massachusetts). The mobile phase used was a mixture of potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.03 M pH = 5 and acetonitrile (75:25) in isocratic mode, pumped at 1 mL/min flow-rate.

### 2.3. Sample preparation

#### 2.3.1. Spiked samples

Different volumes of the working standard solutions, that had been prepared in water, were added to 1 mL of drug-free OF (obtained from laboratory staff) to obtain spiked OF samples at 10, 25, 50, 125 and 250 ng/mL.

#### 2.3.2. Liquid–liquid extraction procedure

One milliliters of OF and 1 mL of distilled water were introduced in a Tox tube A<sup>®</sup>. After shaking during 15 min and centrifuging during 10 min at 4800 rpm, the organic layer (1.4 mL) was collected and transferred to a clean tube. Five milliliters of NaOH 0.05 M was added. After shaking for 15 min, and before centrifuging 10 min at 4800 rpm, 8.5 g of anhydrous sodium sulphate was added.

One milliliters of the organic layer was transferred to a conical tube containing 50  $\mu\text{L}$  of methanolic HCl (5 M hydrochloric acid in methanol) and evaporated to dryness under a fine stream of nitrogen at 30 °C. The residue was reconstituted with 200  $\mu\text{L}$  of mobile phase and a 20  $\mu\text{L}$  aliquot was injected into the HPLC system.

### 2.4. Validation of the method

The method was validated for linearity, intra- and inter-assay precision, recovery, limits of detection and quantitation, selectivity and stability. The analytical validation was performed according to the guidelines of the FDA [17].

#### 2.4.1. Linearity

Calibration curves were carried out for MDA, MDMA, MDEA and MBDB at concentrations between 10 and 250 ng/mL (10, 25, 50, 125, 250 ng/mL). The simplest model that adequately described the concentration–response relationship was linear regression.

Table 1

Validation parameters of the described method for the determination of MDA, MDMA, MDEA and MBDB in oral fluid by HPLC/FD

	MDA	MDMA	MDEA	MBDB
Linearity	10–250 ng/mL; $r^2 = 0.998$	10–250 ng/mL; $r^2 = 0.996$	10–250 ng/mL; $r^2 = 0.998$	10–250 ng/mL; $r^2 = 0.995$
Intra-assay precision (CV%)				
25 ng/mL	8.4	3.3	3.3	6.4
250 ng/mL	8.6	7.0	6.5	7.1
Inter-assay precision (CV%)				
25 ng/mL	7.9	8.6	5.9	8.8
250 ng/mL	16.4	19.1	20	23.5
Recovery (%)				
25 ng/mL	55.4	59.7	61.2	63.0
250 ng/mL	45.4	50.7	53.1	51.3
LOD (ng/mL)	2	2	2	2

#### 2.4.2. Intra- and inter-assay precision

Precision, expressed as the coefficient of variation (CV) of the measured values, was expected to be less than 15% at all concentrations, except for the lower limit of quantitation (LLOQ), for which 20% was acceptable. For intra-assay precision six replicates at 25 and 250 ng/mL were analyzed on the same batch and for inter-assay precision five replicates at 25 and 250 ng/mL were analyzed on five different days.

#### 2.4.3. Recovery

Three individual extracts and three replicates of the compounds, prepared directly in the mobile phase, were injected onto the column. The assay recovery for each compound was determined as follows: mean peak area of the extract/mean peak area direct injection  $\times$  100. The recovery was determined at 25 and 250 ng/mL.

#### 2.4.4. Limits of detection and limits of quantitation

The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were determined by analyzing decreasing concentrations of the compounds added to drug-free OF. The LOD was defined as the lowest concentration that produced a response three times higher than the background noise. The LOQ was defined as the lowest concentration that could be quantified with an imprecision  $<20\%$  and was established as the lowest point of the calibration graph.

#### 2.4.5. Selectivity

Selectivity is the ability of an analytical method to differentiate and quantify the analyte in the presence of other components in the sample. For selectivity, blank oral fluids from six different sources were analyzed and potential interfering substances were investigated. For this propose, several drugs were dissolved in mobile phase at high concentration (1  $\mu\text{g/mL}$ ) and were injected into the HPLC system under the same conditions of the method [10].

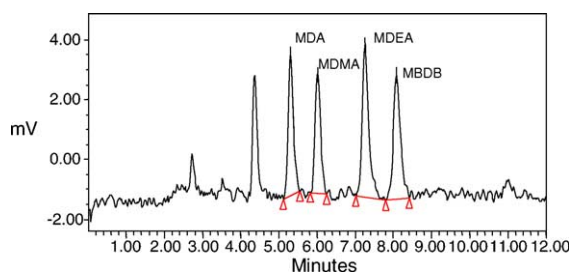


Fig. 1. Chromatogram of a blank oral fluid spiked with 2 ng/mL of MDA, MDMA, MDEA and MBDB.

#### 2.4.6. Stability

A pool sample with MDA, MDMA, MDEA and MBDB at concentration of 10 ng/mL was prepared in water and in OF. In the case of OF a pool of blank sample was also prepared. The pools were divided in 1.5 mL aliquots in Eppendorf tubes. These tubes were stored at  $-18$ , 4 and  $20$  °C protected from light. One aliquot of each matrix for each storage condition was analyzed at different time intervals (weeks 1–4, 6, 8 and 10). For the quantitation, a calibration curve and quality controls at 10 ng/mL were performed for each stability sample. The samples stored in water were not extracted.

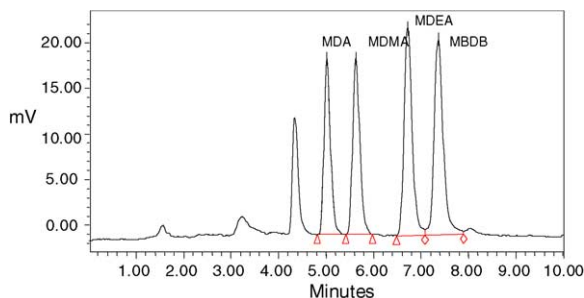


Fig. 2. Chromatogram of a blank oral fluid spiked with 10 ng/mL of MDA, MDMA, MDEA and MBDB.

Table 2

Drugs investigated as possible interferences in the determination of MDA, MDMA, MDEA and MBDB by HPLC/FD

Drugs of abuse and metabolites	Cocaine, benzoylecgonine, THC, amphetamine, methamphetamine, LSD
Opiates and relatives	Morphine, codeine, methadone, propoxyphene, pentazocine, papaverine, nalorphine
Benzodiazepines	Alprazolam, lorazepam, diazepam, nordiazepam, flunitrazepam, triazolam, oxazepam, midazolam, bromazepam, medazepam, lormetazepam
Antidepressives	Clomipramine, amitriptyline, nortriptyline, imipramine, citalopram, fluoxetine, fluvoxamine, venlafaxine
Miscellaneous	Zopiclone, haloperidol, ibuprofen, caffeine, paracetamol, acetylsalicylic acid

Statistical data analysis applied to this stability study was least squares ( $y = C + \beta_1 TI + \beta_2 TE$ ; TI is the time and TE is the temperature). The statistical analyses applied were *F*-test and *t*-test. In both tests, *P* value under 0.05 showed that the effect was statistically significant. *t*-Test showed the effect of the time and of the temperature separately and *F*-test showed the effect of the time and the temperature at the same time.

### 3. Results and discussion

Under the described conditions the separation of MDA, MDMA, MDEA and MBDB was complete (resolution > 1.5). The run time was only 10 min in isocratic mode. In the literature, chromatographic methods using isocratic mode were found, but the run time was over 10 min [11,12], or MDA and MDMA were not completely resolved [9]. Gradient mode with run time over 20 min was also performed [10]. Other authors achieved the complete separation of the amphetamines in 10 min in isocratic mode

using different columns and mobile phases (composition, pH) than in the described method [8,14].

The ring-substituted amphetamines exhibited a good native fluorescence, with excitation and emission maxima at 285 and 320 nm, respectively. No spectral differences were found between the different compounds. The same wavelengths for excitation and emission were used as described in the literature [8,12].

The validation parameters of the method related to linearity, intra- and inter-assay precision, recovery, and LOD, for MDA, MDMA, MDEA and MBDB in oral fluid are shown in Table 1. Figs. 1 and 2 represent chromatograms of blank oral fluid spiked with 2 and 10 ng/mL of MDA, MDMA, MDEA and MBDB. As can be seen CV for inter-assay precision of MDMA, MDEA and MBDB at 250 ng/mL was over 15%, which was out of the preferred range. This may be explained by the absence of internal standard. The concentration 250 ng/mL is the upper limit of quantitation (ULOQ), the extreme higher value of the calibration range, so it is not surprising to see this kind of result in the absence of internal standard. Despite this problem, we

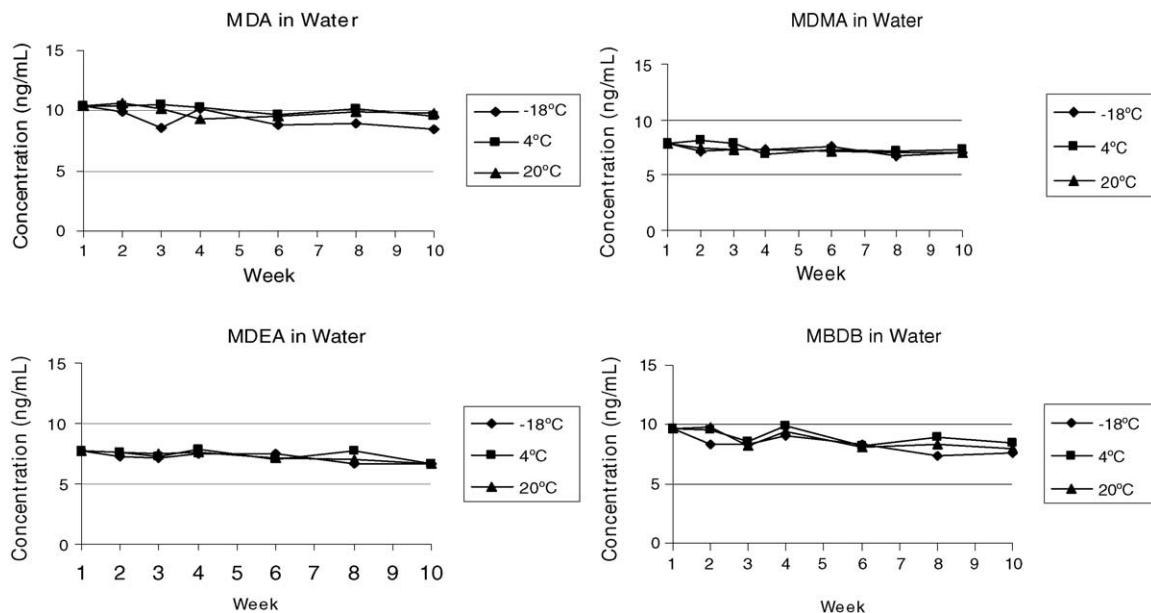


Fig. 3. Stability of MDA, MDMA, MDEA and MBDB in water (at 10 ng/mL).



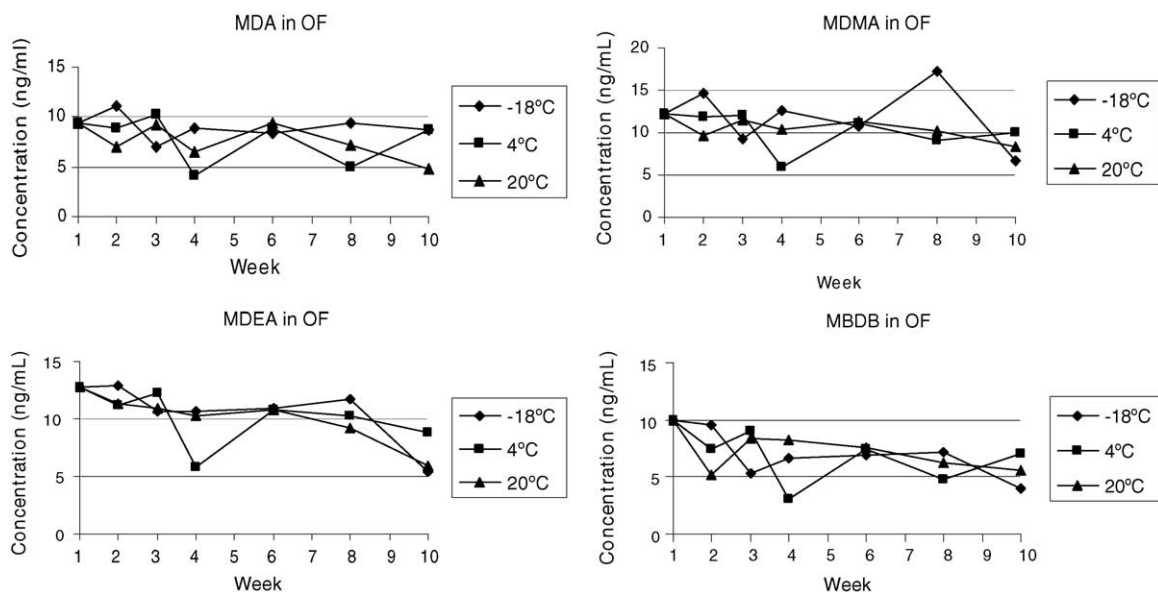


Fig. 4. Stability of MDA, MDMA, MDEA and MBDB in oral fluid (at 10 ng/mL).

decided not to use an internal standard because it was very difficult to find a compound with native fluorescence and with good chromatographic properties (retention time, resolution) under isocratic conditions.

The list of drugs evaluated as possible interferences are shown in Table 2. All these drugs were not detectable either because of the specificity of the fluorescence detector or because they were not retained in the column or not extracted. No interfering peaks with MDA, MDMA, MDEA and MBDB were identified for any screened compounds. These results are in accord with the literature [10,12].

We found that there was degradation of MDA, MDMA, MDEA and MBDB in water and in oral fluid. This loss of the amphetamine derivatives was time-dependent ( $P < 0.05$ ) but temperature independent ( $P > 0.05$ ) for all compounds in water and in OF, except for MDA in OF that was also temperature-dependent ( $P < 0.05$ ). The rates of drug lost after 10 weeks in water were 12% for MDA, 10% for MDMA, 13% for MDEA and 14% for MBDB. In OF the loss was 31% for MDA, 28% for MDMA, 38% for MDEA and 37% for MBDB. These losses are related to the initial drug amount. In the case of MDA in OF, 18% of the drug was lost when the sample was stored at 20 °C in comparison with the samples stored at 4 and -18 °C. This degradation is shown in Figs. 3 and 4. No new endogenous interferences were observed in blank oral fluid stored in the described conditions.

#### 4. Conclusion

In this work, a rapid, simple and specific method for the determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in oral

fluid using high performance liquid chromatography with fluorescence detection was developed and validated. This method, with few modifications, was used also successfully for the determination of amphetamine derivatives in other biological matrices (whole blood, plasma and urine).

The LOD (2 ng/mL) and LOQ (10 ng/mL) are lower than the recommended cut-offs in road side testing assessment (ROSITA) for these compounds (25 ng/mL). Regarding these limits, it would be expected good analytical results could also be obtained with lower OF volume (0.5 mL instead of 1 mL) but validation was not conducted.

#### Acknowledgment

This work was supported by a grant from the Dirección Xeral de Investigación Científica de la Xunta de Galicia (XUGA 1999). Special thanks to M. Carmen Guisan, Professor of Econometrics of the University of Santiago de Compostela, for her invaluable help and advice on statistical test and calculations.

#### References

- [1] Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, Informe No. 6 Observatorio Español sobre Drogas, November 2003, Ministerio del Interior, Spain. <http://www.mir.es/pnd>.
- [2] N. Samyn, G. De Boeck, A. Verstraete, The use of oral fluid and sweat wipes for the detection of drugs of abuse in drivers, *J. Forensic Sci.* 47 (2002) 1–8.
- [3] E.J. Cone, Saliva testing for drugs of abuse, *Ann. NY Sci.* 694 (1993) 91–127.

- [4] P. Kintz, Excretion of MBDB and BDB in urine, saliva, and sweat following single oral administration, *J. Anal. Toxicol.* 21 (1997) 570–575.
- [5] K. Mortier, K. Maudens, W. Lambert, K. Clauwaert, J. Van Bocxlaer, D. Deforce, C. Van Peteghem, A. De Leenheer, Simultaneous, quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 779 (2002) 321–330.
- [6] N. Samyn, G. De Boeck, M. Wood, C. Lamers, D. De Waard, K. Brookhuis, A. Verstraete, W. Riedel, Plasma, oral fluid and sweat wipe ecstasy concentrations in controlled and real life conditions, *Forensic Sci. Int.* 128 (2002) 90–97.
- [7] M. Wood, G. De Boeck, N. Samyn, M. Morris, D. Cooper, R. Maes, E. Bruijn, Development of a rapid and sensitive method for the quantitation of amphetamines in human plasma and oral fluid by LC–MS–MS, *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 78–87.
- [8] F. Sadeghipour, J.-L. Veuthey, Sensitive and selective determination of methylenedioxyated amphetamines by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection, *J. Chromatogr. A* 787 (1997) 137–143.
- [9] R. Herráez-Hernández, P. Camps-Falcó, J. Verdú-Andrés, Sensitive determination of methylenedioxyated amphetamines by liquid chromatography, *Analyst* 126 (2001) 581–586.
- [10] K. Clauwaert, J. Van Bocxlaer, E. De Letter, S. Van Calenbergh, W. Lambert, A. De Leenheer, Determination of the designer drugs 3,4-methylenedioxymethamphetamine, and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, and 3,4-methylenedioxyamphetamine with HPLC and fluorescence detection in whole blood, serum, vitreous humor, and urine, *Clin. Chem.* 46 (2000) 1968–1977.
- [11] J. da Costa, A. da Matta Chasin, Determination of MDMA, MDEA and MDA in urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* 811 (2004) 41–45.
- [12] F. Tagliaro, Z. De Battisti, A. Groppi, Y. Nakahara, D. Scarcella, R. Valentín, M. Marigo, High sensitivity simultaneous determination in hair of the major constituents of ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine) by high-performance liquid chromatography with direct fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* 723 (1999) 195–202.
- [13] A. Kaddoumi, R. Kikura-Hanajiri, K. Nakashima, High-performance liquid chromatography determination of 3,4-methylenedioxyamphetamine, methamphetamine and their metabolites in human hair using DIB-CI as a label, *Biomed. Chromatogr.* 18 (2004) 202–204.
- [14] R. Mancinelli, S. Gentilli, M. Guiducci, T. Macchia, Simple and reliable high-performance liquid chromatography fluorimetric procedure for the determination of amphetamine-derived designer drugs, *J. Chromatogr. B* 735 (1999) 243–253.
- [15] K. Clauwaert, J. Van Bocxlaer, A. De Leenheer, Stability study of the designer drugs “MDA, MDMA and MDEA” in water, serum, whole blood, and urine under various storage temperatures, *Forensic Sci. Int.* 124 (2001) 36–42.
- [16] R. Garret, K. Seyda, P. Marroum, High performance liquid chromatographic assays of the illicit designer drugs “Ecstasy”, a modified amphetamine, with applications to stability, partitioning and plasma protein binding, *Acta Pharm. Nord.* 3 (1991) 9–14.
- [17] US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Beltsville, MD, 2001.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Forensic Science International xxx (2006) xxx–xxx

Forensic  
Science  
International

[www.elsevier.com/locate/forsciint](http://www.elsevier.com/locate/forsciint)

## Fast LC–MS/MS method for the determination of amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB and PMA in urine

Marta Concheiro<sup>a</sup>, Susana Maria dos Santos Sadler Simões<sup>b</sup>, Óscar Quintela<sup>a</sup>, Ana de Castro<sup>a</sup>, Mário João Rodrigues Dias<sup>b</sup>, Angelines Cruz<sup>a</sup>, Manuel López-Rivadulla<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Forensic Toxicology Service, Institute of Legal Medicine, University of Santiago de Compostela, C/San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain

<sup>b</sup> Forensic Toxicology Service, National Institute of Legal Medicine, Lisbon Department, Rua Manuel Bento de Sousa, No. 3, 1169-201 Lisbon, Portugal

Received 31 May 2006; received in revised form 5 October 2006; accepted 8 October 2006

### Abstract

A fast method was designed for the simultaneous determination of amphetamine (A), methamphetamine (MA), PMA, MDA, MDMA, MDEA and MBDB in urine. The drugs were analysed by LC (ESI)–MS/MS, after a simple liquid–liquid extraction in the presence of the deuterated analogues. Reverse phase separation on an Atlantis dC18 Intelligent Speed column was achieved in less than 4 min under gradient conditions, and the total run time was 8 min. The method was fully validated, including linearity (1–1000 ng/mL for A, MDMA, MDEA and MBDB; 2–1000 ng/mL for MDA and PMA; 1–200 ng/mL for MA;  $r^2 > 0.99$  for all compounds), recovery (>80%), within-day and between-day precision and accuracy (CV and MRE < 12.7% for intermediate level and ULOQ, and <17.2% for LLOQ), limit of detection (0.2 ng/mL for MDMA, MDEA and MBDB; 0.5 ng/mL for A, MA and PMA; 1 ng/mL for MDA) and quantitation (1 ng/mL for A, MA, MDMA, MDEA and MBDB; 2 ng/mL for MDA and PMA) and relative ion intensities. No matrix effect was observed. The procedure proved to be sensitive, specific and rapid, and was applied to real forensic cases.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Amphetamine; MDMA; PMA; LC–MS/MS; Urine

### 1. Introduction

Amphetamine (A), a stimulant drug known for many decades, has been used as a nasal decongestant, an appetite suppressant or to combat fatigue. Nevertheless, its medical uses are now limited. Methamphetamine (MA), one of the most common amphetamines, is better known as “speed”, “crank”, “crystal”, “ice”, “go”, “meth” and “oxblood”. Designer amphetamines are chemically related to amphetamine, include methylenedioxymphetamine (MDA), methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methylenedioxyethylamphetamine (MDEA), *N*-methyl-benzodioxazolbutanamine (MBDB) and 4-methoxymphetamine (PMA). The street names for these drugs are “ecstasy”, “adam”, “eve” or “love pill” [1]. These designer amphetamines have also been classified as entactogens, drugs

that enhance communication, understanding and empathy [2]. All of them are considered stimulants with a high potential for abuse [1].

According to the annual report 2005 of the European monitoring center for drugs and drug addiction (EMCDDA), surveys conducted in European countries showed an increase in amphetamine and ecstasy consumption. In Spain and Portugal the lifetime prevalence use of amphetamine and ecstasy among young adults (15–34 years) was, respectively, 2.5% and 0.3% for amphetamine, and 8% and 1.6% for ecstasy [3].

The excretion of amphetamine and related stimulants mainly occurs in urine, where substantial amounts of unchanged drug are present, especially in acidic urine [1]. Methamphetamine is metabolized to the demethylated active metabolite amphetamine, and MDMA and MDEA to MDA [4].

In a laboratory of forensic toxicology, the typical analysis for these drugs involves an immunoassay screening method, and the confirmation and quantitation of the positive cases by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) or high

\* Corresponding author. Tel.: +34 981582327; fax: +34 981580336.

E-mail address: [apimlrv@usc.es](mailto:apimlrv@usc.es) (M. López-Rivadulla).

performance liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS). The amphetamine immunoassays cannot differentiate between the amphetamine analogues (e.g., MDMA, MDA, MDEA), and some false-positive results occur because of anorectics, other stimulants, other drugs [5] or even, in the case of urine from cadavers, the presence of degradation amines.

As a confirmatory method, GC–MS has been the most widely used [6–20], but in this technique a time consuming derivatization step is required. LC–MS is an interesting alternative, offering highest sample throughput and less sample manipulation. In the literature, several LC–MS methods for the determination of amphetamine and some of its analogues (MA, MDA, MDMA, MDEA or PMA) in urine were found [21–28]. For plasma different LC–MS methods for the determination of amphetamines and designer drugs have been published [24,27,29–32]. Despite these modern techniques, traditionally the most widely used technique for the determination of designer drugs by high performance liquid chromatography (HPLC), was HPLC with fluorescence detection [33–40].

We have developed and fully validated a simple and rapid LC–MS/MS method for the simultaneous determination of the seven most common amphetamines (amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB and PMA) in urine, after liquid–liquid extraction, with a chromatographic separation achieved in less than 4 min, and total run time of 8 min. This method was applied to all amphetamine positive cases in the National Institute of Legal Medicine of Portugal (Lisbon Department) between 2003 and 2005.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals

Amphetamine, methamphetamine, PMA, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, MDMA-*d*<sub>5</sub> and MBDB-*d*<sub>5</sub>, were obtained in the solid form from Lipomed (Arlésheim, Switzerland). Amphetamine-*d*<sub>6</sub> and MDA-*d*<sub>5</sub> in methanol at 1 g/L were obtained from Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Formic acid (98–100%), acetonitrile, water, methanol, hydrochloric acid 25%, diethylether and sodium hydroxide were from Merck (Darmstadt, Germany). Ammonium formate was from Fluka (Steinheim, Switzerland). All chemicals and solvents were at least of analytical grade.

Table 1  
LC (ESI)–MS/MS parameters, retention time and corresponding IS

Compound	SRM function (time window)	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion ( <i>m/z</i> )*	Cone (V)	Collision energy (eV)	Retention time (min)	IS
Amphetamine	Function 1: 3 transitions (0–2.6 min)	135.9	<b>90.6</b> , 118.9	15, 15	15, 10	2.27	A- <i>d</i> <sub>6</sub>
Amphetamine- <i>d</i> <sub>6</sub>		142.2	92.7	15	15	2.24	
Methamphetamine	Function 2: 10 transitions (2.4–3.3 min)	150.1	<b>90.6</b> , 119.1	20, 20	15, 10	2.62	MDMA- <i>d</i> <sub>5</sub>
PMA		166.1	<b>120.9</b> , 149	15, 15	20, 10	2.92	A- <i>d</i> <sub>6</sub>
MDA		180.1	104.7, <b>163.1</b>	15, 15	22, 10	2.77	MDA- <i>d</i> <sub>5</sub>
MDA- <i>d</i> <sub>5</sub>		185.2	168.1	15	10	2.75	
MDMA		194.2	104.5, <b>163</b>	20, 20	22, 12	2.97	MDMA- <i>d</i> <sub>5</sub>
MDMA- <i>d</i> <sub>5</sub>		199.2	165.1	20	12	2.97	
MDEA	Function 3: 5 transitions (3.1–8 min)	208.2	104.7, <b>162.9</b>	20, 20	25, 12	3.34	MBDB- <i>d</i> <sub>5</sub>
MBDB		208.2	<b>134.8</b> , 176.9	20, 20	20, 10	3.72	MBDB- <i>d</i> <sub>5</sub>
MBDB- <i>d</i> <sub>5</sub>		213.3	136	20	20	3.70	

\* Quantitation product ions are in bold characters.

A pH 3.0 ammonium formate buffer was prepared by mixing 1 mL of ammonium formate 1 M (dissolving ammonium formate 3153 g in 50 mL of water) and 0.5 mL of formic acid, and adding water until 500 mL. Drug-free urine was obtained from healthy volunteers.

A mixture methanol:hydrochloric acid (MeOH:HCl, 99:1 v/v), was prepared by mixing 9.9 mL of methanol and 0.1 mL of hydrochloric acid 25%.

### 2.2. Preparation of stock solutions and standards

Stock solutions of amphetamine, methamphetamine, PMA, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, MDMA-*d*<sub>5</sub> and MBDB-*d*<sub>5</sub> were prepared at 1 g/L in methanol and were kept at –20 °C in the dark for a maximum of 6 months. Each day, working solutions containing amphetamine, methamphetamine, PMA, MDA, MDMA, MDEA and MBDB at 0.01, 0.1, 1 and 10 mg/L were prepared by appropriate dilution with methanol. The working solutions of the internal standards (IS), mixture of amphetamine-*d*<sub>6</sub>, MDA-*d*<sub>5</sub>, MDMA-*d*<sub>5</sub> and MBDB-*d*<sub>5</sub> at 1 mg/L, were prepared by appropriate dilution with methanol.

### 2.3. Specimens

Urine samples were frozen at –20 °C until analysis.

### 2.4. Sample preparation

To 0.5 mL of urine were added 50 µL of a 1 mg/L IS solution, 0.5 mL of NaOH 1N and 3 mL of diethyl ether, in a 10 mL borosilicate tube. The tubes were rolled for 15 min, and centrifuged at 3500 rcf for 10 min. The organic phase was transferred to a 10 mL borosilicate tube. Before evaporating to dryness at 35 °C under a stream of nitrogen, 100 µL of MeOH:HCl (99:1 v/v), were added to the sample in order to prevent amphetamines evaporation. The dry extract was reconstituted in 100 µL of a pH 3.0 ammonium formate buffer, and 10 µL were injected into the chromatographic system.

### 2.5. Liquid chromatography/mass spectrometry

The HPLC system was a Waters Alliance 2795 separation module with a Waters Alliance series column heater (Waters, Milford, MA, USA). Chromatographic separation was performed at 22 °C with an Atlantis dC18, 3 µm 2.1 mm × 20 mm Intelligent Speed™ column. The mobile phase, delivered at a flow rate of 0.5 mL/min, was a gradient of acetonitrile and a pH 3.0 ammonium formate buffer, programmed as follows: 0% acetonitrile was increased to 10% in 2 min, isocratic for 1.5 min, increase of acetonitrile to 100% in 1 min, followed by a decrease to 0% in 0.5 min. Equilibration time was 3 min prior to the next injection. Total run time was 8 min.

The detection was performed using a Quattro Micro™ API ESCI triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, Waters, Milford, MA, USA) fitted with a Z-spray ion interface. The instrument was operated in electrospray in

positive ionization mode (ESI+). Best results were obtained with a capillary voltage of 3 kV, source block temperature of 130 °C, and desolvation gas (nitrogen) heated to 400 °C and delivered at 800 L/h. No cone gas was used. Collision cell pressure was  $3 \times 10^{-6}$  bar of argon. Data were recorded in the selected reaction monitoring (SRM) mode. A post-column infusion system was used to optimize ionization for all target compounds and internal standards. The mobile phase (pH 3.0 ammonium formate buffer/acetonitrile, 50/50) was delivered into the electrospray interface at a rate of 0.2 mL/min, while analyte at 10 mg/L was being infused post-column through a dead volume tee, by using a syringe pump at 10  $\mu$ L/min. The precursor ions, product ions, cone voltage and collision energy obtained are presented in Table 1. The MS method was divided in three SRM functions to obtain at least 18 acquisition points per peak.

Data acquisition, peak integration and calculation were interfaced to a computer workstation running MassLynx NT 4.0 and QuanLynx 4.0 software.

## 2.6. Validation

The analytical validation was performed according to the recommendations of Shah et al. [41], Peters and Maurer [42] and the Commission of the European Communities [43].

The specificity of the method was evaluated by analysing urine from 10 non-drug-consuming subjects (five living persons and five corpses).

Linearity was obtained with an average determination coefficient ( $r^2$ ) > 0.99 over a range from the lower limit of quantitation (LLOQ) up to the upper limit of quantitation (ULOQ). A weighting factor  $1/x$  was used.

Within-day precision and accuracy were determined at three concentration levels (the LLOQ, the ULOQ and an intermediate level) by preparing and analysing on the same day six replicates for each level. Between-day precision and accuracy were assessed by analysing on six different days a set of urine samples spiked at 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 and 1000 ng/mL. Precision, expressed as the coefficient of variation (CV) of the measured values, was expected to be less than 15% for all concentration levels, except for the LLOQ, for which 20% was acceptable. In the same way, accuracy was evaluated by using the mean relative error (MRE), measured as a percentage deviation from

the accepted reference value, which had to be less than 15% for all concentration levels, except for the LLOQ, for which 20% was acceptable.

The limit of detection (LOD) was defined as the lowest concentration of the drug resulting in a signal-to-noise ratio of 3:1, for the ion of quantitation and for the ion of confirmation. LLOQ was defined as the lowest concentration yielding within-day and between-day CV and MRE less than 20%.

Recoveries were determined in triplicate at an intermediate level (50 ng/mL) for each compound in urine. Three blank samples were fortified with the appropriate amount of each compound. These fortified samples and three blank samples were extracted as previously described. The dry extracts of the fortified samples were re-dissolved in 100  $\mu$ L of the reconstitution solvent containing the IS, and the blank samples were re-dissolved in 100  $\mu$ L of the reconstitution solvent containing the nominal amounts of the compounds and the IS. The latter were used as neat standards, so that any ion suppression effect caused by that matrix would not be included in the recovery calculation.

The ion suppression effect on the ESI response was evaluated according to the following procedure [44]: nine drug-free urine samples from different sources were extracted as described previously. The extracts were then fortified with all drugs at a concentration of 50 ng/mL. Three reference solutions in pH 3.0 ammonium formate buffer were also fortified with all drugs to the same nominal concentration. The reconstituted extracts and the reference solutions were injected into the LC–MS/MS system. Peak areas obtained from the extracts were compared with the corresponding peak areas produced by the reference solutions. The ion suppression percentage was calculated as follows: (mean peak area “reconstituted extract in urine” – mean peak area “reference solution”)  $\times$  100/mean peak area “reference solution”.

Relative intensities of the detected ions were expressed as a percentage of the intensity of the quantitation trace (relative ion intensities = intensity of secondary trace  $\times$  100/intensity of quantitation trace). The maximum permitted tolerance for relative ion intensities is:  $\pm 20\%$  (relative ion intensities > 50%),  $\pm 25\%$  (relative ion intensities > 20–50%),  $\pm 30\%$  (relative ion intensities > 10–20%),  $\pm 50\%$  (relative ion intensities  $\leq 10\%$ ).

Urine samples above the upper limit of quantitation (ULOQ) were diluted with drug-free urine.

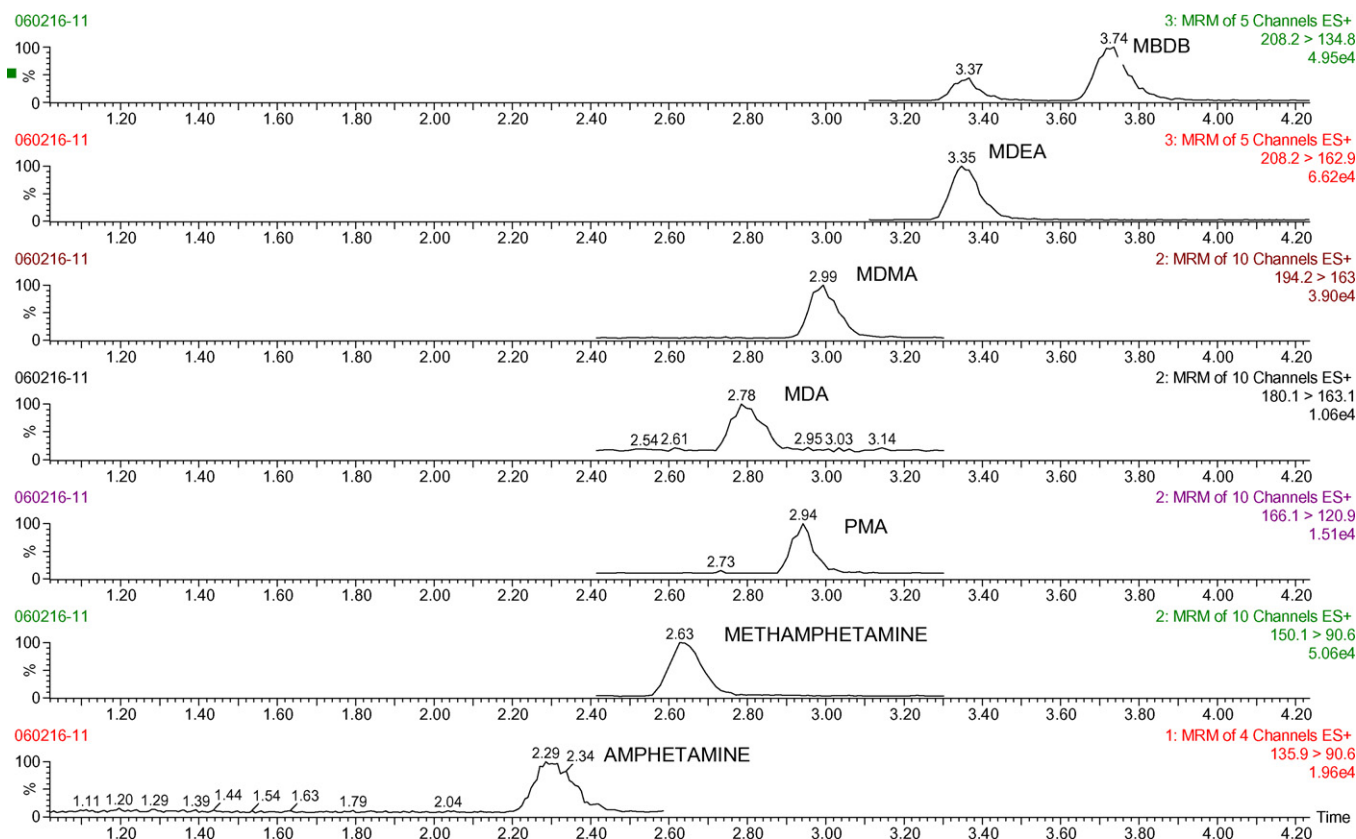


Fig. 1. LC–MS/MS quantitative transition chromatograms of a urine spiked at 2 ng/mL for all studied compounds.

Table 2  
Validation results for the seven amphetamines

Compound	Concentration (ng/mL)	Recovery (%)	Within-day precision and accuracy (n = 6)			Between-day precision and accuracy (n = 6)			Relative ion intensities (n = 6)	
			Mean value	CV	MRE	Mean value	CV	MRE	Mean value	CV
Amphetamine <sup>a</sup>	1		0.9	14.3	-5.8	0.8	3.8	-16.5	43.5	14.4
	2				2	10.1	0.3	41.7	16.3	
	5				4.9	3.4	-2.9	40	17.7	
	10				10.5	5.3	5.2	43.5	8	
	20				21.8	3.6	9	43.5	8.8	
	50	86.9	49.2	2.3	-1.7	49.8	4	-0.5	43.5	4.7
	100				102.9	2.6	2.9	45.5	4.5	
	200				211.7	4.6	5.8	45.5	7.3	
	500				481.8	3.4	-3.7	45.5	4.8	
1000		992.7	2	-0.7	1002	2	0.2	47.6	3.6	
Methamphetamine <sup>b</sup>	1		0.9	11.1	-8	0.9	7.7	-13.2	19.6	34
	2				2	7.9	1.3	19.6	31.4	
	5				4.8	7.3	-3.3	20.4	33.5	
	10				10.3	6.8	3	21.3	23.9	
	20				22.6	4.6	12.7	22.7	25.6	
	50	92.1	47.9	2.3	-4.2	50.3	3	0.6	23.3	18.6
	100				100	2	0	26.3	17	
	200		183.3	6.1	-8.4	197.1	1.1	-1.5	28.6	12.9
	MDA <sup>c</sup>	2		1.8	9.2	-9.3	1.8	7.3	-9.8	38.5
5					4.6	4.9	-8.3	34.5	4	
10					10.2	4.1	2.2	33.3	5.1	
20					21.8	2.4	9.2	33.3	4.9	
50		85.9	48.9	3.2	-2.2	49.1	5.7	-1.8	32.3	3.4
100					105.4	3.4	5.4	32.3	1.3	
200					212.5	4.8	6.2	33.3	4	
500					487.9	3.1	-2.4	32.3	2	
1000			1001.8	1.5	0.2	993.7	2.4	-0.6	32.3	1.6
PMA <sup>d</sup>	2		1.9	5.2	-6.7	1.8	9.5	-10	200	32.3
	5				4.6	5.2	-8.3	166.6	18.3	
	10				10.4	6.5	4.1	142.9	12.2	
	20				21.2	5.4	6	142.9	14.4	
	50	81.1	48.5	4.8	-2.9	50.6	4.8	1.1	142.9	0
	100				106.4	2.6	6.4	142.9	5.7	
	200				212.2	4.9	6.1	142.9	9	
	500				467.1	4.3	-6.6	142.9	0	
	1000		954.3	3.51	-4.6	1012.8	2.5	1.3	142.9	5.7
MDMA <sup>e</sup>	1		0.8	8.1	-16.8	1	11.9	-3.3	29.4	12.6
	2				2	7.2	-0.1	28.6	10.5	
	5				4.7	4.5	-5.2	28.6	9.1	
	10				9.9	3.4	-0.6	29.4	4.2	
	20				21.4	4.1	6.8	29.4	7.6	
	50	88.8	45.7	2.6	-8.6	48.6	4.3	-2.8	28.5	4
	100				102.5	4.9	2.5	29.4	2.6	
	200				212.9	2.9	6.4	30.3	3.5	
	500				479.9	2.5	-4	29.4	2.2	
1000		991.6	1.8	-0.8	1005.2	2.1	0.5	29.4	1.2	
MDEA <sup>f</sup>	1		0.9	5	-5.8	0.9	7.4	-13.3	41.7	13.2
	2				2.1	10.5	2.8	40	13.5	
	5				4.8	6.6	-3.7	40	7.3	
	10				10.6	3.4	6.2	38.5	8.6	
	20				21.4	4	6.9	38.5	4.9	
	50	88.3	48.1	3.2	-3.8	47.7	7.4	-4.6	38.5	4.5
	100				103.2	5.6	3.2	37	3.1	
	200				213.2	5.2	6.6	37	3	
	500				475	5.1	-5	35.7	3.8	
1000		1004.8	7.5	0.5	1009.2	3.3	0.9	35.7	4.2	
MBDB <sup>g</sup>	1		0.8	4.5	-17.2	0.9	9.2	-6.3	50	2
	2				2.1	4.2	6.8	50	2.5	

Table 2 (Continued)

Compound	Concentration (ng/mL)	Recovery (%)	Within-day precision and accuracy (n = 6)			Between-day precision and accuracy (n = 6)			Relative ion intensities (n = 6)	
			Mean value	CV	MRE	Mean value	CV	MRE	Mean value	CV
	5					4.7	3.8	-6.7	50	2.1
	10					10.1	2.7	0.8	52.6	2.1
	20					21.4	3.5	6.7	50	2.8
	50	88.5	46.6	2.1	-6.9	47.9	4.6	-4.2	50	2.1
	100					101.2	3.6	1.2	52.6	2.7
	200					212.9	3.2	6.5	52.6	2.1
	500					464.9	4.6	-7	52.6	2.2
	1000		1004.3	2.9	0.4	1021.7	1.9	2.2	52.6	4

<sup>a</sup> Slope =  $1.0057 \pm 0.0444$ ; intercept =  $0.4344 \pm 0.2918$ ;  $r^2 = 0.9984 \pm 0.0009$ .

<sup>b</sup> Slope =  $1.4912 \pm 0.1179$ ; intercept =  $0.4383 \pm 0.321$ ;  $r^2 = 0.9983 \pm 0.001$ .

<sup>c</sup> Slope =  $0.7493 \pm 0.0307$ ; intercept =  $0.3690 \pm 0.35$ ;  $r^2 = 0.9982 \pm 0.0008$ .

<sup>d</sup> Slope =  $0.3132 \pm 0.0335$ ; intercept =  $0.1821 \pm 0.1463$ ;  $r^2 = 0.9969 \pm 0.0018$ .

<sup>e</sup> Slope =  $0.9496 \pm 0.0439$ ; intercept =  $0.0504 \pm 0.2129$ ;  $r^2 = 0.9984 \pm 0.0007$ .

<sup>f</sup> Slope =  $1.3052 \pm 0.0415$ ; intercept =  $0.2675 \pm 0.2621$ ;  $r^2 = 0.9970 \pm 0.0013$ .

<sup>g</sup> Slope =  $1.2179 \pm 0.0286$ ; intercept =  $0.1254 \pm 0.1312$ ;  $r^2 = 0.997 \pm 0.0021$ .

Carry-over effect was assayed by analysing blank samples after a high positive sample (60,000 ng/mL of each compound) and checking that no compounds were detected in the blank samples.

The method was applied to nine real forensic cases which tested positive for amphetamines in urine by immunoassay (Syva<sup>®</sup> RapidTest d.a.u.<sup>®</sup> AMP and mAMP, Dade Behring, Cupertino, CA, USA), which has a 1000 ng/mL

cut-off for amphetamine and for methamphetamine, and consequently confirmed in blood by GC-MS after a solid phase extraction, following the laboratory routine protocol. The mentioned method allowed the determination of amphetamines and congeners, cocaine, opiates and cannabis in blood samples, with LOD between 2.5 and 8 ng/mL, and LLOQ between 9 and 24 ng/mL.

Table 3  
Results of ion suppression studies

Compound	Reference solution (n = 3)		Reconstitutes urine extract (n = 9)		Ion suppression (%)
	Mean peak area	CV	Mean peak area	CV	
Amphetamine	82845.3	4.5	71,341	5.6	-13.9
Methamphetamine	163,348.3	2.1	145707.9	6.6	-10.8
MDA	26,589	6.1	29191.7	10.3	9.8
PMA	19,490	3.8	21577.2	8.4	10.7
MDMA	83,572	4.2	90077.4	8	7.8
MDEA	178239.7	2.6	170137.9	6.7	-4.6
MBDB	163972.7	3.4	148943.2	6.3	-9.2

Table 4  
Analytical results of the positive cases, indicating sex, age, quantitative results of the corresponding amphetamine in urine and additional analytical results and information of the case

Case	Sex/age	Amphetamines in urine samples (ng/mL)	Analytical results in blood samples (ng/mL)	Additional information
1/2003	Male, 25 years	MDA = 3050, MDMA = 59,990, MDEA = 10,210	MDA = 66, MDMA = 122, MDEA = 82, ethanol = 0.69 g/L	Alive traffic accident (pedestrian)
2/2003	Male, 20 years	MA = 19.6, MDA = 255.3, MDMA = 24,860	MDA = 60, MDMA = 60, benzoylecgonine = 100	Dead by precipitation
3/2003	Male, 29 years	A = 258, MA = 7, MDA = 878, MDMA = 9223	No sample available	Alive traffic accident (driver)
4/2003	Male, 27 years	MDA = 417, MDMA = 4783	MDMA = 87	Alive traffic accident (driver)
5/2003	Male, 29 years	A = 2.1, MDA = 1490, MDMA = 33,480, MDEA = 60.5	MDA = 22, MDMA = 673	Alive traffic accident (driver)
1/2004	Male, 26 years	MDA = 3030, MDMA = 151,480	MDA = 12, MDMA = 549, benzoylecgonine = 64	Alive traffic accident (driver)
2/2004	Female, 17 years	MDA = 2330, MDMA = 60,910	No sample available	Alive sexual assault
1/2005	Female, 39 years	MA < LOQ, MDA = 236.4, MDMA = 455.9	MDA = 9, MDMA = 14, ethanol = 1.69 g/L	Alive traffic accident (driver)
2/2005	Male, 28 years	A = 31.9, MA = 40.5, MDA = 3680, MDMA = 51,960, MDEA = 246.4	MDA = 22, MDMA = 277	Alive traffic accident (driver)

### 3. Results

The ion chromatograms of the seven amphetamines are shown in Fig. 1. The retention times and the selected precursor and product ions are reported in Table 1. Likewise, their respective optimized cone voltages and collision energies are shown in the same table.

Under the chromatographic conditions used, there was no interference with any extractable endogenous compound of urine samples from either living persons or cadavers.

The linearity of the compound-to-IS peak ratio versus the theoretical concentration was verified in urine by using a  $1/x$  weighted linear regression. The determination coefficients were above 0.99 and the curvature was tested on a set of six calibration curves. The within-day precision and accuracy, as well as the between-day precision and accuracy were satisfactory for all tested concentrations. Recovery at 50 ng/mL was >80% for all compounds. These results and the relative ion intensities obtained are summarized in Table 2.

The limit of detection (LOD) was 0.2 ng/mL for MDMA, MDEA and MBDB, 0.5 ng/mL for amphetamine, methamphetamine and PMA, and 1 ng/mL for MDA. The LLOQ and ULOQ, which correspond to the lowest and the highest concentration level of the calibration range were 1 and 1000 ng/mL for amphetamine, MDMA, MDEA and MBDB, 2 and 1000 ng/mL for MDA and PMA, and 1 and 200 ng/mL for methamphetamine.

No relevant ion suppression effect was observed, because it was <15% in all cases (Table 3).

Needle wash between injections was carried out with methanol and carry-over effect was not detected.

This method was applied to all amphetamine positive cases in the National Institute of Legal Medicine of Portugal (Lisbon Department) between 2003 and 2005. The results obtained are given in Table 4.

Fig. 2 shows a chromatogram of a real case which tested positive to MDA, MDMA and MDEA.

### 4. Discussion

The ionization technique used was ESI in positive mode. Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) assays were carried out, but the signal obtained was 10 times lower

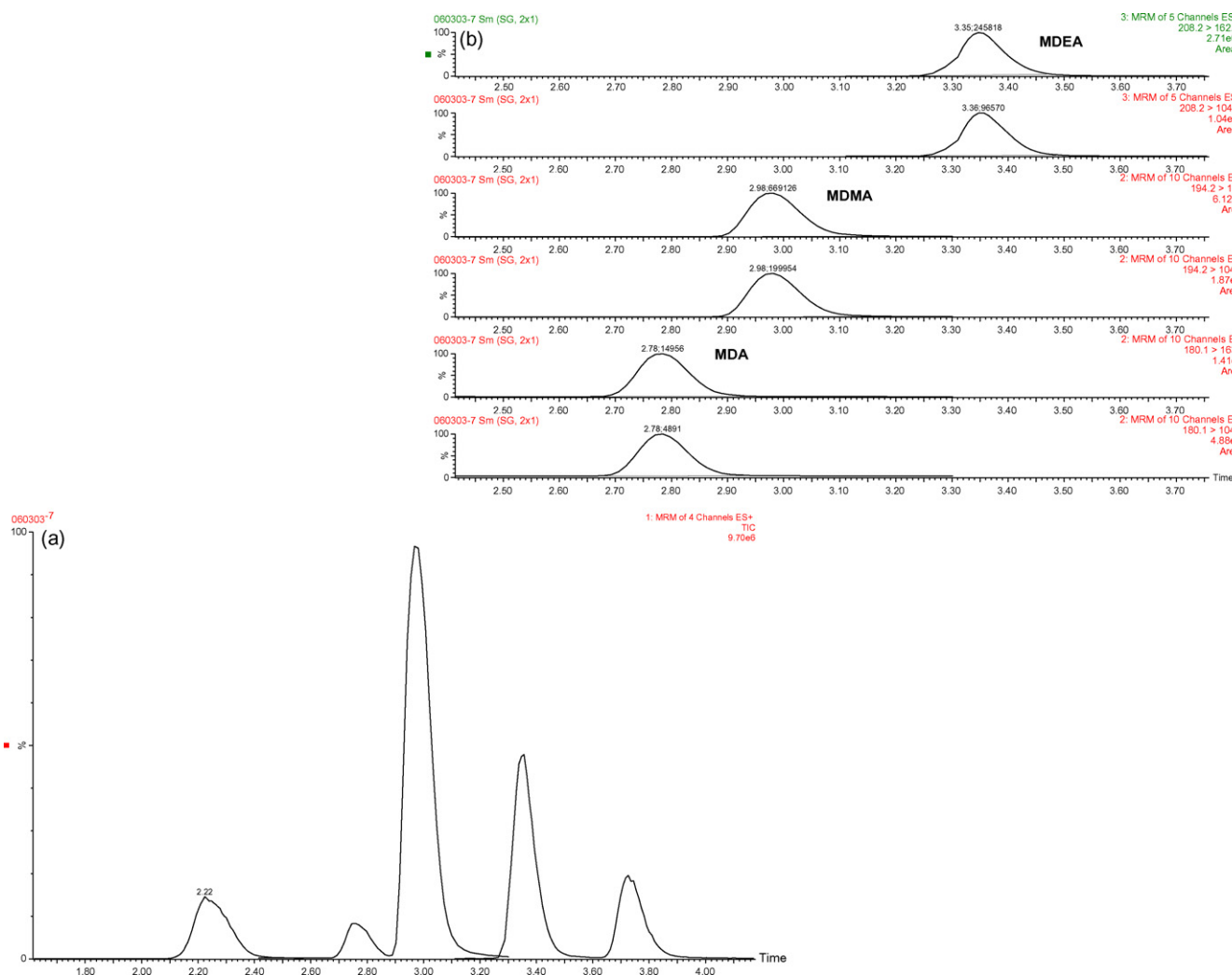


Fig. 2. LC-MS/MS chromatogram of a real case (1/2003). The figure shows the total ion current (a), and the two selected transitions for MDA, MDMA and MDEA (b). The urine was diluted 1:100.



compared to ESI. The ESCI<sup>TM</sup> Multi-Mode Ionization Source used enabled switching between ESI and APCI, supplying voltage to the ESI capillary or current to the APCI corona needle without changing the probe. The literature [24–26] reports that APCI has been used successfully, but in some cases a derivatization step was used [24]. Other ionization techniques applied were sonic spray ionization [27] and surface-activated chemical ionization [28]. The LC-ESI-MS methods published [21–23] used a simple quadrupole [21,22] as a mass spectrometer, or an ion trap [23]. In this method a triple quadrupole was used.

In the development of this method, a simple LLE was chosen since it provides relatively clean extracts, especially if a pH adjustment is applied [45,46]. LLE has been used in the case of amphetamines [24,26,27], but these methods used a different extraction solvent [27], or larger amounts of extraction solvent and of urine (10 mL of diethyl ether and 1 mL of urine [24], 5 mL of diethyl ether and 2 mL of urine [26]).

This method achieves a short chromatography for these molecules. Up to date, in the methods reviewed, the chromatography separation was achieved in more than 10 min, and the methods with less time of separation (<7 min) only determine MDMA and MDA [25], or A, MA, MDA, MDMA and MDEA [21]. MBDB detection has not been done in any reviewed urine method [21–28]. The gradient used had no acetonitrile in the beginning to ensure the retention of the amphetamine in such short column (20 mm). The other amphetamine congeners were less affected by the initial gradient conditions. In order to rinse the column, 100% of acetonitrile at the end of the gradient was achieved.

Real amphetamine positive urines were analysed using this method and MDMA was the most common designer amphetamine found. No positive cases for MBDB and PMA were found. MDA is considered as a metabolite of MDMA if its concentration is a 10–15% of MDMA concentration [47]. MDA is also a metabolite of MDEA.

## 5. Conclusion

A fast method was developed and full validated for the determination of amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB and PMA in urine, by LC (ESI)-MS/MS after a simple liquid-liquid extraction. The chromatographic separation was achieved in less than 4 min, with a total run time of 8 min. The method was successfully applied to real forensic cases.

## Acknowledgements

This work was done thanks to the financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (F.P.U. Grant numbers AP-2002-2935 and AP-2002-2878).

## References

- [1] O.H. Drummer, M. Odell, *The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse*, Arnold, London, 2001.
- [2] D.E. Nichols, Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB, and the classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogens, *J. Psychoactive Drugs* 18 (1986) 305–313.
- [3] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Annual Report 2005. <http://www.emcdda.eu.int/>.
- [4] R. de la Torre, M. Farré, M. Navarro, R. Pacifici, P. Zuccaro, S. Pichini, Clinical pharmacokinetics of amphetamine and related substances: monitoring in conventional and non-conventional matrices, *Clin. Pharmacokinet.* 43 (2004) 157–185.
- [5] A.G. Verstraete, F.V. Heyden, Comparison of the sensitivity and specificity of six immunoassays for the detection of amphetamines in urine, *J. Anal. Toxicol.* 29 (2005) 359–364.
- [6] B.K. Gan, D. Baugh, R.H. Liu, A.S. Walia, Simultaneous analysis of amphetamine, methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in urine samples by solid-phase extraction, derivatization, and gas chromatography/mass spectrometry, *J. Forensic Sci.* 36 (1991) 1331–1341.
- [7] E.M. Thurman, M.J. Pedersen, R.L. Stout, T. Martin, Distinguishing sympathomimetic amines from amphetamine and methamphetamine in urine by gas chromatography/mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 16 (1992) 19–27.
- [8] P. Dallakian, H. Budzikiewicz, H. Brzezinka, Detection and quantitation of amphetamine and methamphetamine: electron impact and chemical ionization with ammonia-comparative investigation on Shimadzu QP 5000 GC-MS system, *J. Anal. Toxicol.* 20 (1996) 255–261.
- [9] H.K. Ensslin, K.A. Kovar, H.H. Maurer, Toxicological detection of the designer drug 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDE, 'Eve') and its metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay, *J. Chromatogr. B* 683 (1996) 189–197.
- [10] R. Kronstrand, Identification of *N*-methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamine (MBDB) in urine from drug users, *J. Anal. Toxicol.* 20 (1996) 512–516.
- [11] F. Centini, A. Masti, I. Barni Comparini, Quantitative and qualitative analysis of MDMA, MDEA, methamphetamine and amphetamine in urine by headspace/solid phase microextraction (SPME) and GC/MS, *Forensic Sci. Int.* 83 (1996) 161–166.
- [12] P. Kintz, Excretion of MBDB and BDB in urine, saliva, and sweat following single oral administration, *J. Anal. Toxicol.* 21 (1997) 570–575.
- [13] D. Hensley, J.T. Cody, Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxyamphetamine (MDMA), and methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) enantiomers by GC-MS, *J. Anal. Toxicol.* 23 (1999) 518–523.
- [14] H.G. Uglund, M. Krogh, K.E. Rasmussen, Automated determination of 'Ecstasy' and amphetamines in urine by SPME and capillary gas chromatography after propylchloroformate derivatization, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 463–475.
- [15] C. Jurado, M.P. Giménez, T. Soriano, M. Menéndez, M. Repetto, Rapid analysis of amphetamine, methamphetamine, MDA and MDMA in urine using solid-phase microextraction, direct on-fiber derivatization, and analysis by GC-MS, *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 11–16.
- [16] N. Pizarro, J. Ortuño, M. Farré, C. Hernández-López, M. Pujadas, A. Llebaría, J. Juglar, P.N. Roset, M. Mas, J. Segura, J. Camí, R. de la Torre, Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis, *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 157–165.
- [17] M. Pellegrini, F. Rosati, R. Pacifici, R. Zuccaro, F.S. Romolo, A. López, Rapid screening method for determination of Ecstasy and amphetamines in urine samples using gas chromatography-chemical ionisation mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 769 (2002) 243–251.
- [18] P.R. Stout, C.K. Horn, K.L. Klette, Rapid simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine in urine by solid-phase extraction and GC-MS: a method optimized for high-volume laboratories, *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 253–261.
- [19] Z. Huang, S. Zhang, Confirmation of amphetamine, methamphetamine, MDA and MDMA in urine samples using disk solid-phase extraction and

- gas chromatography–mass spectrometry after immunoassay screening, *J. Chromatogr. B* 792 (2003) 241–247.
- [20] K.L. Klette, M.H. Jamerson, C.L. Morris-Kukoski, A.R. Kettle, J.J. Snyder, Rapid simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, *J. Anal. Toxicol.* 29 (2005) 669–674.
- [21] H. Kataoka, H.L. Lor, J. Pawliszyn, Simple, Rapid determination of amphetamine, methamphetamine, and their methylenedioxy derivatives in urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 257–265.
- [22] K.M. Jenkins, M.S. Young, C.R. Mallet, A.A. Elian, Mixed-mode solid phase extraction procedures for the determination of MDMA and metabolites in urine using LC–MS, LC–UV, or GC–NPD, *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 50–58.
- [23] T.Y. Wu, M.R. Fuh, Determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in urine by online solid-phase extraction and ion-pairing liquid chromatography with detection by electrospray tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 775–780.
- [24] M.J. Bogusz, M. Kala, R.D. Maier, Determination of phenylisothiocyanate derivatives of amphetamine and its analogues in biological fluids by HPLC–APCI–MS or DAD, *J. Anal. Toxicol.* 21 (1997) 59–69.
- [25] H.K. Nordgren, O. Beck, Direct screening in urine for MDMA and MDA by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 1–5.
- [26] K. Deventer, P. Van Eenoo, F.T. Delbeke, Screening for amphetamine and amphetamine-type drugs in doping analysis by liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 877–882.
- [27] K.A. Mortier, R. Dams, W.E. Lambert, E.A. De Letter, S. Van Calenbergh, A.P. De Leenheer, Determination of paramethoxyamphetamine and other amphetamine-related designer drugs by liquid chromatography/sonic spray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 865–870.
- [28] S. Cristoni, L.R. Bernardi, P. Gerthoux, E. Gonella, P. Mocrelli, Surface-activated chemical ionization ion trap mass spectrometry in the analysis of amphetamines in diluted urine samples, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 1847–1855.
- [29] M.J. Bogusz, K.D. Krüger, R.D. Maier, Analysis of underivatized amphetamines and related phenethylamines with high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 77–84.
- [30] M. Wood, G. De Boeck, N. Samyn, M. Morris, D.P. Cooper, R.A. Maes, E.A. De Bruijn, Development of a rapid and sensitive method for the quantitation of amphetamines in human plasma and oral fluid by LC–MS/MS, *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 78–87.
- [31] H.P. Hendrickson, A. Milesi-Hallé, E.M. Laurenzana, S.M. Owens, Development of a liquid chromatography–mass spectrometric method for the determination of methamphetamine and amphetamine using small volumes of rat serum, *J. Chromatogr. B* 806 (2004) 81–87.
- [32] M. Concheiro, A. de Castro, O. Quintela, M. López-Rivadulla, A. Cruz, Determination of drugs of abuse and their metabolites in human plasma by liquid chromatography–mass spectrometry: an application to 156 road fatalities, *J. Chromatogr. B* 832 (2006) 81–89.
- [33] F. Sadeghipour, J.-L. Veuthey, Sensitive and selective determination of methylenedioxyethylated amphetamines by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection, *J. Chromatogr. A* 787 (1997) 137–143.
- [34] R. Herráez-Hernández, P. Campís-Falcó, J. Verdú-Andrés, Sensitive determination of methylenedioxyethylated amphetamines by liquid chromatography, *Analyst* 126 (2001) 581–586.
- [35] K. Clauwaert, J. Van Bocxlaer, E. De Letter, S. Van Calenbergh, W. Lambert, A. De Leenheer, Determination of the designer drugs 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, and 3,4-methylenedioxyamphetamine with HPLC and fluorescence detection in whole blood, serum, vitreous humor, and urine, *Clin. Chem.* 46 (2000) 1968–1977.
- [36] J. da Costa, A. da Matta Chasin, Determination of MDMA, MDEA and MDA in urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* 811 (2004) 41–45.
- [37] F. Tagliaro, Z. De Battisti, A. Groppi, Y. Nakahara, D. Scarcella, R. Valentín, M. Marigo, High sensitivity simultaneous determination in hair of the major constituents of ecstasy (3,4-methylenedioxyethylamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine) by high-performance liquid chromatography with direct fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* 723 (1999) 195–202.
- [38] A. Kaddoumi, R. Kikura-Hanajiri, K. Nakashima, High-performance liquid chromatography determination of 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, methamphetamine and their metabolites in human hair using DIB–CI as a label, *Biomed. Chromatogr.* 18 (2004) 202–204.
- [39] R. Mancinelli, S. Gentili, M. Guiducci, T. Macchia, Simple and reliable high-performance liquid chromatography fluorimetric procedure for the determination of amphetamine-derived designer drugs, *J. Chromatogr. B* 735 (1999) 243–253.
- [40] M. Concheiro, A. de Castro, O. Quintela, M. López-Rivadulla, A. Cruz, Determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in oral fluid using high performance liquid chromatography with native fluorescence detection, *Forensic Sci. Int.* 150 (2005) 221–226.
- [41] V.P. Shah, K.K. Mida, J.W.A. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, J.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonnelli, C.T. Viswanattan, A. Jacobi, Bioanalytical method validation—A revisit with a decade of progress, *Pharm. Res.* 17 (2002) 1551–1557.
- [42] F.T. Peters, H.H. Maurer, Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology—a review, *Accred. Qual. Assur.* 7 (2002) 441–449.
- [43] European Union Decision 2002/657/EC 17.8.2002, *Off. J. Eur. Commun.* 221 (2002) 8–36.
- [44] T. Annesley, Ion suppression in mass spectrometry, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1041–1044.
- [45] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations, *Anal. Chem.* 70 (1998) 882–889.
- [46] R. Bonfiglio, R.C. King, T.V. Olah, K. Merkle, The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1175–1185.
- [47] G.W. Kunsman, B. Levine, J.J. Kuhlman, R.L. Jones, R.O. Hughes, C.I. Fujiyama, M.L. Smith, MDA–MDMA concentrations in urine specimens, *J. Anal. Toxicol.* 20 (1996) 517–521.

Short communication

# Development and validation of a method for the quantitation of $\Delta^9$ tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography electrospray–mass-spectrometry

M. Concheiro, A. de Castro, O. Quintela, A. Cruz, M. López-Rivadulla\*

*Forensic Toxicology Service, Institute of Legal Medicine, Faculty of Medicine, Universidad de Santiago de Compostela, S. Francisco s/n, 15786 Santiago De Compostela, Spain*

Received 15 June 2004; accepted 9 August 2004

## Abstract

Analysis of  $\Delta^9$ tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ THC) and its metabolites in biological samples is of great relevance for forensic purposes. In the case of oral fluid (OF), the analysis should determine  $\Delta^9$ THC, whereas in urine, it detects the inactive metabolite tetrahydrocannabinol carboxylic acid (THC-COOH). Most laboratories analyze  $\Delta^9$ THC in such samples using GC–MS methods, but these procedures are time-consuming and involve unavoidable previous extraction and derivatization. No data is yet available on the application of liquid chromatography–mass-spectrometry to detect  $\Delta^9$ THC in oral fluid. We report a validation method in which the  $\Delta^9$ THC is isolated from oral fluid by a simple liquid–liquid extraction with hexane and subsequently analyzed by liquid chromatography–mass-spectrometry.

The method here reported for the determination of  $\Delta^9$ THC in oral fluid only requires 200  $\mu$ l of sample and achieves limits of detection of 2 ng/ml, and has been used to analyze oral fluid samples collected from current drug users.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:**  $\Delta^9$ Tetrahydrocannabinol; Oral fluid; LC–MS

## 1. Introduction

The oral fluid (OF) contains both saliva and other fluids and substances which are present in the oral cavity. Substances tend to be detectable in saliva for shorter periods than in urine, typically for the 12–24 h after consumption [1]. A disadvantage of studying OF is that people are sometimes unable to produce sufficient amounts of fluid for analysis. The greatest advantage of analysing OF is that samples can be collected in ways that both respect patients dignity and also assure staff that the sample comes from the patient. Staff can directly observe patients when they produce samples, usually by placing a collection tube or

device in their mouth. The possibility of contamination or substitution is minimal. The levels in saliva of substances to be detected tend to be rather lower than those of the drugs metabolites in urine, thus analysis of OF is a more sensitive process.

The usefulness of oral fluid testing for  $\Delta^9$ tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ THC) is related to its use as a diagnostic indicator of recent inhalation of marijuana smoke.  $\Delta^9$ THC was identified as the major component in oral fluid with a detection time ranging from 2 to 10 h [2]. However, the detection of  $\Delta^9$ THC in oral fluid is linked to the contamination of the oral cavity during smoking [3–5]. Contrary to what Schramm et al. [6] stated, neither carboxytetrahydrocannabinol nor 11-hydroxytetrahydrocannabinol were detected in oral fluid, and only in some cases were cannabinol and cannabidiol detected with  $\Delta^9$ THC [7]. Huestis and Cone [8], reported a significant correlation between mean values of oral fluid

\* Corresponding author. Tel.: +34 981 582327/563100x12205; fax: +34 981 580336.

E-mail address: [apimlriv@usc.es](mailto:apimlriv@usc.es) (M. López-Rivadulla).

Table 1  
Conditions of measurements of  $\Delta^9$ THC

Compound	Retention time	<i>m/z</i>	Voltage (V)
$\Delta^9$ THC	3.1	315.4	20
		193.1	50
$\Delta^9$ THC-d3	3.1	318.4	20

$\Delta^9$ THC concentrations and performance measure of drug effect, although with high individual variability. According to Idowu and Caddy [9], the oral fluid/plasma concentration ratio of  $\Delta^9$ THC varies over a wide range but, until now, including recent reviews [10–13], there is not enough data to clarify this relationship. Despite this, oral fluid is an interesting biological sample for forensic interpretation purposes. Its main advantages are: it uses a non-invasive specimen, is easy and rapid to take, and requires no special equipment or facilities; also, the supervision of the collection of this sample is more acceptable for the donor than urine or blood collection.

Most laboratories analyze  $\Delta^9$ THC in blood and oral fluid by time-consuming GC–MS methods [14–18]. Hughes et al. [19] were pioneers in setting up a LC–MS–MS method for the analysis of  $\Delta^9$ THC in blood which involved comparing several ionization techniques, columns, SPE procedures and mobile phases. The main problem encountered was a low recovery rate (30%). Maralikova and Weinmann [20] reported a sensitive LC–MS–MS method for the simultaneous analysis of three forensic most relevant cannabinoids,  $\Delta^9$ THC, 11-hydroxy- $\Delta^9$ THC and 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ THC, in plasma. Recently, Valiveti and Stinchcomb [21] applied LC–MS to quantify  $\Delta^9$ THC and metabolites in plasma and obtained high levels of recovery when applying the method to pharmacokinetic studies in rats. However, no data are yet available on the application of LC–MS to detect  $\Delta^9$ THC in oral fluid.

The method here reported for the determination of  $\Delta^9$ THC in oral fluid only requires 200  $\mu$ l of sample, and achieves limits of detection of 2 ng/ml, using a simple liquid–liquid extraction procedure with hexane.

Table 2  
Repeatability and reproducibility results

Compound	Concentration (ng/ml)	Recovery (%)	Repeatability ( <i>n</i> = 6)			Reproducibility ( <i>n</i> = 6)		
			Concentration mean (ng/ml)	C.V. (%)	Bias (%)	Concentration mean (ng/ml)	C.V. (%)	Bias (%)
$\Delta^9$ THC	2		2.08	6.3	3.92	1.89	14.7	–5.5
	5		4.54	6.8	–9.3	4.87	4.3	–2.6
	10	88.3	10.20	10.0	2.0	11.06	8.0	10.6
	25		24.83	5.6	–0.7	24.68	6.5	–1.3
	50		50.45	9.0	0.9	51.66	6.0	3.3
	125	84.9	120.26	5.4	–3.8	115.70	6.3	–7.4
	250		247.61	5.3	–1.0	257.13	2.6	2.8

Calibration curve: slope  $0.0123 \pm 0.009$ , intercept  $0.073 \pm 0.004$ , coefficient of determination ( $R^2$ )  $0.995 \pm 0.003$ .

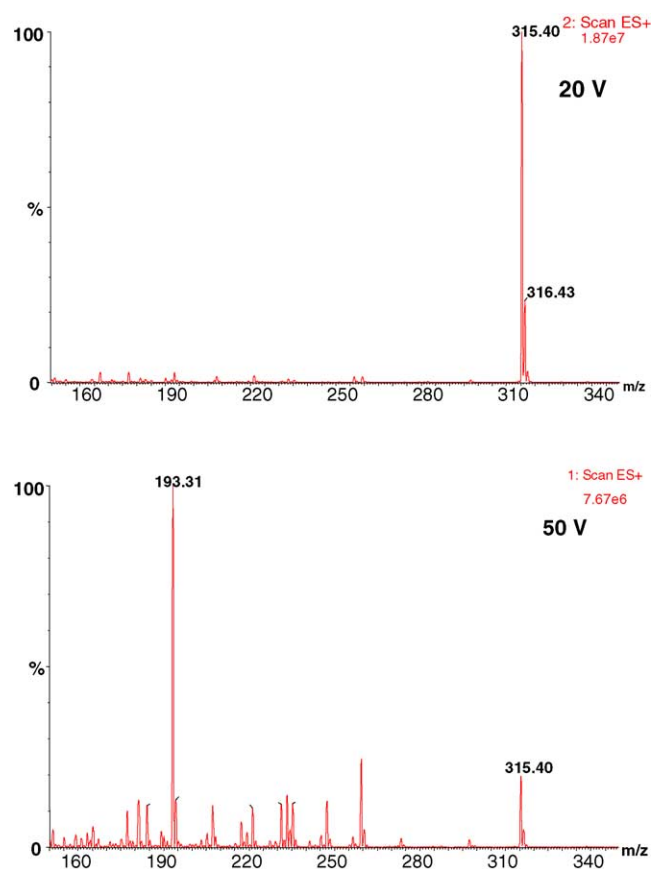


Fig. 1. Full scan mass spectrum of  $\Delta^9$ THC at different cone voltages.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemical and reagents

Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ THC) 1 mg/ml in methanol and  $\Delta^9$ THC deuterated (d3) ( $\Delta^9$ THC-d3) 100  $\mu$ g/ml in methanol as pure standards were supplied by Radian International (Austin TX, USA). LC–MS Chromasolv<sup>®</sup> grade Acetonitrile (99.98% pure) was from Riedel de Haen Sigma–Aldrich Chemie (Schnelldorf, Germany). Hexane, formic acid (98–100%), potassium dihydrogen phosphate and di-sodium hydrogen phosphate were from Merck (Barcelona, Spain).

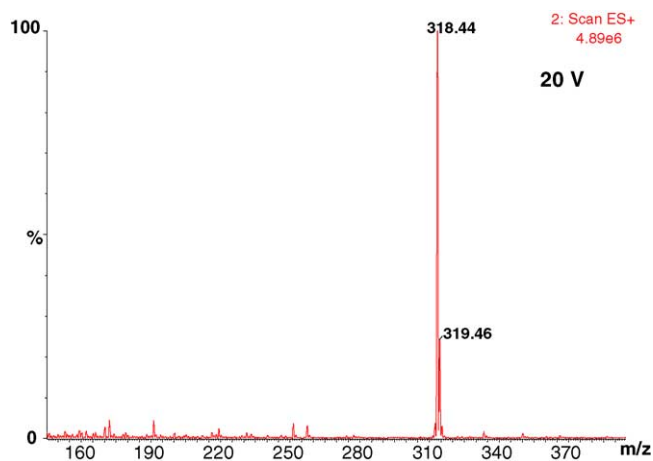


Fig. 2. Full scan mass spectrum of  $\Delta^9\text{THC-d3}$  at 20 V.

### 2.2. Preparation of standards and sample extraction

Calibration standards of  $\Delta^9\text{THC}$  were prepared in drug-free oral fluid by spiking with concentrated standards in order to obtain a concentration range between 2 and 250 ng/ml. 25  $\mu\text{l}$  of internal standard  $\Delta^9\text{THC-d3}$  (1  $\mu\text{g/ml}$ ) was added for all concentrations.

The procedure was carried out with 200  $\mu\text{l}$  of oral sample mixed with 1 ml of phosphate buffer pH 6 Soërensen buffer (1/15 M), prepared by dissolving 9.07 g of potassium dihydrogen phosphate into 1 l of deionised water, and 11.6 g of disodium hydrogen phosphate anhydrous into 1 l of deionised water (the  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  solution was used to adjust the  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  solution to pH 6) and 5 ml of hexane in a 25 ml borosilicate glass tube. After mechanical shaking (30 min) and centrifugating (10 min at  $2792.5 \times g$ ), the organic phase was transferred to a borosilicate tube and evaporated under  $\text{N}_2$  at  $45^\circ\text{C}$ . The dry extract was reconstituted in 40  $\mu\text{l}$  of mobile phase. The samples were transferred into autosampler vials, and 15  $\mu\text{l}$  was injected onto the LC–MS.

### 2.3. Chromatographic conditions

The final optimized LC separation was performed using a Waters Alliance 2795 separation module system. Chromatography was carried out at ambient temperature, using a XTerra<sup>®</sup>MS C18 column (2.1 mm  $\times$  100 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ), eluted isocratically using 0.1% formic acid/acetonitrile 15:85, (v/v), delivered at a flow rate of 0.25 ml/min.

Various tests were carried out with different formic acid and acetonitrile ratios. For our purposes the ratio 0.1% formic acid/acetonitrile 15:85 (v/v), was ideal for rapid analysis following previous elution of coextracted endogenous substances, and the high content in acetonitrile improved the ionization of the analyte. The best separation results were obtained using a XTerra<sup>®</sup>MS column as contrasted with others (Symmetry<sup>™</sup> and SymmetryShield<sup>™</sup>). Data acquisition was controlled using MassLynx NT 3.5 software.

MS procedure was performed using a Micromass ZMD 2000 detector fitted with a Z-spray ion interface. Ionization was achieved using electrospray in the positive ionization mode (ESI+). The following conditions were found to be optimal for the analysis of  $\Delta^9\text{THC}$ : capillary voltage, 3.5 kV, source block temperature,  $115^\circ\text{C}$  and desolvation gas (nitrogen) heated to  $300^\circ\text{C}$  and delivered at 500 l/h. Table 1 summarizes the conditions for the measurement of  $\Delta^9\text{THC}$  and its deuterated analogue.

The specificity (the ability of analytical method to differentiate and quantify the analyte in the presence of other

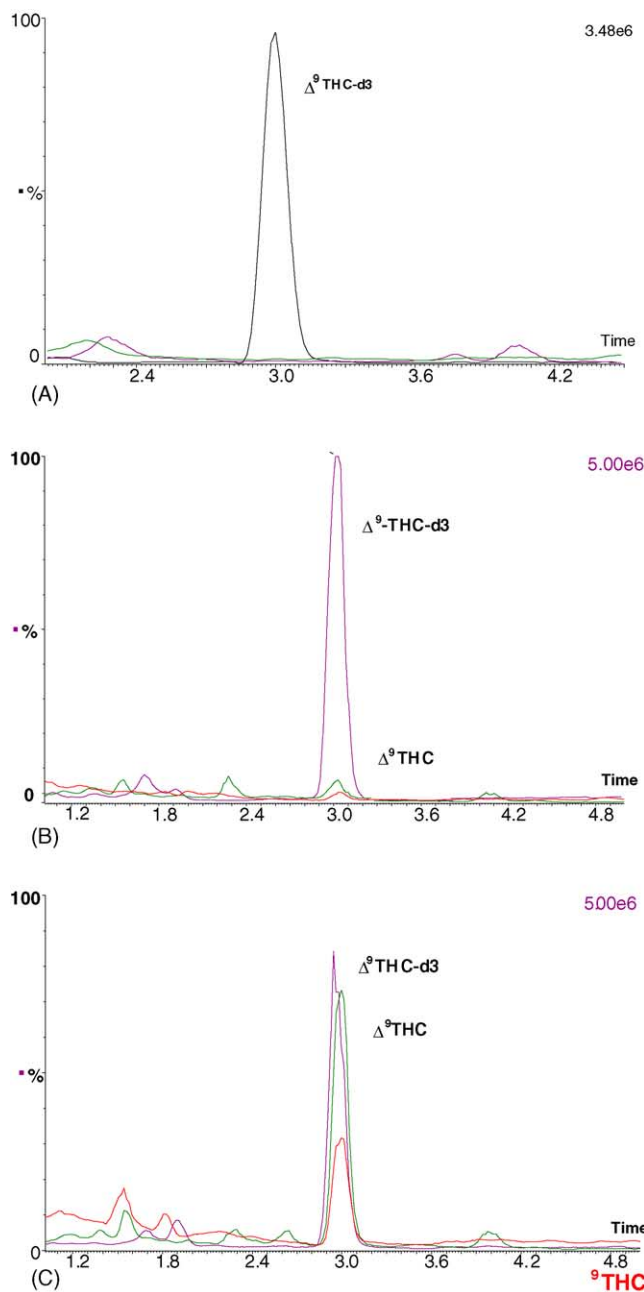


Fig. 3. (A) Blank Oral fluid with internal standard  $\Delta^9\text{THC-d3}$ ; (B) Oral fluid drug-free spiked with 5 ng/ml of  $\Delta^9\text{THC}$ ; (C) Oral fluid drug-free spiked with 125 ng/ml of  $\Delta^9\text{THC}$ .

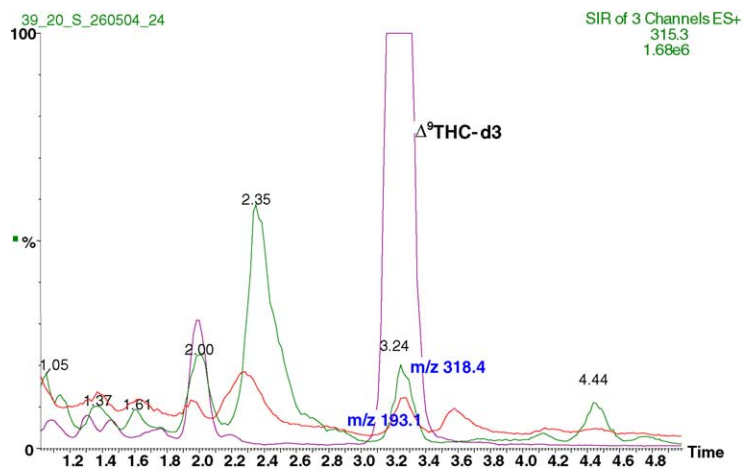


Fig. 4. Chromatogram corresponding to real sample (case 9: 6.79 ng/ml).

components) was achieved by applying the extraction procedure to six different sources (oral fluid collected from the saliva of six non-drug consuming subjects), according Shah et al. [22]. The blank oral fluid extract with the internal standard processed with this procedure showed a typical ion chromatogram (Fig. 3A). Dams et al. [23] achieved selectivity by a unique combination of retention time, precursor and fragment ion (SRM mode in triple quadrupole). In our case, selectivity was obtained by a combination of retention time and SIR mode. Two  $m/z$  ratios for  $\Delta^9$ THC were monitored in SIR mode, one corresponding to pseudomolecular ion (315.4), and the other to the appropriate fragment of the analyte (193.1). This latter fragment was obtained through collision in the cone with the residual solvent and gas molecules, by a procedure described by Marquet [24] as “collision induced dissociation” (CID), and can be used as confirmation ion for quantitation purposes.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Validation of the analytical method

The repeatability (within-day precision) and reproducibility (between-day precision), determined by analyzing six quality control samples at seven concentration levels (in the same day and on six separate days, respectively), are shown in Table 2. Results indicated that the accuracy of the assay was >90% and CV did not exceed 15%. According to Causon [25], all parameters obtained fall within the optimal precision and accuracy criteria.

For recovery studies, six replicates of two intermediate concentrations (10 and 125 ng/ml) with internal standard ( $\Delta^9$ THC-d3) were extracted by applying the previously described extraction procedure. Six blank saliva samples with internal standard ( $\Delta^9$ THC-d3), were then extracted in the same way and the final dried extracts were spiked with the appropriate amounts of  $\Delta^9$ THC in mobile phase. Absolute

recoveries for  $\Delta^9$ THC in oral fluid were carried out by comparing the analyte peak areas of the fortified samples with those of the blank samples spiked, after extraction, with the same amount of the analyte.

The limit of quantitation (LOQ), defined as the lowest concentration of analyte that could be measured reproducibly and accurately (CV <20% and bias  $\pm$  20%), was 2 ng/ml. It should be noted that the observed LOQ for this technique was achieved by using 200  $\mu$ l of oral fluid, whereas normally 500–1000  $\mu$ l of specimen is used for GC–MS.

Linearity was obtained with an average correlation coefficient ( $R_2$ , weighting factor  $1/x$ ) >0.99 over a range from the LOQ value up 250 ng/ml

The ESI mass spectra of  $\Delta^9$ THC and its deuterated analogue are shown in Figs. 1 and 2. In order to obtain a best yield for the molecular ions (315.4 for  $\Delta^9$ THC and 318.4 for  $\Delta^9$ THC-d3, respectively), 20 V was the optimal cone voltage, while 50 V was chosen for the qualifying ion (193.1).

Drug-free oral fluid spiked at 5 and 125 ng/ml with the analyte and the internal standard, and extracted according the proposal method showed typical ion chromatograms seen in Fig. 3B and C.

Table 3  
Results obtained applying the method to 14 oral fluid samples

Sample	Elapsed time (h)	$\Delta^9$ THC (ng/ml)
1	<1	>250
2	5	78.78
3	1–2	>250
4	1	>250
5	3	240.64
6	Unknown	22.58
7	>10	27.80
8	8	34.84
9	>10	6.79
10	>10	22.82
11	>10	2.42
12	>10	22.17
13	4–5	117.04
14	1–2	>250

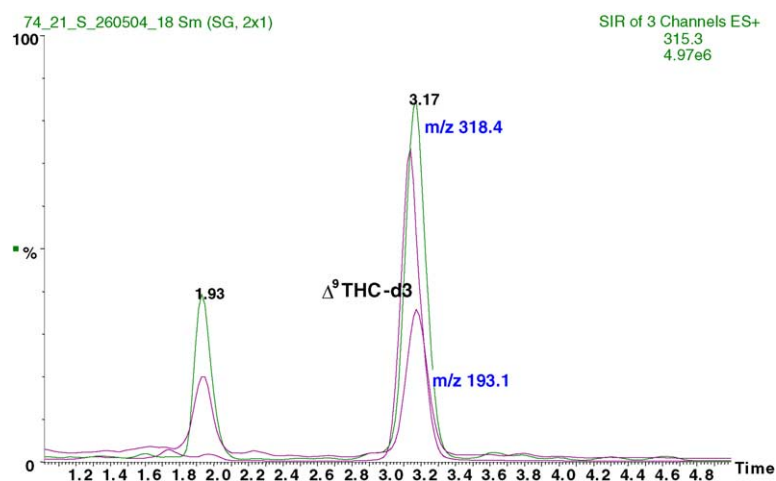


Fig. 5. Chromatogram corresponding to real sample (case 5: 240.64 ng/ml).

Matrix effects were evaluated by postcolumn infusion of  $\Delta^9$ THC into the MS detector and autosampler injection of extracted blank onto the analytical column, according experimental setup developed by King et al. [26]. The experiment was performed by triplicate to ensure its validity. We detected no suppressive effect.

Oral fluid samples from drivers who had admitted taking cannabis when they tested positive to roadside controls were provided without stimulation by spitting into a polypropylene tube to obtain 1–2 ml. The samples were frozen at  $-20^\circ\text{C}$  with dry ice until analysis in the laboratory. Stability of the samples were no tested.

Some drivers were asked to give the lapsed time from the last cannabis intake. Table 3 shows the results obtained by applying the proposed method, and Figs. 4 and 5 show typical chromatograms of cases 9 and 5.

#### 4. Conclusion

The use of oral fluid as a non-invasive specimen alternative to blood as an indicator of recent drug use is particularly indicated in countries where the legislation restricts blood collection. Further studies to evaluate the usefulness of such specimens should involve pharmacological research to determine the expected concentrations, because at the moment the results are still controversial.

In summary, we have developed a simple and rapid method for THC quantitation in oral fluid by using LC–MS. The procedure is sensitive and specific and involves a very simple liquid–liquid extraction method. It has been validated and applied to fourteen real samples.

#### Acknowledgements

This work was supported by a grant from Dirección Xeral de Investigación Científica de la Xunta de Galicia (XUGA

2001) to research groups of excellence, and by EU under ROSITA project.

#### References

- [1] E.J. Cone, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 694 (1993) 91.
- [2] M.A. Huestis, S. Dickerson, E.J. Cone, *AAFS* 92 (1992) 190.
- [3] L.K. Thompson, E.J. Cone, *J. Chromatogr.* 421 (1987) 91.
- [4] C. Maseda, K. Hama, Y. Fukui, K. Matsubara, S. Takahashi, A. Akane, *Forensic Sci. Int.* 32 (1986) 259.
- [5] W.W. Just, N. Filipovic, G. Werner, *J. Chromatogr.* 96 (1974) 189.
- [6] W. Schramm, R. Smith, P.A. Craig, D.A. Kidwell, *J. Anal. Toxicol.* 16 (1992) 1.
- [7] N. Fucci, N. De Giovanni, M. Chiarotti, S. Scarlata, *Forensic Sci. Int.* 119 (2001) 318.
- [8] M.A. Huestis, E.J. Cone, in: S. Karch (Ed.), *Drug Abuse Handbook*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1998, p. 799, Chapter 11.
- [9] O.R. Idowu, B. Caddy, *J. Forensic Sci. Soc.* 22 (1982) 123.
- [10] V. Spiehler, D. Baldwin, C. Hand, in: A.J. Jenkins, B.A. Goldberger (Eds.), *On-Site Drug Testing*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2002, p. 95, Chapter 8.
- [11] A. Jehanli, S. Brannan, L. Moore, V. Spiehler, *J. Forensic Sci.* 46 (2000) 1214.
- [12] N. Samyn, A. Verstraete, C. Van Haeren, P. Kintz, *Forensic Sci. Int. Rev.* 11 (1999) 1.
- [13] D.A. Kidwell, J.C. Holland, S. Athanaselis, *J. Chromatogr. B* 713 (1998) 111.
- [14] M. Yonamine, N. Tawil, R.L.M. Moreau, O. Alves Silva, *J. Chromatogr. B* 789 (2003) 73.
- [15] E.J. Cone, L. Presley, M. Lehrer, W. Seiter, M. Smith, K.W. Kardos, D. Fritch, S. Salamone, R.S. Niedbala, *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 541.
- [16] R.S. Niedbala, K.W. Kardos, D.F. Fritch, S. Kardos, T. Fries, J. Waga, J. Robb, E.J. Cone, *J. Anal. Toxicol.* 25 (2001) 289.
- [17] N. Samyn, A.C. Van Haeren, *Int. J. Legal Med.* 113 (2000) 150.
- [18] P. Kintz, V. Cirimele, B. Ludes, *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 557.
- [19] J.M. Hughes, D.M. Andrenyak, D.N. Crouch, M. Slawson, Poster at the 2002 SOFT Meeting Portland, *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 191.
- [20] B. Maralikova, W. Weinmann, *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 526.

- [21] S. Valiveti, A.L. Stinchcomb, *J. Chromatogr. B* 803 (2004) 243.
- [22] V.P. Shah, K.K. Mida, J.W.A. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonnelli, C.T. Viswanathan, A. Jacobi, *Pharm. Res.* 17 (2000) 1551.
- [23] R. Dams, C.M. Muphy, R.E. Choo, W.E. Lambert, A.P. De Leenher, M.A. Huestis, *Anal. Chem.* 75 (2003) 798.
- [24] P. Marquet, *Ther. Drug Monit.* 24 (2002) 255.
- [25] R. Causon, *J. Chromatogr. B* 689 (1997) 175.
- [26] R. King, R. Bonfiglio, C. Fernández-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000) 942.



# Liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry for the determination of nine selected benzodiazepines in human plasma and oral fluid

O. Quintela, A. Cruz, A. de Castro, M. Concheiro, M. López-Rivadulla\*

*Forensic Toxicology Service, Institute of Legal Medicine, University of Santiago de Compostela, C/San Francisco s/n, Santiago de Compostela, Spain*

Received 16 October 2004; accepted 22 December 2004  
Available online 10 February 2005

## Abstract

A new simple and rapid liquid chromatographic–mass spectrometric technique was designed for the determination of nine benzodiazepines in plasma and oral fluid. Benzodiazepines were extracted from alkalised spiked and clinical plasma and oral fluid samples using a single step, liquid–liquid extraction procedure with diethyl ether. The chromatographic separation was performed with a Xterra® RP<sub>18</sub>, 5 μm (150 × 2.1 mm i.d.) reversed-phase column using deuterated analogues of the analytes as internal standard. The recovery ranged from 70.3 to 86.9% for plasma and 63.9 to 77.2% for oral fluid. The limits of detection ranged from 0.5 to 1 ng/ml in plasma and 0.1 to 0.2 ng/ml for oral fluid. The method was validated for all the compounds, including linearity and the main precision parameters. The procedure, showed to be sensitive and specific, was applied to real plasma and oral fluid samples. The method is especially useful to analyse saliva samples from drivers undergoing roadside drug controls.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Liquid chromatography; Benzodiazepines; Plasma; Oral fluid; Saliva; Liquid-chromatography-mass spectrometry

## 1. Introduction

Benzodiazepines (BZP) are a large class of psychoactive drugs, very commonly prescribed all over the world, mostly as minor tranquilizers, hypnotics and muscle relaxants [1–4]. Their clinical applications have been associated to their wide safety margin and minimal adverse side effects. From a toxicological point of view, these drugs are associated to different cases of misuse: they are often abused by illicit drug users to relieve withdrawal symptoms and, recently, the use of such substances to commit sexual abuse had spread [5]. Furthermore, they are the most documented group with regard to the influence on driving behaviour [6]. So, they are usually present in clinical and forensic toxicological cases [7–9].

A large number of analytical methods have been published so far for the determination of Benzodiazepines. Numerous gas chromatography (GC) procedures have been reported for the analysis of BZP [10–13], including NPD and ECD detectors. Generally, capillary GC coupled to mass spectrometry (MS) is the method of choice for most of the toxicological analysis. Electronic impact GC–MS provides a selective analytical procedure for the analysis of BZP in biological samples [14–17] although several authors have demonstrated that the negative-ion chemical ionisation (NCI) is a more sensitive technique [18–21]. However, this method is generally tedious to apply because BZP are very polar and thermally unstable, so they cannot be evaporated and chromatographed without decomposition, unless previous derivatisation [22]. Gas chromatography–mass spectrometry determinations have been reviewed by Maurer [23]. In recent years, the coupling of liquid chromatography (LC) to MS

\* Corresponding author.

has provided a useful procedure for the analysis of organic compounds and an alternative to GC–MS in order to avoid the excessive manipulation of polar and unstable compounds. The use of HPLC–MS for clinical and forensic purposes have been reviewed by Maurer [24], Hoja [25], Marquet [26] and Van Boxlaer [27].

The excellent review done by Drummer [28] about extraction procedures and methods for the measurement of BZP in biological samples is outstanding. Finally, some references related to the determination of BZP in biological samples by HPLC–DAD [29–32] and capillary electrophoresis [33–35] must be included in order to complete a full revision of the analytical methodology.

The biological samples most commonly used for the analysis of BZP are plasma/blood and urine. The use of an alternative specimen such as saliva has been proposed [36] in the roadside places. In this context the use of saliva for the BZP detection can become a very useful tool.

For this reason we have developed a simple HPLC–MS procedure for the determination of nine BZP in human plasma and oral fluid, in order to detect small quantities. In addition, a preliminary pharmacokinetic study for two of them (midazolam and lorazepam) was carried out in order to obtain the possible correlation between plasma and oral fluid levels.

## 2. Material and methods

### 2.1. Reagents

Midazolam, bromazepam, tetrazepam, alprazolam, lorazepam, triazolam, flunitrazepam, diazepam and lormetazepam, from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Internal standards (IS): Alprazolam- $d_5$ , lorazepam- $d_4$  and diazepam- $d_5$ , from Cerilliant (Barcelona, Spain). Formic acid (99% pure) was obtained from Merck (Barcelona, Spain). Chromasolv<sup>®</sup> grade Acetonitrile (99.98% pure) was from Riedel de Hæn Sigma–Aldrich Chemie (Schnelldorf, Germany). Purified water was obtained in the laboratory using a Milli-Q water system (Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland). A 0.1 M ammonium carbonate pH 9.30 buffer was prepared by adding a 1 M ammonium hydroxide solution to 900 ml of ammonium carbonate solution (9.6 g/l) to pH 9.3 (determined using a pH meter) and making up the solution to 1000 ml with ammonium carbonate (to oral fluid samples).

A pH 9.0 borate buffer was prepared by mixing 6.2 g of  $H_3BO_3$  and 7.5 g of KCl with 420 ml of a solution of 0.1 M sodium hydroxide, and adding water until 1000 ml (to plasma samples).

Fresh and drug-free human plasma and oral fluid (OF). Liquid–liquid extraction: Diethylether Multisolvent, from Scharlau (Sentmenat, Spain).

Salivette<sup>®</sup> device for collecting OF, with and without citric acid stimulation (Sarstedt Nümbrecht, Germany).

### 2.2. Preparation of stock solutions and standards

Stock solutions of each BZP and respective IS were prepared at 1 g/l in methanol or acetonitrile and were kept at  $-20^\circ C$  in the dark for a maximum of 6 months. Each day, working solutions of each, containing 0.02, 0.1, 0.5 and 2.5 mg/l, for plasma and 0.002, 0.005, 0.01, 0.1 and 0.25 mg/l for saliva, were prepared by appropriate dilution with Milli-Q water. The working solutions of respective internal standards at 1 mg/l (for plasma) and 0.4 mg/l (for saliva) were prepared by appropriate dilution with methanol.

### 2.3. Sample preparation

To 0.5 ml of plasma were added 50  $\mu$ l of a 1 mg/l IS solution, 0.5 ml of the pH 9.0 borate buffer and 8 ml of the extraction solvent (diethyl ether), in a 10-ml borosilicate tube. The tubes were shaken for 15 min then centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The organic phase (7.2–7.8 ml) was transferred to a 10-ml borosilicate tube and evaporated to dryness at  $45^\circ C$  under a gentle stream of nitrogen. The dry extract was re-dissolved in 100  $\mu$ l of a mixture of formic acid 0.1%–acetonitrile (90:10, v/v). The samples were transferred into autosampler vials, and 15  $\mu$ l was injected into the LC–MS.

In the case of saliva samples, the process was slightly different. To 0.5 ml of saliva were added 50  $\mu$ l of a 0.4 mg/l IS solution, 0.5 ml of the 0.1 M ammonium carbonate buffer, pH 9.30, and 6 ml of the extraction solvent (diethyl ether), in a 10-ml borosilicate tube. The tubes were shaken for 15 min then centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The organic phase (5.2–5.8 ml) was transferred to a 10-ml borosilicate tube and evaporated to dryness at  $45^\circ C$  under a gentle stream of nitrogen. The dry extract was re-dissolved in 50  $\mu$ l of a mixture of formic acid 0.1%–acetonitrile (93:7, v/v), of which 15  $\mu$ l was injected into the chromatographic system.

Two sets of calibrating standards, one for plasma at 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 125 and 250 ng/ml, and one for saliva at 0.2, 0.5, 1, 2, 10 and 25 ng/ml of the mixture of BZP, were prepared with each series, by spiking blank plasma and saliva samples with the appropriate working solutions.

### 2.4. Liquid chromatography–mass spectrometry

The HPLC system was a Waters Alliance 2795 (Waters, Watford, UK) separation Module. Chromatographic separation was performed with a Xterra<sup>®</sup> RP<sub>18</sub>, 5  $\mu$ m (150  $\times$  2.1 mm i.d.) reversed-phase column (Waters, Milford, USA). The mobile phase, delivered at a flow-rate of 0.25 ml/min at room temperature, was a gradient of acetonitrile in 0.1% formic acid programmed as follows: for plasma, 10% acetonitrile during 1.5 min, increased to 72% in 14 min and decreased to 10%, i.e., original conditions, in 1 min; and for saliva, 7% acetonitrile during 2 min, increased to 72%

in 12.5 min and decreased to 7%, i.e., original conditions, in 0.5 min.

The detection was performed using a Micromass ZMD 2000 mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) fitted with a Z-spray ion interface. Ionisation was achieved using electrospray in the positive ionisation mode (ESI+). Nitrogen was used as nebulisation and desolvation gas. For optimising ionisation and ion transmission conditions of each BZP and the IS, 15  $\mu$ l of a 10  $\mu$ g/ml solution of each compound in the mobile phase were injected without HPLC separation into the ion source. In order to obtain the highest possible intensity for quantitation and confirmation ions, fragmentation energy (cone voltage) was optimised. During this experiment, a mass range from  $m/z$  100 to 400 was monitored. Acquisition was made in the selected ion-monitoring mode of positive ions, with a dwell time of 0.15 s. For the quantitation of each BZP the protonated molecule  $[M + H]^+$  was selected as the quantifying ion and one main fragment was selected as the confirmation ion. Table 1 summarizes the conditions for the measurement of each BZP and the deuterated IS. The other main parameters settings were: drying gas temperature 300 °C, source heater temperature 115 °C, nebulisation gas flow 550 l/h, cone gas flow 100 l/h and capillary voltage 3000 V.

Data acquisition, peak integration and calculation were interfaced to a computer workstation running Mass Lynx NT 3.5 and QuanLynx 3.5 software.

Table 1  
Retention times, selected ions and cone voltages of the nine selected benzodiazepines

Compound	Retention time (min)		Selected $m/z$ ratios <sup>a</sup>	Cone voltage (V)
	PI	OF		
Alprazolam	11.6	12.6	<b>309.1</b>	40
			281.2	60
Bromazepam	9.8	10.8	<b>318.0</b>	30
			290.0	50
Diazepam	13.4	14.1	<b>285.3</b>	20
			257.2	60
Flunitrazepam	12.9	13.8	<b>314.2</b>	30
			268.2	60
Lorazepam	12.2	13.2	<b>321.0</b>	30
			303.1	40
Lormetazepam	13.2	14.2	<b>335.0</b>	30
			289.0	60
Midazolam	9.27	10.1	<b>326.1</b>	30
			291.3	60
Tetrazepam	11.1	12.2	<b>289.2</b>	40
			261.3	55
Triazolam	12.0	12.9	<b>343.1</b>	45
			308.1	55
Alprazolam-d <sub>5</sub>	11.6	12.5	<b>314.2</b>	40
Diazepam-d <sub>5</sub>	13.3	14.2	<b>290.3</b>	40
Lorazepam-d <sub>4</sub>	12.2	13.2	<b>325.1</b>	25

<sup>a</sup> Quantifying ions are in bold characters.

## 2.5. Validation

The analytical validation was performed according the recommendations of Shah [37] and Peters [38].

Recoveries were determined in quintuplicate at two concentrations (low and high) of each BZP in plasma and saliva. For each concentration, five blank samples were fortified with the IS and the appropriate amount of each BZP, while five others only with the IS. They were extracted as previously described. The dry extracts of the fortified samples were re-dissolved in 50  $\mu$ l of the reconstitution solvent, while the extracts of the blank samples were re-dissolved with 50  $\mu$ l of the reconstitution solvent containing the respective nominal amounts of BZP. The latter were used as neat standards.

In addition, the recovery from the cotton-roll of Salivette<sup>®</sup> was calculated in a similar way at 1 and 25 ng/ml of each BZP in saliva. For each concentration, 10 blank saliva samples were fortified with the respective BZP and IS. Five samples of each concentration were absorbed with Salivette<sup>®</sup> devices, centrifuged and then extracted as previously described. The other five, directly extracted, were used as neat standards.

Within-day precision and accuracy were determined at three concentrations, the lower limit of quantitation (LLOQ), the upper limit of quantitation (ULOQ) and an intermediate level, by preparing and analysing on the same day six replicates for each level. Between-day precision and accuracy, as well as linearity and the lower limit of quantitation (LLOQ) were assessed by analysing each day for 6 days a set of plasma samples spiked at 1, 2, 5, 10, 20, 50, 125 and 250 ng/ml and saliva samples at 0.2, 0.5, 1, 2, 10 and 25 ng/ml, respectively. Precision, expressed as the coefficient of variation (CV) of the measured values, was expected to be less than 15% at all concentrations, except for the LLOQ, for which 20% was acceptable. In the same way, accuracy was evaluated using the mean relative error (MRE), which had to be less than 15% of theoretical values at each concentration level except for the LLOQ, for which 20% was acceptable [37,38]. Therefore, LLOQ was defined as the lowest concentration yielding between-day precision CV and MRE of less than 20% each.

The validation of a partial or increased sample volume was done by diluting 1/5 additional quality controls (QC) with a concentration five times above the ULOQ in plasma and saliva (1250 and 250 ng/ml, respectively). Five replicates of each control sample were analysed together with a calibration curve after appropriate dilution of the samples, with blank plasma or saliva, to the validated concentration range. The calculated concentrations of diluted QCs, when multiplied by their respective dilution factors must fall within the defined precision and accuracy criteria for that QC [39].

The specificity of the method was evaluated by analysing plasma and saliva samples from 10 healthy non-drug-consuming subjects.

The matrix effect on the ESI response was evaluated by using a post-column infusion system [40–42]. Mobile phase was delivered into the electrospray interface at a rate of

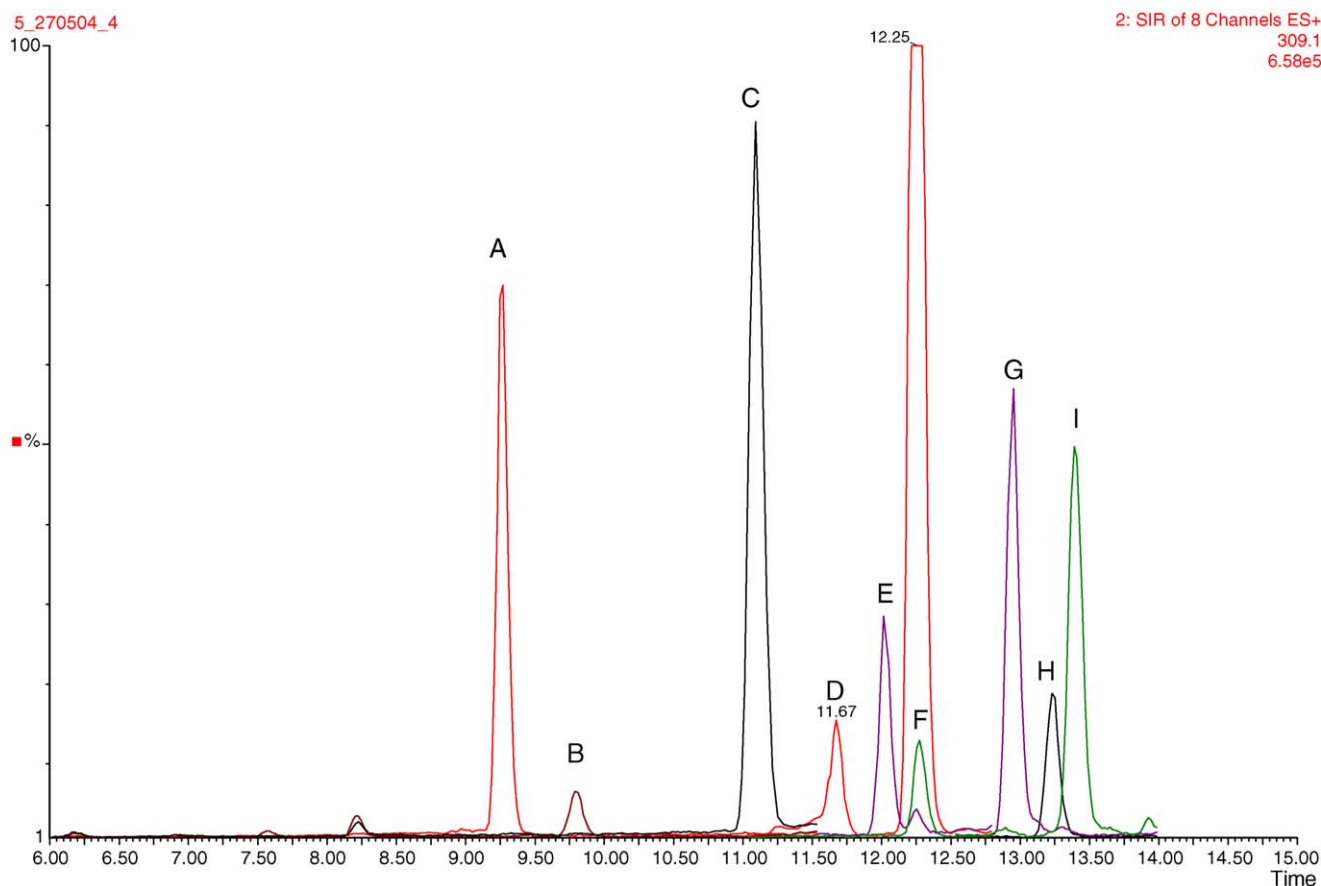


Fig. 1. LC-ES-MS ion chromatograms of a plasma sample spiked at 5 ng/ml of nine benzodiazepines.

250  $\mu$ l/min while analyte was being infused, post-column, through a Valco zero dead volume tee using a Harvard Apparatus Model 11 (South Natick, MA, USA) syringe pump. Five plasma and saliva samples without BZP nor IS were extracted as previously described, reconstituted with mobile phase, and 15  $\mu$ l of each plasma extract were injected onto the XTerra column. Effluent from the HPLC column combined with the infused analytes and entered the electrospray interface.

Midazolam was administered parenterally in a single 2 mg-dose to patients undergoing minor surgery. Patients were conscious during the OF sampling in all cases. Lormetazepam was administered orally at a 1 mg dose to healthy volunteers.

### 3. Results and discussion

Deuterated analogues are commonly used as internal standards as they are essentially identical in chemical and chromatographic properties to the respective unlabelled compounds whilst being readily distinguishable by mass spectrometry because of their mass difference. In our case alprazolam- $d_5$ , lorazepam- $d_4$  and diazepam- $d_5$  were chosen for this purpose.

The ion chromatograms of the nine BZP are presented in Fig. 1. The retention time and the selected ions are reported in Table 1. Likewise, their respective optimised fragmentation voltages are shown in the same table as responsible to obtain the highest intensity of the base product ions. CID conditions were adjusted in order to obtain the optimum intensity for one product ion for each analyte.

No endogenous plasma and saliva components were observed at the retention times of the nine analytes nor internal standards.

The within-day precision, as well as the between-day precision and accuracy were satisfactory under all the tested concentrations (Tables 2 and 3). The linearity of the compound-to-IS peak area ratio versus the theoretical concentration was verified in plasma and saliva by using a  $1/x$  weighted linear regression. The correlation coefficients were typically better than 0.99 and the curvature was tested on a set of six calibration curves (Table 4). The limits of detection (LOD), defined as the lowest tested concentration yielding a signal-to-noise ratio higher than 3, and the recoveries, calculated as described in the validation section, are shown in the same table. The LLOQs and the ULOQs, also can be seen on Table 4, and correspond to the lowest and the highest concentration level of the calibration range, respectively, for each analyte.

Table 2  
Within-day precision and accuracy for the determination of nine benzodiazepines in plasma (PI) and oral fluid (OF) samples

Compound		Precision (R.S.D., %)			Mean relative error <sup>a</sup> (%)		
		Low level	Medium level	High level	Low level <sup>b</sup>	Medium level <sup>c</sup>	High level <sup>d</sup>
Alprazolam	PI	7.7	4.2	2.7	4.0	4.7	4.8
	OF	6.9	2.1	3.3	7.7	1.3	2.4
Bromazepam	PI	11.7	13.0	7.2	1.2	6.8	1.8
	OF	11.3	10.8	9.8	9.3	1.6	2.1
Diazepam	PI	9.5	2.0	3.7	6.0	1.5	0.8
	OF	8.5	2.4	0.9	0.8	4.9	4.6
Flunitrazepam	PI	6.3	2.9	6.9	3.5	3.0	0.7
	OF	5.5	6.5	1.1	0.1	3.0	1.8
Lorazepam	PI	8.9	3.5	3.6	5.0	6.6	3.3
	OF	8.4	3.8	2.3	1.1	1.4	4.0
Lormetazepam	PI	7.7	8.6	1.2	1.5	8.5	3.6
	OF	9.2	7.4	2.2	0.8	5.2	0.7
Midazolam	PI	2.3	3.4	8.9	0.8	8.2	5.8
	OF	13.4	3.8	5.2	3.3	5.7	6.6
Tetrazepam	PI	5.3	6.7	7.9	4.3	7.3	6.8
	OF	6.4	3.9	2.3	7.5	5.2	0.9
Triazolam	PI	5.6	8.2	6.7	0.2	1.7	4.7
	OF	9.7	8.1	2.8	5.8	5.7	2.7

<sup>a</sup> Mean relative error =  $|\text{Mean measured value} - \text{theoretical value}| \times 100/\text{theoretical value}$ .

<sup>b</sup> Low level, the LLOQ of each compound.

<sup>c</sup> Medium level, 50 ng/ml in plasma and 2 ng/ml in OF samples.

<sup>d</sup> High level, the ULOQ of each compound.

Table 3  
Between-day precision and accuracy for the determination of 9 benzodiazepines in plasma (PI) and oral fluid samples (OF)

Compound		Precision (R.S.D., %)			Mean relative error <sup>a</sup> (%)		
		Low level <sup>b</sup>	Medium level <sup>c</sup>	High level <sup>d</sup>	Low level <sup>b</sup>	Medium level <sup>c</sup>	High level <sup>d</sup>
Alprazolam	PI	5.7	4.2	2.1	13.3	3.4	0.6
	OF	5.1	3.9	1.7	1.1	1.2	0.4
Bromazepam	PI	8.3	9.9	2.6	1.2	1.1	2.4
	OF	12	4.7	2.5	7.7	5.9	0.1
Diazepam	PI	12.6	4.6	1.3	2.6	1.8	1.9
	OF	9.1	2.2	0.9	10.0	6.4	2.5
Flunitrazepam	PI	14.7	4.1	2.0	1.4	4.4	3.5
	OF	8.2	8.4	1.4	7.9	0.4	1.2
Lorazepam	PI	13.8	4.6	1.3	5.4	2.3	2.3
	OF	6.6	4.3	1.3	8.6	5.2	2.1
Lormetazepam	PI	12.8	2.4	3.4	1.3	3.0	1.1
	OF	8.1	7.0	1.8	5.0	4.0	0.9
Midazolam	PI	13.7	3.3	2.8	5.0	6.9	4.0
	OF	12.5	5.4	2.9	3.3	3.2	0.1
Tetrazepam	PI	14.8	5.8	2.0	5.8	8.3	3.8
	OF	6.2	3.5	1.4	14.3	6.4	2.8
Triazolam	PI	11.7	4.5	1.0	1.6	3.2	4.5
	OF	13.3	4.6	2.5	6.4	4.2	0.7

<sup>a</sup>Mean relative error =  $|\text{Mean measured value} - \text{theoretical value}| \times 100/\text{theoretical value}$ . <sup>b</sup>Low level, corresponding with the LLOQ of each compound.

<sup>c</sup>Medium level, corresponding with 50 ng/ml in plasma and 2 ng/ml in OF samples. <sup>d</sup>High level, corresponding with the ULOQ of each compound.

Table 4  
Calibration data, limits of detection, and recoveries for the examined compounds

Compound	Biological sample	Calibration range (ng/ml)	Linearity ( $n = 6$ )	$R^2$	S.D. (on slope)	LOD <sup>a</sup> (ng/ml)	Recovery (%) ( $n = 5$ )	
							Low <sup>b</sup>	High <sup>c</sup>
Alprazolam	Pl	1–400	$y = 0.004x + 0.0015$	0.999	0.0002	0.5	77.5	76.7
	OF	0.5–50	$y = 0.0212x + 0.0039$	0.999	0.0041	0.2	70.6	67.6
Bromazepam	Pl	5–250	$y = 0.003x + 0.0024$	0.996	0.0008	1	85.9	84.0
	OF	0.5–25	$y = 0.0066x + 0.0014$	0.998	0.0022	0.2	70.3	70.5
Diazepam	Pl	1–250	$y = 0.0053x + 0.0026$	0.999	0.0003	0.5	81.6	89.0
	OF	0.2–50	$y = 0.0161x + 0.0028$	0.999	0.0012	0.1	77.2	67.2
Flunitrazepam	Pl	1–400	$y = 0.0061x + 0.0011$	0.998	0.0003	0.5	82.3	91.0
	OF	0.2–50	$y = 0.0202x + 0.001$	0.999	0.0069	0.1	76.1	72.1
Lorazepam	Pl	1–250	$y = 0.0032x + 0.0018$	0.999	0.0001	0.5	71.9	78.0
	OF	0.5–25	$y = 0.0295x + 0.0036$	0.998	0.0029	0.2	72.7	72.3
Lormetazepam	Pl	1–400	$y = 0.0018x + 0.0006$	0.998	0.0001	0.5	77.7	82.4
	OF	0.2–50	$y = 0.006x + 0.0007$	0.999	0.0011	0.1	70.5	71.0
Midazolam	Pl	1–250	$y = 0.005x + 0.0017$	0.996	0.0013	0.5	70.3	71.6
	OF	0.2–25	$y = 0.0143x + 0.0021$	0.998	0.0029	0.1	68.3	69.9
Tetrazepam	Pl	1–250	$y = 0.0074x + 0.001$	0.996	0.001	0.5	86.9	96.8
	OF	0.2–50	$y = 0.0276x + 0.0024$	0.998	0.0014	0.1	72.1	69.3
Triazolam	Pl	2–250	$y = 0.0149x - 0.0004$	0.994	0.0007	0.5	74.5	69.9
	OF	0.2–50	$y = 0.0118x + 0.001$	0.998	0.0011	0.1	63.9	64.9

<sup>a</sup> Defined as the lowest concentration of the drug resulting in a signal-to-noise ratio of 3:1.

<sup>b</sup> Low levels, 5 ng/ml in plasma and 2 ng/ml in OF samples.

<sup>c</sup> High levels, 125 ng/ml in plasma and 25 ng/ml in OF samples.

Table 5  
Evaluation of partial sample dilution in plasma and oral fluid samples, and recoveries of benzodiazepines from the cotton roll of the Salivette<sup>®</sup> devices

Compound		Dilution 1/5 ( $n = 6$ )		Recovery from Salivette <sup>®</sup> (%) ( $n = 5$ )	
		R.S.D. (%)	Mean relative error <sup>a</sup>	1 ng/ml	25 ng/ml
Alprazolam	Pl	1.6	0.2	101.2	82.7
	OF	2.6	3.4		
Bromazepam	Pl	12.8	2.3	91.6	90.0
	OF	9.2	1.5		
Diazepam	Pl	2.4	0.7	68.0	67.7
	OF	2.2	3.8		
Flunitrazepam	Pl	3.1	0.8	88.8	78.7
	OF	1.6	0.6		
Lorazepam	Pl	2.5	1.4	65.8	70.3
	OF	1.6	1.8		
Lormetazepam	Pl	2.9	1.4	81.8	73.5
	OF	1.5	7.2		
Midazolam	Pl	9.7	3.9	52.2	55.0
	OF	10.0	2.7		
Tetrazepam	Pl	5.4	7.3	55.0	53.7
	OF	3.7	3.6		
Triazolam	Pl	5.9	3.7	89.8	87.4
	OF	5.8	13.2		

<sup>a</sup> Mean relative error =  $|\text{Mean measured value} - \text{theoretical value}| \times 100/\text{theoretical value}$ .

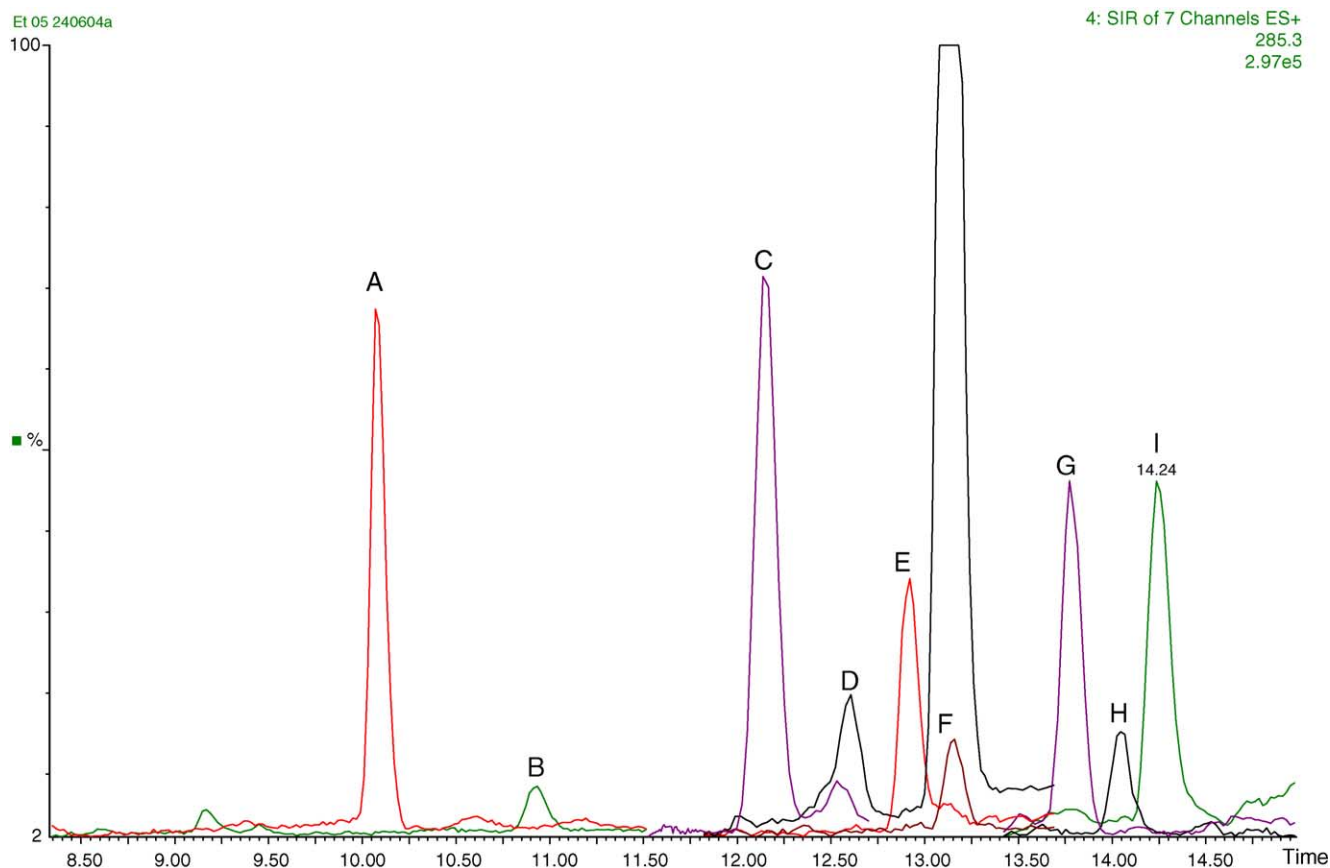


Fig. 2. LC-ES-MS ion chromatograms of an OF sample spiked at 0.5 ng/ml of nine benzodiazepines.

As an alternative to the extension of the calibration curve for the measurement of concentrations, which are above the highest calibration standard, the sample can be re-analysed after dilution with blank matrix [40–42]. The validation of this procedure showed the following results: the 1/5 dilution

of a plasma concentration of 1250 ng/ml and a saliva concentration of 250 ng/ml for each BZP yielded results within the defined precision and accuracy criteria (Table 5). The same table also shows the recoveries of the nine BZP from the Salivette device. In our study the recovery from the cotton

Table 6  
Results of the kinetic study done in patients undergoing lorazepam treatment

Case number	Extraction time	Concentration found (ng/ml)		
		Plasma	Oral fluid (Salivette without stimulation)	Oral fluid (Salivette with stimulation)
1	–5	N.A.	0.00	0.00
	30	N.A.	3.39	2.01
	60	4.56	1.48	0.72
	90	5.50	0.45	0.30
	120	2.58	<LOQ	<LOQ
	150	3.92	<LOQ	<LOD
	180	3.73	<LOD	<LOD
	300	N.A.	N.A.	N.A.
2	360	2.58	N.A.	N.A.
	–5		0.00	0.00
	30		0.77	0.45
	60		0.49	0.27
	90		0.35	0.24
	120		<LOQ	<LOQ
	180		<LOQ	<LOD
	240		<LOD	<LOD
420		<LOD	<LOD	

roll of Salivette® was very variable, and ranged from only 52.2% for midazolam and 101.2% for alprazolam, respectively. This means that more than 50% of the drug present in saliva can remain in the cotton, which represents another difficulty in the interpretation of saliva results: It is very risky, as we showed, to establish a relation between plasma/saliva concentrations for selected BZP, and in any case specific studies for each new drug should be done. In any case the proposed analytical procedure is sensitive enough as to detect very low saliva concentrations, which permit to diagnose recent consumption of the nine BZP studied. Figs. 1 and 2 show the ion chromatograms of a plasma sample spiked at 5 ng/ml and a saliva sample spiked at 0.5 ng/ml with BZP, respectively.

No suppressive effect was detected in the region of interest after the evaluation of the ion suppression effect by the post-column infusion system.

Finally, Tables 6 and 7 show the results of the kinetic study done in patients undergoing midazolam or lorazepam treatment. Fig. 3 represents the ion chromatogram of a saliva sample from a patient undergoing lorazepam treatment. In summary, we have developed a simple and rapid method for the BZP quantitation in plasma and oral fluid by using LC–MS. The procedure is sensitive and specific and involves

Table 7

Results of the kinetic study done in patients undergoing midazolam treatment

Case number	Concentration found (ng/ml)	Sample extraction time (min)		
		10	30	50
1	Plasma	197.87	54.29	43.36
	OF	13.98 <sup>a</sup>	2.56 <sup>a</sup>	1.04
2	Plasma	282.9	140.6	51.8
	OF	N.A.	N.A.	N.A.
		20	40	60
3	Plasma	1101.74	156.7	28.19
	OF	1.98 <sup>a</sup>	0.57	0.57
4	Plasma	50.64	25.48	30.2
	OF	0.79 <sup>a</sup>	1.42 <sup>a</sup>	0.22 <sup>a</sup>
5	Plasma	308.87	26.29	15.04
	OF	1.73 <sup>a</sup>	2.16 <sup>a</sup>	N.A.

N.A., no sample available.

<sup>a</sup> Not enough volume of sample (<500 µl).

a very simple liquid–liquid extraction method. It has been validated and applied to real samples. The method is especially useful to analyse saliva samples from drivers undergoing road side drug controls.

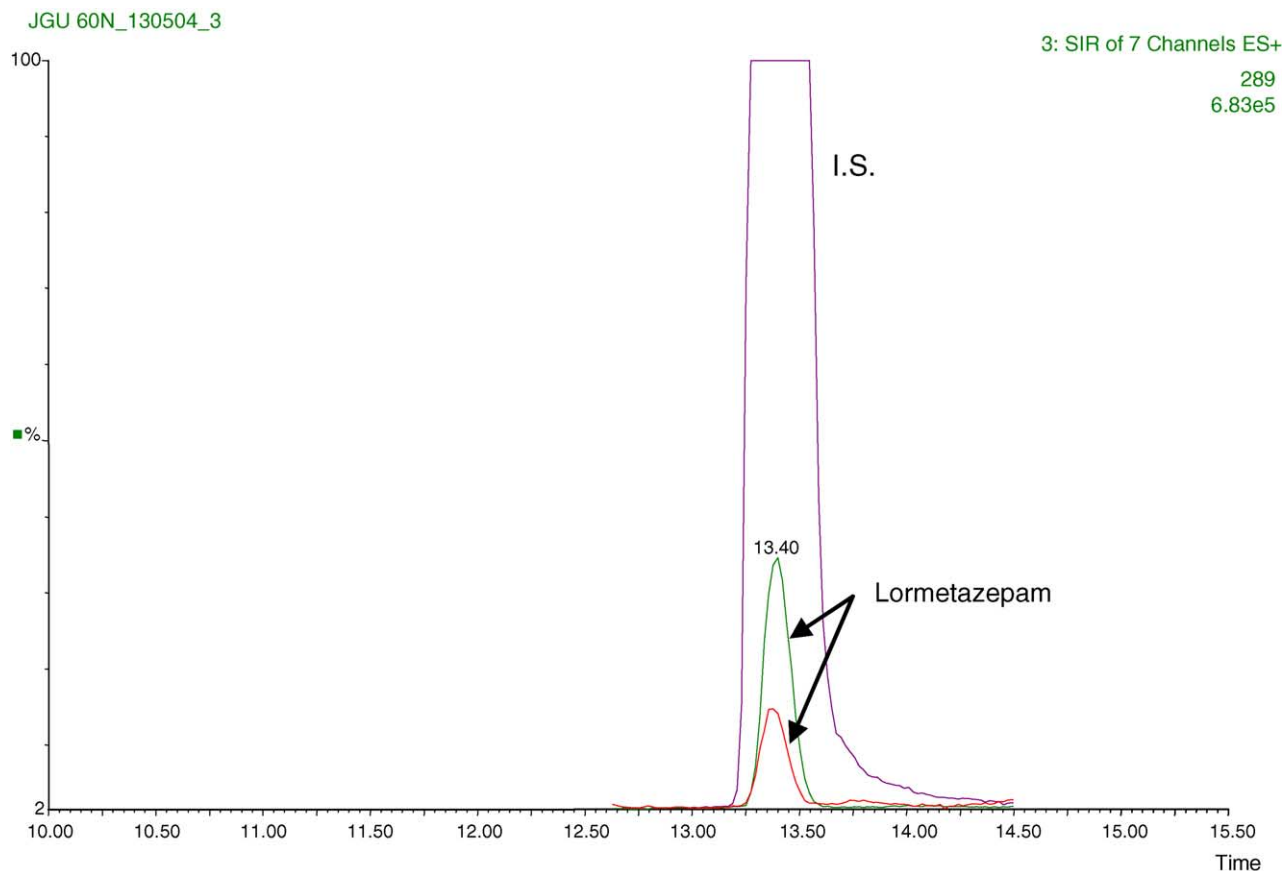


Fig. 3. Selected ion chromatograms of OF sample collected at 60 min after administration of single oral dose of 1 mg lorazepam with Salivette® device. The concentration measured was: 1.48 ng/ml.



## Acknowledgements

This work was supported by a grant from Dirección Xeral de Investigación Científica de la Xunta de Galicia (XUGA 2001) to research groups of excellence, and by EU under ROSITA project.

## References

- [1] H.J. Möller, *J. Psychopharmacol.* 19 (1999) 2S.
- [2] J.W. Dundee, N.J. Halliday, K.W. Harper, R.N. Brogden, *Drugs* 28 (1984) 519.
- [3] M.H. Lader, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 9 (1999) 399.
- [4] O.H. Drummer, D.L. Ranson, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 17 (1996) 336.
- [5] S.J. Salamone, *Benzodiazepines and GHB: Detection and Pharmacology*, Humana Press, Totowa, NJ, 2001.
- [6] V. Maes, C. Charlier, O. Grenez, A. Verstraete, ROSITA D1, DGVII PL98-3032, 1999 (available from <http://www.rosita.org>).
- [7] B. Verwey, P. Elling, H. Wientjes, F.J. Zitman, *J. Clin. Psychiatry* 61 (2000) 456.
- [8] S. Pirnay, I. Ricordel, D. Libong, S. Bouchonnet, *J. Chromatogr. A* 954 (2002) 235.
- [9] A. Perisolo, *Encéphale* 22 (1996) 187.
- [10] D.J. Greenblatt, J.I. Javaid, A. Loenistar, J.S. Harmatz, R.I. Shader, *J. Chromatogr.* 534 (1990) 202.
- [11] H. Gjerde, E. Dahlin, A.S. Christopherson, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10 (1992) 317.
- [12] I. Klebovich, M. Kapas, L. Vereczkey, *Acta Pharm. Hung.* 2 (1982) 246.
- [13] T.V. Beischlag, T. Inaba, *J. Anal. Toxicol.* 16 (1992) 236.
- [14] P. Kintz, P. Mangin, *J. Anal. Toxicol.* 15 (1991) 202.
- [15] H. Maurer, K. Pflieger, *J. Chromatogr.* 422 (1987) 85.
- [16] W.A. Joern, *J. Anal. Toxicol.* 16 (1992) 363.
- [17] D.A. Black, G.D. Clark, V.M. Haver, J.A. Garbin, A.J. Saxon, *J. Anal. Toxicol.* 18 (1991) 185.
- [18] R.L. Fitzgerald, D.A. Rexin, D.A. Herold, *J. Anal. Toxicol.* 17 (1993) 347.
- [19] E.R. Cairns, B.R. Dams, J.C. Ouwerkerk, L.J. Porter, *J. Anal. Toxicol.* 18 (1994) 1.
- [20] E.M. Koves, B. Yen, *J. Anal. Toxicol.* 13 (1989) 69.
- [21] K.M. Höld, D.J. Chrouch, D.E. Rollins, D.G. Wilkins, D.V. Canfield, R.A. Maes, *J. Mass Spectrom.* 31 (1996) 1033.
- [22] J. Segura, R. Ventura, C. Jurado, *J. Chromatogr. B* 713 (1998) 61.
- [23] H.H. Maurer, *J. Chromatogr.* 580 (1992) 3.
- [24] H.H. Maurer, *J. Chromatogr. B* 713 (1998) 3.
- [25] H. Hoja, P. Marquet, B. Berneil, H. Lotfi, B. Penicaut, G. Lachâtre, *J. Anal. Toxicol.* 21 (1997) 116.
- [26] P. Marquet, *Ther. Drug Monit.* 24 (2002) 255.
- [27] J.F. Van Boxclaer, K.M. Clauwaert, W.E. Lambert, D.L. Deforce, E.G. Van den Eeckhout, A.P. De Leenheer, *Mass Spectrom. Rev.* 19 (2000) 165.
- [28] O.H. Drummer, *J. Chromatogr. B.* 713 (1998) 3.
- [29] J.L. Valentine, J.R. Middleton, C. Sparks, *J. Anal. Toxicol.* 20 (1996) 416.
- [30] K.K. Akerman, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 56 (1996) 609.
- [31] F. Mußhoff, T. Daldrup, *Int. J. Legal Med.* 105 (1992) 105.
- [32] M. Casas, L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11 (1993) 277.
- [33] S.C. Bishop, M.L. Lerch, B.R. McCord, *Forensic Sci. Int.* 141 (2001) 7.
- [34] P. Wernly, W. Thormann, *Anal. Chem.* 64 (1992) 2155.
- [35] M. Schafroth, W. Thormann, *Allemann Electrophor.* 15 (1994) 72.
- [36] ROSITA D1, DGVII PL98-3032, 1999 (available from <http://www.rosita.org>).
- [37] V.P. Shah, K.K. Mida, J.W.A. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonnelli, C.T. Viswanathan, A. Jacobi, *Pharm. Res.* 17 (2000) 1551.
- [38] F.T. Peters, H.H. Maurer, *Accred. Qual. Assur.* 7 (2001) 441.
- [39] D. Dadgar, P.E. Burnett, M.G. Choc, K. Gallicano, J.W. Hooper, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 89.
- [40] R. Bonfiglio, R.C. King, T.V. Olah, K. Merkle, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1175.
- [41] C. Müller, P. Schäfer, M. Störtzel, S. Vogt, W. Weinmann, *J. Chromatogr. B* 773 (2002) 47.
- [42] Y. Hsieh, M. Chintala, H. Mei, J. Agans, J.M. Ng, K. Brisson, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 2481.



# Determination of drugs of abuse and their metabolites in human plasma by liquid chromatography–mass spectrometry

## An application to 156 road fatalities

Marta Concheiro, Ana de Castro, Óscar Quintela,  
Manuel López-Rivadulla, Angelines Cruz\*

*Forensic Toxicology Service, Institute of Legal Medicine, University of Santiago de Compostela, Spain,  
C/San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain*

Received 10 November 2005; accepted 22 December 2005

Available online 24 January 2006

### Abstract

A method, using 0.2 ml of plasma, was designed for the simultaneous determination of morphine, 6-monoacetylmorphine, amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, benzoylecgonine and cocaine. The drugs were analysed by LC–MS, after solid phase extraction in the presence of the deuterated analogues. Reversed phase separation on an Atlantis dC18 column was achieved in 10 min, under gradient conditions. The method was full validated, including linearity (2–250 ng/ml,  $r^2 > 0.99$ ), recovery (>50%), within-day and between-day precision and accuracy (CV and bias <15%), limit of detection (0.5 and 1 ng/ml) and quantitation (2 ng/ml), relative ion intensities and no matrix effect was observed. The procedure showed to be sensitive and specific, and was applied to 156 real cases from road fatalities (7.1% cases positive to cocaine and 0.6% to designer drugs).

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Drugs of abuse; LC–MS; DUID; Plasma

### 1. Introduction

Concern over driving under the influence of drugs (DUID) as a risk factor and a cause of road accidents has recently risen. Illicit drugs can influence driving performance in different ways. Opiates induce sedation, indifference to external stimuli and increase reaction time. Stimulating drugs such as cocaine, amphetamines and designer drugs (MDMA, MDEA), induce a loss of concentration and attentiveness, produce dilated pupils, which increase sensitivity to blinding by light, and the euphoric phase may lead to increased risk-taking in traffic. Cannabis can influence perception, psychomotor performance, cognitive and affective functions, and finally, hallucinogens produce hallucinations, sleepiness and psychotic reactions incompatible with safe driving [1]. However, despite this knowledge of their effects, few epidemiological and experimental data are currently avail-

able on this issue. The influence of illicit drugs on driving performance and accident risk can be derived from epidemiological studies involving analysis of biological samples of fatally injured drivers for drugs. The most relevant matrices to be analyzed for this purpose, are plasma or blood, because their concentrations correlate best with the pharmacological or toxic effects. Moreover, blood samples are mandatory in cases of DUID in most European countries and some states of the USA [2].

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) is still the most widely method of reference used, but liquid chromatography coupled single-stage or tandem mass spectrometry (LC–MS, LC–MS–MS) is becoming increasingly important for the identification and quantification of analytes [3–6], especially for the more polar, thermolabile, or low-dosed drugs, as indicated by Maurer [7].

Many LC–MS methods for the determination of drugs of abuse in plasma have been published for the determination of opiates [8–15], cocaine and its metabolites [16–19], amphetamines and designer drugs [20–23], opiates and cocaine [24–26] and opiates, cocaine and LSD [27]. However, only

\* Corresponding author. Tel.: +34 981582327; fax: +34 981580336.  
E-mail address: [apimlge@usc.es](mailto:apimlge@usc.es) (A. Cruz).

two methods for the simultaneous determination of opiates, amphetamines, benzoylecgonine and cocaine based on LC–MS/MS in oral fluid analysis [28–30] and in urine analysis [31] have been published.

We have developed and full validated, simple and low-cost LC–MS method, which includes relative ion intensity data, for the determination of morphine, 6-monoacetylmorphine (6-MAM), amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, benzoylecgonine and cocaine in plasma after solid phase extraction (SPE). In an initial attempt to obtain epidemiological data, this method has been applied to 156 road fatalities.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Morphine, 6-acetyl-morphine, D,L-amphetamine, D,L-methamphetamine, D,L-MDA, D,L-MDMA, D,L-MDEA, D,L-MBDB, benzoylecgonine, cocaine and internal standards (IS) D,L-MDMA-d<sub>5</sub>, D,L-MBDB-d<sub>5</sub>, benzoylecgonine-d<sub>3</sub> and cocaine-d<sub>3</sub> were obtained from Lipomed (Arlesheim, Switzerland) in solid form. LC–MS Chromasolv<sup>®</sup> grade acetonitrile (99.98% pure) was from Riedel de Hæn-Sigma-Aldrich Chemie (Schnelldorf, Germany). Purified water was obtained in the laboratory by using a Milli-Q water system (Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland). Methanol, formic acid (99%), ammonia solution 25%, acetic acid (glacial) 100% anhydrous, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, KCl and NaOH were from Merck (Darmstadt, Germany). Ammonium formate was from Fluka-Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Switzerland). Solid-phase extraction (SPE) cartridges OASIS<sup>®</sup> HLB (3 cc, 60 mg) were from Waters (Milford, MA, USA).

A pH 9.0 borate buffer was prepared by mixing 6.2 g of H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> and 7.5 g of KCl with 420 ml of a solution of 0.1 M NaOH, and adding water until 1000 ml. Fresh and drug-free human plasma were obtained from a local blood bank.

### 2.2. Preparation of stock solutions and standards

Individual stock solutions of the compounds were prepared in methanol, except for cocaine and its deuterated analogue, which was prepared in acetonitrile, at a concentration of 1 g/l and stored at –20 °C in the dark for a maximum of 6 months. Working solutions were monthly prepared in methanol at 100 mg/l separately for each compound, and stored in the dark at 4 °C. Daily, mixed working solutions of non-deuterated compounds at 0.008, 0.04, 0.2 and 1 mg/l, and a mixed working solution of D,L-MDMA-d<sub>5</sub>, D,L-MBDB-d<sub>5</sub> and benzoylecgonine-d<sub>3</sub> at 1 mg/l and cocaine-d<sub>3</sub> at 0.5 mg/l were prepared by appropriate dilution with methanol.

### 2.3. Specimens

Blood samples were obtained from femoral veins. The specimens were frozen at –20 °C until analysis, which was performed within 15 days.

### 2.4. Sample preparation

One milliliter volume of each sample was centrifuge for 10 min at 12,100 × *g* to remove cell debris. To 0.2 ml of supernatant were added 25 μl of a mixed working solution of IS (D,L-MDMA-d<sub>5</sub>, D,L-MBDB-d<sub>5</sub> and benzoylecgonine-d<sub>3</sub> at 1 mg/l and cocaine-d<sub>3</sub> at 0.5 mg/l), and 1 ml of pH 9.0 borate buffer in a 10 ml borosilicate tube. The calibrating standards of plasma at 0, 2, 5, 10, 25, 50, 125 and 250 ng/ml were prepared by spiking blank plasma samples with the appropriate working solution volumes.

After conditioning with 2 ml methanol and 2 ml water, the samples previously prepared were applied onto the SPE cartridges. Clean-up was accomplished with successive 2 ml washes of water–5% methanol (95:5, v/v) and a mixture water–2% NH<sub>4</sub>OH in methanol (80:20, v/v). The cartridges were dried by applying full vacuum for 10 min before elution with 2 ml of 2% acetic acid in methanol. The elution solution was evaporated to dryness at 35 °C under a stream of nitrogen. The dry extract was re-dissolved in 100 μl of a mixture of a pH 3.0 ammonium formate buffer (ammonium formate 0.002 M and formic acid 0.1%) and acetonitrile (95:5, v/v). The sample was transferred into autosampler vials, and 20 μl were injected into the LC–MS.

### 2.5. Liquid chromatography–mass spectrometry

The HPLC system was a Waters Alliance 2795 separation module with a Waters Alliance series column heater/cooler (Waters, Milford, MA, USA). Chromatographic separation was performed with an Atlantis dC18, 3 μm (100 mm × 2.1 mm i.d.) reversed-phase column. The mobile phase, delivered at a flow rate of 0.2 ml/min at 26 °C, was a gradient of acetonitrile and a pH 3.0 ammonium formate buffer, programmed as follows: 5% acetonitrile during 1 min, linearly increased to 50% in 10 min, kept that percentage for 1 min, decreased to 5% (original conditions) in 1 min and equilibrated for 4 min, which resulted in a total run time of 17 min.

The detection was performed by using a Micromass ZMD 2000 mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) fitted with a Z-spray ion interface. Ionisation was achieved by using electrospray in the positive ionisation mode (ESI+). Nitrogen was used as nebulisation and desolvation gas. To optimise ionisation and ion transmission conditions for each compound and for the IS, separately 5 μl of a 10 μg/ml solution in the mobile phase were injected without HPLC separation into the ion source. In order to obtain the highest possible intensity for quantitation and confirmation ions, fragmentation energy (cone voltage) was optimised. During this experiment, a mass range from *m/z* 100 to 400 was monitored in SCAN mode, applying different cone voltages. Acquisition was made in the selected ion-monitoring mode (SIM). For the quantitation of each compound, the protonated molecule [M + H]<sup>+</sup> was selected as the quantifier ion and one main fragment was selected as the confirmation ion. In the case of deuterated IS only the protonated molecule was selected. Table 1 summarizes the conditions for the measurement of each compound and the

Table 1  
SIR functions, time windows of SIR functions, selected ions, cone voltages, retention times and corresponding IS

Compound	SIR function	Time window SIR function (min)	Selected <i>m/z</i> ratios <sup>a</sup>	Cone voltage (V)	Retention time (min)	IS
Morphine	Funtion 1 SIR of 2 <i>m/z</i>	2.0–5.0	<b>286.0</b>	40	3.7	Cocaine-d3
			201.0	55		
Amphetamine	Funtion 2 SIR of 9 <i>m/z</i>	5.0–8.2	<b>136.1</b>	15	7	MDMA-d5
			119.0	20		
Methamphetamine			<b>150.1</b>	15	7.4	MDMA-d5
			119.0	20		
MDA			<b>180.2</b>	15	7.4	MDMA-d5
			163.2	20		
6-Acetylmorphine			<b>328.1</b>	30	7.5	MDMA-d5
			211.0	60		
MDMA			<b>194.2</b>	15	7.7	MDMA-d5
			163.2	20		
MDMA-d <sub>5</sub>			<b>199.3</b>	15	7.7	MDMA-d5
MDEA	Funtion 3 SIR of 10 <i>m/z</i>	8.0–12.0	<b>208.3</b>	20	8.3	MBDB-d5
			163.2	20		
MBDB			<b>208.3</b>	20	8.7	MBDB-d5
			177.1	25		
MBDB-d <sub>5</sub>			<b>213.3</b>	15	8.7	
Benzoylecgonine			<b>290.0</b>	20	8.6	Benzoylecgonine-d3
			168.2	25		
Benzoylecgonine-d <sub>3</sub>			<b>293.2</b>	25	8.6	
Cocaine			<b>304.2</b>	20	9.5	Cocaine-d3
			182.1	30		
Cocaine-d <sub>3</sub>			<b>307.1</b>	25	9.5	

<sup>a</sup> Quantifier ions are in bold characters.

deuterated IS. The other main parameters were: drying gas temperature 300 °C, source heater temperature 120 °C, nebulisation gas flow 500 l/h, cone gas flow 50 l/h and capillary voltage 3000 V.

Data acquisition peak integration and calculation were interfaced to a computer workstation running MassLynx NT 3.5 and QuanLynx 3.5 software.

## 2.6. Validation

The analytical validation was performed according the recommendations of Shah et al. [32] and Peters and Maurer [33].

The specificity of the method was evaluated by analysing plasma from 10 healthy non-drug-consuming subjects.

Linearity was obtained with an average determination coefficient ( $r^2$ ) > 0.99 over a range from the lower limit of quantitation (LLOQ) up to the upper limit of quantitation (ULOQ). A weighting factor  $1/x$  was used.

Within-day precision and accuracy were determined at four concentration levels (the LLOQ, the ULOQ and two intermediate levels) by preparing and analysing same day six replicates for each level. Between-day precision and accuracy were assessed by analysing on 5 different days a set of plasma samples spiked at 2, 5, 10, 25, 50, 125 and 250 ng/ml. Precision, expressed as

the coefficient of variation (CV) of the measured values, was expected to be less than 15% for all concentration levels, except for the LLOQ, for which 20% was acceptable. In the same way, accuracy was evaluated by using bias, measured as a percentage deviation from the accepted reference value, which had to be less than 15% for all concentration levels, except for the LLOQ, for which 20% was acceptable.

Lower limit of detection (LOD) was defined as the lowest concentration of the drug resulting in a signal-to-noise ratio of 3:1. LLOQ was defined as the lowest concentration yielding within-day and between-day CV and bias less than 20%.

Recoveries were determined in quintuplicate at two concentration levels (low and high) for each compound in plasma. For each concentration, five blank samples were fortified with the appropriate amount of each compound. These fortified samples and five blank samples were extracted as previously described. The dry extracts of the fortified samples were re-dissolved in 100 µl of the reconstitution solvent containing the IS, while the extracts of the blank samples were re-dissolved with 100 µl of the reconstitution solvent containing the respective nominal amounts of the compounds and the IS. The latter were used as neat standards.

The ion suppression effect on the ESI response was evaluated by using a post-column infusion system [34–36] for all

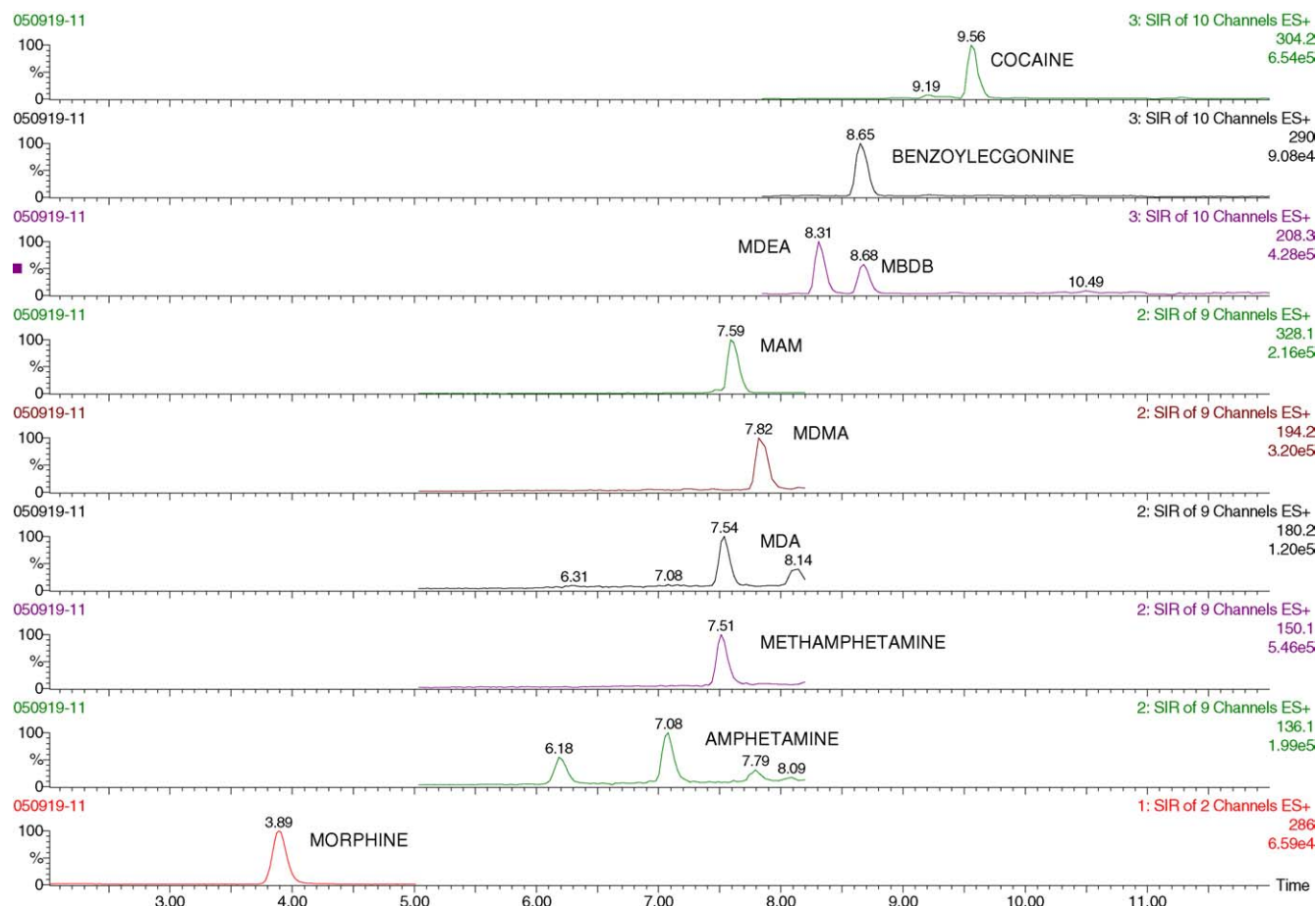


Fig. 1. LC-MS quantitative ion chromatograms of a plasma spiked at 5 ng/ml of all studied compounds.

the compounds and the deuterated internal standards. Mobile phase was delivered into the electrospray interface at a rate of 0.2 ml/min while analyte was being infused, post-column, through a Valco zero dead volume tee, by using a Harvard Appa-

ratus Model 11 (South Natick, MA, USA) syringe pump. Five different blank plasmas were extracted as previously described and reconstituted with mobile phase, 20  $\mu$ l of which were injected onto the column. Effluent from the HPLC column

Table 2  
Calibration data, recovery, within-day precision and accuracy, between-day precision and accuracy and relative ion intensities for morphine and 6-monoacetylmorphine (6-MAM)

Compound	Concentration (ng/ml)	Recovery (%)	Within-day precision and accuracy ( $n=6$ )			Between-day precision and accuracy ( $n=5$ )			Relative ion intensities ( $n=5$ )	
			Mean value	CV	Bias	Mean value	CV	Bias	Mean value	CV
Morphine	2	96	1.9	7.2	-4.2	1.7	10.3	-13.4	16	20.7
	5		4.8	8.4	-2.7	17.8	22.8			
	10		10.9	7.4	8.5	10.9	7	9.2	18.7	27.5
	25		26.1	4.3	4.6	20.5	30.2			
	50		53.5	7.1	7.1	51.9	4.3	3.8	21.1	36
	125		87.1	124.9	9.1	-0.1	20.9	33.1		
	250		246.6	4.6	-1.4	21	34			
Calibration curve ( $n=5$ ): slope = $0.2998 \pm 0.0768$ , intercept = $0.3562 \pm 0.1965$ , $r^2 = 0.9954 \pm 0.0034$										
6-MAM	2	88.8	1.9	9.5	-3.3	1.8	7.5	-11	12.1	21.4
	5		5	7.3	-0.2	11.1	4.8			
	10		10.8	4.9	7.5	10.7	5.2	7.3	11.5	9.6
	25		26.1	4.7	4.3	11.4	11.9			
	50		53	5.6	6	49.6	9.6	-0.7	11.2	16
	125		73.5	127.2	7	1.8	10.9	13.2		
	250		249.1	6.8	-0.4	246.6	3.3	-1.4	11.1	13
Calibration curve ( $n=5$ ): slope = $0.5517 \pm 0.1570$ , intercept = $1.1254 \pm 0.3899$ , $r^2 = 0.9970 \pm 0.0020$										

combined with the infused analyte and entered the electrospray interface.

Relative intensities of the detected ions were expressed as a percentage of the intensity of the quantifier ion (relative ion intensities = intensity of confirmation ion  $\times$  100/intensity of quantifier ion).

All the concentrations above the corresponding linearity ranges should be considered as “semiquantitative”, because the determination of such a high concentrations is not covered by the validated experiments. In our case, the plasma samples above the upper limit of quantitation (ULOQ) were diluted with drug-free plasma.

Carry-over effect was assayed by analyzing blank samples after a high positive sample (1000 ng/ml of each compound) and checking that in the blank samples the compounds were not detected.

### 3. Results and discussion

Deuterated analogues are commonly used as internal standards as they are essentially identical in chemical and chromatographic properties to the respective unlabelled compounds, whilst being readily distinguishable by mass spectrometry because of their mass differences. In our case MDMA-d<sub>5</sub>, MBDB-d<sub>5</sub>, benzoylecgonine-d<sub>3</sub> and cocaine-d<sub>3</sub> were chosen for this purpose. As expected, the deuterated substances eluted at the same time or a little earlier. In order to avoid cartridges clotting, samples were centrifuged before the extraction and the corresponding supernatant (0.2 ml) was diluted with a buffer (1 ml); in addition, the largest SPE cartridges were selected (3 cc instead of 1 cc cartridges).

The ion chromatograms of the 10 compounds are shown in Fig. 1. The retention times and the selected ions are reported in Table 1. Likewise, their respective optimised fragmentation voltages are shown in the same table.

Under chromatographic conditions used, there was no interference with the analytes by any extractable endogenous components of the plasma.

The linearity of the compound-to-IS peak area ratio versus the theoretical concentration was verified in plasma by using a 1/x weighted linear regression. The determination coefficients were above 0.99 and the curvature was tested on a set of five calibration curves. The within-day precision and accuracy, as well as the between-day precision and accuracy were satisfactory for all the tested concentrations. Recoveries obtained at 5 and 125 ng/ml for all compounds were >50%. These results and the relative ion intensities obtained are summarized in Tables 2–4.

The limit of detection (LOD) was 0.5 ng/ml for methamphetamine, MDMA, Benzoylecgonine and cocaine, and 1 ng/ml for morphine, 6-MAM, MDA, MDEA and MBDB. The LLOQ and ULOQ, which correspond to the lowest and highest concentration level of the calibration range, were 2 and 250 ng/ml for all the compounds.

The ion suppression effect, evaluated by the post column infusion system, was not detected in the region of interest for any compound or their deuterated analogues (Fig. 2).

Carry-over effect, tested in the previously described conditions, was not detected. Needle wash between injections was carried out with methanol.

The main advantage of using LC–MS versus GC–MS for the determination of these compounds is the non-use of derivatives, and so the whole procedure was simpler, faster and less expensive. Moreover, in the case of GC–MS methods, the simultaneous determinations of these drugs of abuse is very complex because different kinds of derivative agents have to be used for each group of compounds.

This method was applied to 156 road fatalities corresponding to 2004 and the first 6 months of 2005. Of this number,

Table 3  
Calibration data, recovery, within-day precision and accuracy, between-day precision and accuracy and relative ion intensities for benzoylecgonine and cocaine

Compound	Concentration (ng/ml)	Recovery (%)	Within-day precision and accuracy (n = 6)			Between-day precision and accuracy (n = 5)			Relative ion intensities (n = 5)	
			Mean value	CV	Bias	Mean value	CV	Bias	Mean value	CV
Benzoylecgonine	2	99.7	2	7.2	−1.6	1.9	17.1	−7.4	45.5	4.6
	5		4.98	10.9	−0.5	63.1	21.3			
	10		9.8	3.4	−2.2	10.5	5.9	5	68.2	19.4
	25	103.4	25.7	6.1	2.8	73.8	11.6			
	50		53.1	6.7	6.2	51.1	7.5	2.1	70.8	15.6
	125		121.8	4.2	−2.6	73.5	8.1			
	250		263.8	8.6	5.5	251.2	2.4	0.5	75.1	4.2
Calibration curve (n = 5): slope = 0.2256 $\pm$ 0.0928, intercept = 0.4062 $\pm$ 0.1525, r <sup>2</sup> = 0.9985 $\pm$ 0.0012										
Cocaine	2	92.7	1.9	10.3	−5.7	2	13.9	0.9	59.5	23.1
	5		4.8	4.2	−3.6	52.7	3.7			
	10		11	3	9.9	10.4	6.2	4.4	49.6	4.2
	25	83	24.7	9.5	−1.4	52.2	4.4	4.4	52.2	4.4
	50		52.3	5.5	4.6	51.3	4.4	2.5	52.3	8
	125		119.3	3.5	−4.6	51	2.8			
	250		250.8	5.2	0.3	254.5	2.8	1.8	53.3	6.1
Calibration curve (n = 5): slope = 2.7447 $\pm$ 0.8394, intercept = −0.6488 $\pm$ 2.7220, r <sup>2</sup> = 0.9978 $\pm$ 0.0019										

Table 4  
Calibration data, recovery, within-day precision and accuracy, between-day precision and accuracy and relative ion intensities for amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA and MBDB

Compound	Concentration (ng/ml)	Recovery (%)	Within-day precision and accuracy (n = 6)			Between-day precision and accuracy (n = 5)			Relative ion intensities (n = 5)	
			Mean value	CV	Bias	Mean value	CV	Bias	Mean value	CV
Amphetamine	2	72.6	2.1	6.05	3.3	1.8	4.2	-9.7	118	14
	5					5	7.4	-1.1	125.8	9
	10					10.5	6.1	4.6	140.5	12.2
	25	78.8				26.5	7.9	5.9	142.9	0
	50		54.6	2.7	9.1	52.1	4.8	4.3	147.6	7.2
	125					118.7	5.1	-5	147.6	7.2
	250		269.4	2.5	7.8	252.5	2.9	1	142.9	0
Calibration curve (n = 5): slope = 0.5927 ± 0.1173, intercept = 0.4665 ± 0.2377, r <sup>2</sup> = 0.9975 ± 0.0033										
Metamphetamine	2	86	1.9	8.2	-5.3	1.9	8.1	-5.7	51.2	5.9
	5					4.9	6.7	-1.6	54.5	5.1
	10		10.5	4.9	5.3	10.6	4.3	5.8	56.4	6.5
	25	92.3				25.9	6.4	3.5	59.1	7.7
	50		53.8	3.1	7.7	50.7	4.3	1.5	61.2	6.9
	125					118.5	6.2	5.2	61.8	2.7
	250		263.7	3.3	5.5	254.5	3.5	1.8	60.3	3.3
Calibration curve (n = 5): slope = 1.5822 ± 0.3101, intercept = 0.5984 ± 0.6689, r <sup>2</sup> = 0.9966 ± 0.0021										
MDA	2	74.2	1.8	7.5	-10.3	1.7	4.5	-14.2	195	22.9
	5					4.8	7.3	-4.5	273.3	21.4
	10		10.9	5	9.1	10.5	4.5	5.1	273.3	21.4
	25	69.8				27.3	5.5	9.3	300	15.2
	50		53.9	4.1	7.8	53.3	4.7	6.6	283.3	16.1
	125					124.9	2.7	-0.1	283.3	16.1
	250		247.2	5.1	-1.1	244.5	1.2	-2.2	290	21.5
Calibration curve (n = 5): slope = 0.2433 ± 0.0381, intercept = 0.5748 ± 0.2830, r <sup>2</sup> = 0.9985 ± 0.0006										
MDMA	2	100	1.9	8.1	-5.3	1.8	4.8	-12.3	80.2	23.6
	5					4.9	5.6	-2.9	87	21.7
	10		10.5	6	4.6	11	2.6	9.5	85.3	26
	25	78.3				25.7	4.4	2.6	93.4	19.9
	50		53.9	3	7.7	53.3	2.3	6.6	83.4	26.6
	125					120.2	4	-3.9	88.6	18.1
	250		266.9	2.4	6.8	250.3	2	0.1	92.2	13.3
Calibration curve (n = 5): slope = 0.9281 ± 0.0903, intercept = 0.7802 ± 0.5812, r <sup>2</sup> = 0.9985 ± 0.0007										
MDEA	2	92.5	2	11.2	-2.3	1.8	11	-9.1	102.6	8.4
	5					4.9	6.44	-1.9	107.2	10.3
	10		10.5	4.5	5.3	10.7	5.7	6.6	113	15.6
	25	83				25.7	5.1	2.9	107.2	10.3
	50		53.4	4.3	6.8	52.4	3	4.9	107.2	10.3
	125					120.5	2	-3.6	109.4	9.4
	250		266.1	2.6	6.4	251	1.4	0.4	111.7	7.9
Calibration curve (n = 5): slope = 0.9979 ± 0.0921, intercept = 0.6042 ± 0.1015, r <sup>2</sup> = 0.9991 ± 0.0005										
MBDB	2	83.5	1.8	5.5	-12.4	1.8	8.1	-8.7	77.2	33.4
	5					4.8	6.5	-3.2	66.7	14.1
	10		11	2.5	9.7	10.9	3.3	8.6	60.2	18.7
	25	69.7				25.7	3.5	2.7	61.6	3
	50		53.7	2.2	7.4	52.4	3.5	4.8	61.8	7.5
	125					118.3	2.3	-5.3	64.6	3.7
	250		256	2	2.4	253.1	0.8	1.2	64.7	6.9
Calibration curve (n = 5): slope = 0.6817 ± 0.0337, intercept = 0.2706 ± 0.1602, r <sup>2</sup> = 0.9985 ± 0.001										

144 cases tested negative to opiates, amphetamines and cocaine, while 11 cases tested positive to cocaine (Fig. 3) and 1 case to amphetamine derivatives, which means 7.1 and 0.6%, respectively; 57 cases (36.5%) tested positive to alcohol. Table 5 shows the more important epidemiological parameters for the positive

cases for drugs. More data should be collected for a more conclusive statistic study. Also, it would be interesting to establish whether the subjects were chronic or occasional drug consumers, since the difference in tolerance to the drugs could have a diverse influence on driving performance.



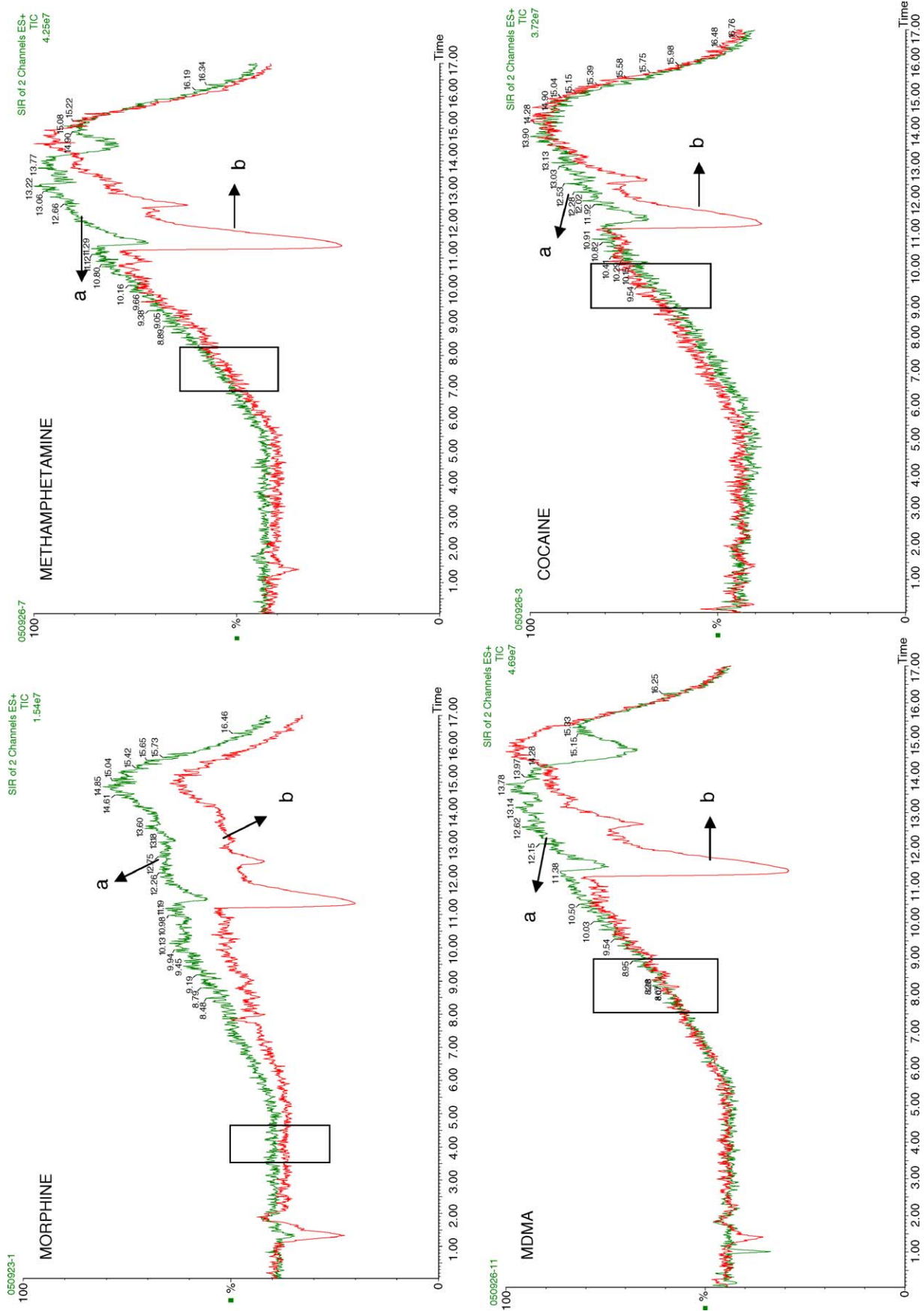


Fig. 2. Evaluation of the ion suppression effect on morphine, methamphetamine, MDMA and cocaine response by post-column infusion following a mobile phase injection (a) and an extracted blank sample (b). The dotted areas indicate the retention time for the corresponding compound.

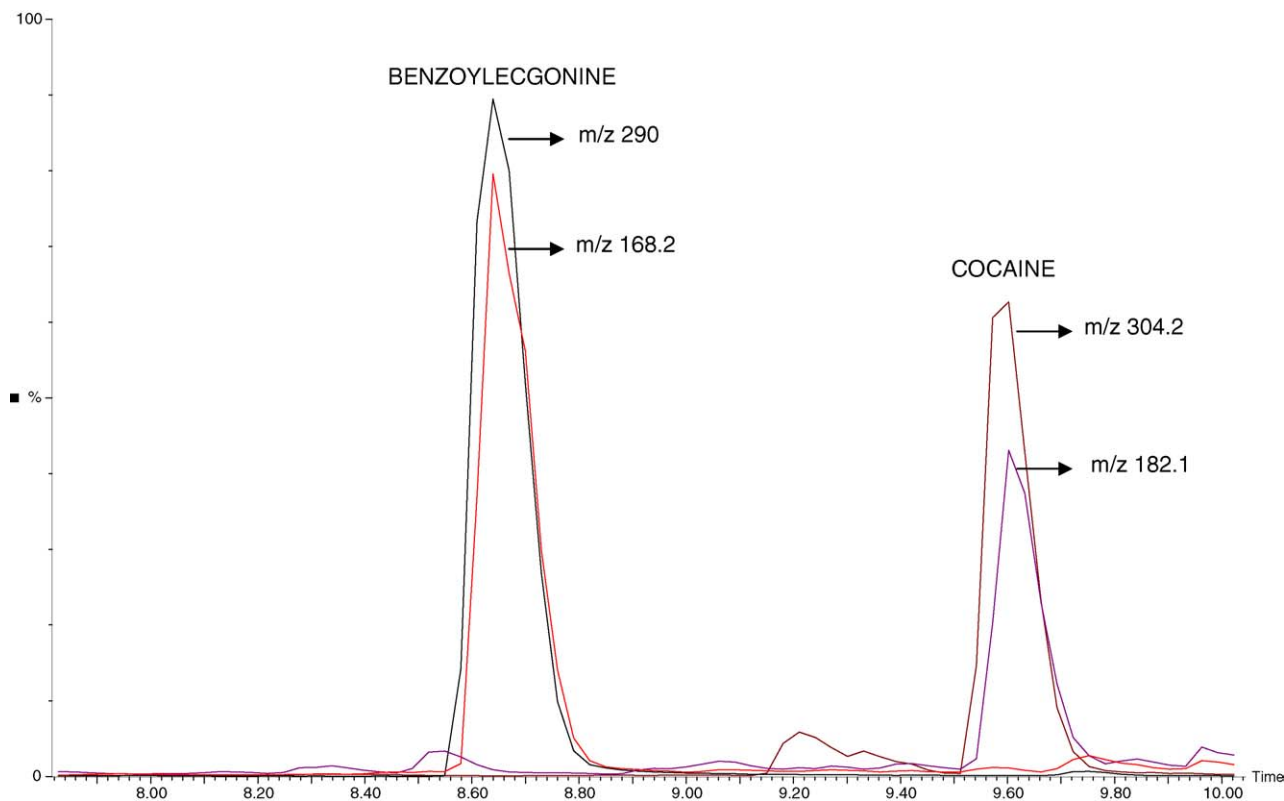


Fig. 3. LC–MS ion chromatograms of a real case from a decedent driver. The figure shows the quantifier and confirmation ion for benzoylecgonine (1041 ng/ml, semiquantitative result) and cocaine (109 ng/ml).

Table 5

Analytical results of the positive cases, indicating age, sex of the decedent, quantitative result of the corresponding drug and/or metabolite and alcohol in blood

Case (sex, age)	Drug and/or metabolite (ng/ml)	Alcohol (g/l)
1 (male, ? years)	Benzoylecgonine 47.3 ng/ml	0.2
2 (male, 19 years)	Benzoylecgonine 12.8 ng/ml	0
3 (male, 21 years)	Benzoylecgonine 38.7 ng/ml Cocaine 8.4 ng/ml	1.9
4 (male, 28 years)	Benzoylecgonine 36 ng/ml	1.7
5 (male, ? years)	Benzoylecgonine 680 ng/ml <sup>a</sup>	0
6 (female, 28 years)	Benzoylecgonine 391 ng/ml <sup>a</sup>	0
7 (male, 32 years)	Benzoylecgonine 15 ng/ml	3.2
8 (female, 26 years)	Benzoylecgonine 1600 ng/ml <sup>a</sup>	0
9 (male, 24 years)	Benzoylecgonine 1200 ng/ml <sup>a</sup> Cocaine 30 ng/ml	1.1
10 (male, 35 years)	Benzoylecgonine 1600 ng/ml <sup>a</sup> Cocaine 18 ng/ml	2.1
11 (male, 16 years)	Benzoylecgonine 1041 ng/ml <sup>a</sup> Cocaine 109 ng/ml	1
12 (male, 22 years)	Methamphetamine 6 ng/ml MDA 12.5 ng/ml	2.5

? years = unknown age.

<sup>a</sup> Semiquantitative results.

#### 4. Conclusion

A method was developed and validated for the determination of morphine, 6-MAM, amphetamine, methamphetamine,

MDA, MDMA, MDEA, MBDB, Benzoylecgonine and cocaine by LC–MS after solid phase extraction. Only 0.2 ml of plasma/blood was needed to do the analysis. The method was successfully applied to 156 road fatalities, providing important data for epidemiological studies of DUID.

#### Acknowledgements

This work was done thanks to financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (F.P.U. Grant number AP-2002-2935 and AP-2002-2878). Special thanks to Daniel González Aido, laboratory technician, for his invaluable help.

#### References

- [1] A. Verstaete, ROSITA: Roadside Testing Assessment. ROSITA Contract No. DGVII PL 98-3032, Ghent University, Ghent, Belgium, 2000, pp. 7–8.
- [2] M.R. Moeller, T. Kraemer, *Ther. Drug Monit.* 24 (2002) 210.
- [3] H.H. Maurer, *Comb. Chem. High Throughput Screen* 3 (2000) 461.
- [4] J.F. Van Bocxlaer, K.M. Clauwaert, W.E. Lambert, D.L. Deforce, E.G. Van de Eeckhout, A.P. de-Leenheer, *Mass Spectrom. Rev.* 19 (2000) 165.
- [5] P. Marquet, *Ther. Drug Monit.* 24 (2002) 225.
- [6] H.H. Maurer, *Clin. Chem. Lab. Med.* 42 (2004) 1310.
- [7] H.H. Maurer, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 110.
- [8] M.J. Bogusz, R.D. Maier, M. Erkens, S. Driessen, *J. Chromatogr. B* 703 (1997) 115.
- [9] A. Dienes-Nagy, L. Rivier, C. Giroud, M. Augsburg, P. Mangin, *J. Chromatogr. A* 854 (1999) 109.

- [10] M.H. Slawson, D.J. Crouch, D.M. Andrenyak, D.E. Rollins, J.K. Lu, J. Anal. Toxicol. 23 (1999) 468.
- [11] W. Naidong, J.W. Lee, X. Jiang, M. Wehling, J.D. Hulse, P.P. Lin, J. Chromatogr. B 735 (1999) 255.
- [12] W.Z. Shou, M. Pelzer, T. Addison, X. Jiang, W. Naidong, J. Pharm. Biomed. Anal. 27 (2002) 143.
- [13] D. Projean, T. Minh, J. Ducharme, J. Chromatogr. B 787 (2003) 243.
- [14] S.R. Edwards, M.T. Somith, J. Chromatogr. B 814 (2005) 241.
- [15] J. Bengtsson, B. Jansson, M. Hammarlund-Udenaes, Rapid Commun. Mass Spectrom. 19 (2005) 2116.
- [16] S.N. Lin, D.E. Moody, G.E. Bigelow, R.L. Foltz, J. Anal. Toxicol. 25 (2001) 497.
- [17] P.M. Jeanville, J.H. Woods, T.J. Baird, E.S. Estape, J. Pharm. Biomed. Anal. 23 (2000) 897.
- [18] K. Srinivasan, P.P. Wang, A.T. Eley, C.A. White, M.G. Bartlett, J. Chromatogr. B 745 (2000) 287.
- [19] A. Klingmann, G. Skopp, R. Aderjam, J. Anal. Toxicol. 25 (2001) 425.
- [20] M.J. Bogusz, K.D. Krüger, R.D. Maier, J. Anal. Toxicol. 24 (2000) 77.
- [21] K.A. Mortier, R. Dams, W.E. Lambert, E.A. De Letter, S.V. Calenbergh, A.P. De Leenheer, Rapid Commun. Mass Spectrom. 16 (2002) 865.
- [22] M. Wood, G. De Boeck, N. Samyn, M. Morris, D.P. Cooper, R.A. Maes, E.A. De Bruijn, J. Anal. Toxicol. 27 (2003) 78.
- [23] H.P. Hendrickson, A. Milesi-Hallé, E.M. Laurenzana, S.M. Owens, J. Chromatogr. B 806 (2004) 81.
- [24] B. Maralikova, W. Weinmann, J. Chromatogr. B 811 (2004) 21.
- [25] E.J. Rook, M.J. Hillebrand, H. Rosing, J.M. Van Ree, J.H. Beijnen, J. Chromatogr. B 824 (2005) 213.
- [26] A. Cailleux, A. Le Bouil, B. Auger, G. Bonsergent, A. Turcant, P. Allain, J. Anal. Toxicol. 23 (1999) 620.
- [27] M.J. Bogusz, R.D. Maier, K.D. Krüger, V. Kohls, J. Anal. Toxicol. 22 (1998) 549.
- [28] K.A. Mortier, K.E. Maudens, W.E. Lambert, K.M. Clauwaert, J.F. Van Bocxlaer, D.L. Deforce, C.H. Van Peteghem, A.P. De Leenhaer, J. Chromatogr. B 779 (2002) 321.
- [29] M. Wood, M. Laloup, M.M. Ramirez Fernández, K.M. Jenkins, M.S. Young, J.G. Ramaekers, G. De Boeck, N. Samyn, Forensic Sci. Int. 150 (2005) 227.
- [30] K.M. Jenkins, M.S. Young, M. Wood, 52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville, May 30–June 3, <http://www.asms.org/>.
- [31] Y. Zhang, L. Chen, G. Liu, C. Yu, V.C.X. Gao, 52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville, May 30–June 3, [www.asms.org](http://www.asms.org/).
- [32] V.P. Shah, K.K. Mida, J.W.A. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonnelli, C.T. Viswanattan, A. Jacobi, Pharm. Res. 17 (2002) 441.
- [33] F.T. Peters, H.H. Maurer, Accred. Qual. Assur. 7 (2002) 441.
- [34] R. Bonfiglio, R.C. King, T.V. Olah, K. Merkle, Rapid Commun. Mass Spectrom. 13 (1999) 1175.
- [35] Y. Hiseh, M. Chintala, H. Mei, J. Agans, J.M. Ng, K. Brisson, Rapid Commun. Mass Spectrom. 15 (2001) 2481.
- [36] C. Müller, P. Schäfer, M. Störtzel, S. Vogt, W. Weimann, J. Chromatogr. B 773 (2002) 47.



# A sensitive, rapid and specific determination of midazolam in human plasma and saliva by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry

Oscar Quintela, Angelines Cruz, Marta Concheiro, Ana de Castro and Manuel López-Rivadulla\*

Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Received 18 August 2004; Revised 8 October 2004; Accepted 8 October 2004

**A rapid, sensitive and selective liquid chromatography/electrospray mass spectrometry (LC/ES-MS) method was developed for the quantitative determination of the anaesthetic benzodiazepine midazolam (MID) in human saliva and plasma from patients undergoing anesthesia procedures. Biological samples spiked with diazepam-*d*<sub>5</sub>, the internal standard, were extracted into diethyl ether. Compounds were separated on a Xterra<sup>®</sup> RP<sub>18</sub> column using a mobile phase of acetonitrile/formic acid 0.1% at a flow rate of 0.25 mL/min under a linear gradient. Column effluents were analyzed using MS with an ES source in the positive ionization mode. Calibration curves were linear in the concentration ranges of 1–250 and 0.2–25 ng/mL in plasma and saliva, respectively. The limits of detection were 0.5 ng/mL in plasma and 0.1 ng/mL in saliva, using a 0.5-mL sample volume. The recoveries of the spiked samples were above 65%. The method was applied to ten real samples from patients undergoing midazolam treatment. Copyright © 2004 John Wiley & Sons, Ltd.**

Midazolam, 8-chloro-6-(2-fluorophenyl)-1-methyl-4*H*-imidazo[1,5-*a*][1,4]benzodiazepine, is a short-acting benzodiazepine that is used clinically for sedative purposes prior to minor medical procedures and surgery.<sup>1</sup> In humans, it has been widely used for cardiac surgery in combination with opioids and for sedation of mechanically ventilated patients, in intensive care units. Oral midazolam is commonly used for procedural sedation in children, despite the lack of a product license for the oral route of administration and a low bioavailability.<sup>2,3</sup>

The standard for drug testing in toxicology is an immunoassay screen conducted on a urine sample, followed by confirmation by gas chromatography with mass spectrometric (GC/MS) detection.<sup>4</sup> In recent years, remarkable advances in sensitive analytical techniques have enabled the analysis of drugs in unconventional biological specimens such as saliva. Whole saliva (or oral fluid (OF)) is readily collected, by non-invasive procedures, and contains serum constituents derived from the local vasculature of the salivary glands and also from the oral cavity via the flow of gingival fluid.<sup>5</sup> The levels of substances to be detected in saliva tend to be rather lower than those of the drug metabolites in urine;

thus analysis of OF is a more sensitive process. Saliva also gives a different time course of drug detection, and substances tend to be detectable in saliva for shorter periods than in urine, typically for 12–24 h after consumption.<sup>6</sup> The greatest advantage of analyzing OF is that staff can directly observe patients when they produce samples, usually by placing a collection tube or device in their mouth. This assures staff that the sample comes from the patient and the procedure is compatible with respecting patients' dignity. As a diagnostic fluid, saliva also offers distinctive advantages over serum because it can be collected non-invasively by individuals with modest training. Furthermore, saliva may provide a cost-effective approach for the screening of large populations. A disadvantage of studying OF is that people are sometimes unable to produce sufficient amounts of fluid for analysis.

The published techniques for the analysis of midazolam have mainly involved high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection,<sup>7–10</sup> GC with electron capture or nitrogen-phosphorus detection,<sup>11–13</sup> or even GC/MS using electron ionization or negative ion chemical ionization techniques.<sup>14,15</sup> The existing HPLC-UV techniques have generally shown higher limits of detection (LODs) than GC techniques. On the other hand, liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) or capillary zone electrophoresis/tandem mass spectrometry (CZE/MS/MS) techniques still require expensive instruments that are not available in most clinical and toxicological laboratories. Nevertheless, in recent years, LC/MS has rapidly matured

\*Correspondence to: M. López-Rivadulla, Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain.

E-mail: apimlrv@usc.es

Contract/grant sponsor: Secretaria Xeral de Investigación e Desenvolvemento, Xunta de Galicia, Galicia, Spain; contract/grant number: PGIDT04PXIB20801PR.

Contract/grant sponsor: EU ROSITA Project.

to become a very powerful and useful analytical tool that is widely applied in many areas of chemistry, pharmaceutical sciences and biochemistry.<sup>16</sup> In fact benchtop single-quadrupole LC/electrospray (ES) MS devices are now affordable and widely available in analytical laboratories.

The aim of the present study was to design a sensitive, specific and fully validated method using LC/ES-MS for the determination of midazolam in human plasma and saliva. This method was intended to be applied to routine therapeutic drug monitoring of patients receiving midazolam for conscious sedation purposes, or to confirm the check on site. The method was designed to permit (in the near future) the simultaneous analysis of the most commonly prescribed benzodiazepines (BDZs) with the same analytical conditions. At the moment the method is being used for the quantitation of midazolam in fluid oral samples originating from drivers who tested positive for BDZs in the European Road Site Testing Assessment (ROSITA) project, in which our group is involved, together with other European and American laboratories.

## EXPERIMENTAL

### Chemicals

Midazolam (MID) was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and diazepam-*d*<sub>5</sub> (internal standard, IS) was obtained from Cerillant<sup>®</sup> (Barcelona, Spain). Formic acid (99% pure) was obtained from Merck (Barcelona, Spain). Chromasolv<sup>®</sup> grade acetonitrile (99.98% pure) was from Riedel de Haën Sigma-Aldrich Chemie (Schnellendorf, Germany). Diethyl ether of HPLC quality was from Scharlau Multisolvent (Sentmenat, Spain). All other chemicals and solvents were of analytical grade or better. Purified water was obtained in the laboratory using a Milli-Q water system (Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland). Drug-free heparinized human plasma was obtained from the local blood bank. Drug-free oral fluid was obtained from healthy volunteers using Salivette<sup>®</sup> (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) devices.

A 0.1 M ammonium carbonate buffer (pH 9.30) was prepared by adding a 1 M ammonium hydroxide solution to 900 mL of ammonium carbonate solution (9.6 g/L) to pH 9.3 (determined using a pH meter) and making up the solution to 1000 mL with ammonium carbonate.

A pH 9.50 borate buffer was prepared by mixing 6.2 g of H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> and 7.5 g of KCl with 420 mL of a solution of 0.1 M sodium hydroxide, and adding water to a volume of 1000 mL.

### Preparation of stock solutions and standards

Stock solutions of MID and the IS were prepared at 1 g/L in methanol and were kept at -20°C in the dark for a maximum of 6 months. Each day, working solutions containing MID at 0.02, 0.1, 0.5 and 2.5 mg/L for plasma and 0.002, 0.005, 0.01, 0.1 and 0.25 mg/L for saliva were prepared by appropriate dilution with Milli-Q water. The working solutions of the IS at 1 mg/L (for plasma) and 0.4 mg/L (for saliva) were prepared by appropriate dilution with methanol.

### Sample preparation

To 0.5 mL of plasma were added 50 µL of a 1 mg/L IS solution, 0.5 mL of the pH 9.50 borate buffer and 8 mL of the

extraction solvent (diethyl ether), in a 10-mL borosilicate tube. The tubes were shaken for 15 min and then centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The organic phase (7.2–7.8 mL) was transferred to a 10-mL borosilicate tube and evaporated to dryness at 45°C under a gentle stream of nitrogen. The dry extract was redissolved in 100 µL of a mixture of formic acid 0.1%/acetonitrile (90:10, v/v). The samples were transferred into autosampler vials, and 15 µL were injected into the LC/MS system.

In the case of saliva samples, the process was quite different. To 0.5 mL of saliva were added 50 µL of a 0.4 mg/L IS solution, 0.5 mL of the 0.1 M ammonium carbonate buffer, pH 9.30, and 6 mL of the extraction solvent (diethyl ether), in a 10-mL borosilicate tube. The tubes were shaken for 15 min and then centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The organic phase (5.2–5.8 mL) was transferred to a 10-mL borosilicate tube and evaporated to dryness at 45°C under a gentle stream of nitrogen. The dry extract was redissolved in 50 µL of a mixture of formic acid 0.1%/acetonitrile (93:7, v/v), of which 15 µL were injected into the chromatographic system.

Two sets of calibration standards, one for plasma at 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 125 and 250 ng/mL, and one for saliva at 0.2, 0.5, 1, 2, 10 and 25 ng/mL of MID, were prepared with each series, by spiking blank plasma and saliva samples with the appropriate working solutions.

### Liquid chromatography/mass spectrometry

The HPLC system was a Waters Alliance 2795 (Waters, Watford, UK) separation module. Chromatographic separations were performed with an Xterra<sup>®</sup> RP<sub>18</sub>, 5 µm (150 × 2.1 mm i.d.) reversed-phase column (Waters, Milford, MA, USA). The mobile phase, delivered at a flow rate of 0.25 mL/min at room temperature, was a gradient of acetonitrile in 0.1% formic acid programmed as follows: for plasma, 10% acetonitrile during 1.5 min, increased to 72% in 14 min and decreased to 10%, i.e., original conditions, in 1 min; and, for saliva, 7% acetonitrile during 2 min, increased to 72% in 12.5 min and decreased to 7%, i.e., original conditions, in 0.5 min.

The detection was performed using a Micromass ZMD 2000 mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) fitted with a Z-spray ion interface. Ionization was achieved using electrospray in the positive ionization mode (ESI+). Nitrogen was used as nebulization and desolvation gas. To optimize ionization and ion transmission conditions of MID and the IS, 15 µL of a 10 µg/mL solution of each compound in the mobile phase were injected without HPLC separation into the ion source. In order to obtain the highest possible abundance for the quantitation and confirmation of ions, the fragmentation energy ('cone voltage') was optimized. During this experiment, a mass range from *m/z* 100–400 was monitored. Acquisition was made in the selected ion monitoring mode of positive ions, with a dwell time of 0.15 s. For the quantitation of MID the protonated molecule [M+H]<sup>+</sup> was selected as the quantitation ion and one main fragment was selected as confirmation ion. Table 1 summarizes the conditions for the measurement of MID and the deuterated IS. The other main parameter settings were: drying gas temperature 300°C, source heater temperature 115°C, nebulization gas flow 550 L/h, cone gas flow 100 L/h, and capillary voltage 3000 V.

**Table 1.** Chromatographic retention times and selected ions of midazolam and diazepam-*d*<sub>5</sub> (IS)

Compound	Retention time (min)		Selected ions ( <i>m/z</i> )	Cone voltage (V)
	Plasma	Saliva		
Midazolam	9.2	10.3	<b>326.1</b> 291.3	30 60
Diazepam- <i>d</i> <sub>5</sub>	13.2	14.3	<b>290.3</b>	40

Quantitation ions are in bold characters.

Data acquisition, peak integration and calculation were interfaced to a computer workstation running MassLynx NT 3.5 and QuanLynx 3.5 software.

### Validation

The analytical validation was performed according the guiding principles of the FDA.<sup>17</sup> Recoveries were determined in quintuplicate at concentrations of 5 and 125 ng/mL of MID in plasma, and 2 and 25 ng/mL of MID in saliva. For each concentration, five blank samples were fortified with MID and the IS and five others with the IS only. They were extracted as previously described. The dry extracts of the fortified samples were redissolved in 50 µL of reconstitution solvent, while the extracts of the blank samples were redissolved in 50 µL of reconstitution solvent containing the respective nominal amounts of midazolam. The latter were used as neat standards.

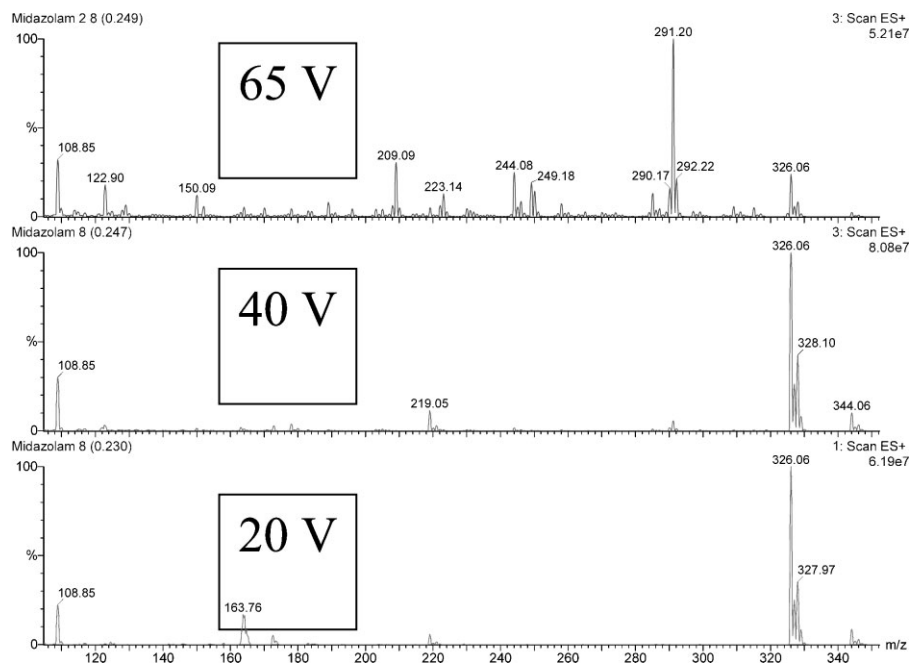
In addition the recovery from the cotton-roll of Salivette<sup>®</sup> was performed in a similar way at 1 and 25 ng/mL of MID in saliva. For each concentration, ten blank saliva samples were fortified with MID and the IS. Five samples of each concentration were absorbed with Salivette<sup>®</sup> devices, centrifuged and then extracted as previously described. The other five, directly extracted, were used as neat standards.

Within-day precision and accuracy were determined at three concentrations, the lower limit of quantitation (LLOQ),

the upper limit of quantitation (ULOQ) and an intermediate level, by preparing and analyzing on the same day six replicates for each level. Between-day precision and accuracy, as well as linearity and the lower limit of quantitation (LLOQ), were assessed by analyzing each day for six days a set of plasma samples spiked at 1, 2, 5, 10, 20, 50, 125 and 250 ng/mL and saliva samples at 0.2, 0.5, 1, 2, 10 and 25 ng/mL. Precision, expressed as the coefficient of variation (CV) of the measured values, was expected to be less than 15% at all concentrations, except for the LLOQ for which 20% was acceptable. In the same way, accuracy was evaluated using the mean relative error (MRE), which had to be less than 15% of theoretical values at each concentration level except for the LLOQ, for which 20% was acceptable. Therefore, LLOQ was defined as the lowest concentration yielding between-day precision CV and MRE each of less than 20%.

The validation of a partial or increased sample volume was carried out by diluting 1/5 additional quality controls (QCs) with a concentration five times above the ULOQ in plasma and saliva (1250 and 250 ng/mL, respectively). Five replicates of each control sample were analyzed together with a calibration curve, after appropriate dilution of the samples, with blank plasma or saliva, to the validated concentration range. The calculated concentrations of diluted QCs, when multiplied by their respective dilution factors, must fall within the defined precision and accuracy criteria for that QC.<sup>18</sup>

The specificity of the method was evaluated by analyzing plasma and saliva samples from ten healthy non-drug (BDZs and other drugs) consuming subjects. The matrix effect on the ESI response was evaluated by using a post-column infusion system.<sup>19–21</sup> Mobile phase was delivered into the ESI interface at a rate of 250 mL/min while analyte was being infused, post-column, through a Valco zero dead volume tee using a Harvard Apparatus model 11 (South Natick, MA, USA) syringe pump. Five plasma and saliva samples without MID or IS were extracted as previously described, reconstituted



**Figure 1.** Full-scan spectra of midazolam.

with mobile phase, and 15  $\mu$ L of each plasma extract were injected onto the Xterra column. Effluent from the HPLC column combined with the infused analytes and entered the ESI interface.

The method was applied to real samples from patients undergoing midazolam (MID) treatment as follows: (a) In five mechanically ventilated patients different MID doses were administered by continuous intravenous infusion, and saliva and blood samples were drawn (from an antecubital vein) during the infusion and at different times after the end of it. (b) To the other five patients a single bolus dose of 2 mg of MID was administered and blood and saliva samples were drawn at different time intervals (10, 30 and 50 min or 20, 40 and 60 min).

## RESULTS AND DISCUSSION

Internal standards are desirable when an analysis is performed by mass spectrometry. Deuterated analogues are commonly used as internal standards as they are essentially identical in chemical and chromatographic properties to the respective unlabelled compounds while being readily distinguishable by mass spectrometry because of their mass difference. In this case diazepam- $d_5$  was chosen for this purpose.

A gradient of acetonitrile was used because the method was designed to be used in the future as a BDZ screening method; nevertheless, at the moment, the method has only been validated for midazolam. The full-scan mass spectrum of MID is presented in Fig. 1. The ions selected and their respective optimized fragmentation ('cone') voltages are reported in Table 1.

Owing to the selectivity of MS, a simple, single-step liquid-liquid extraction could be used, which was revealed to be efficient in terms of purification. Plasma or saliva extracts did not show interfering peaks from endogenous substances and extraction recovery for MID was adequate (Figs. 2(a) and 2(b) and Tables 2 and 3).

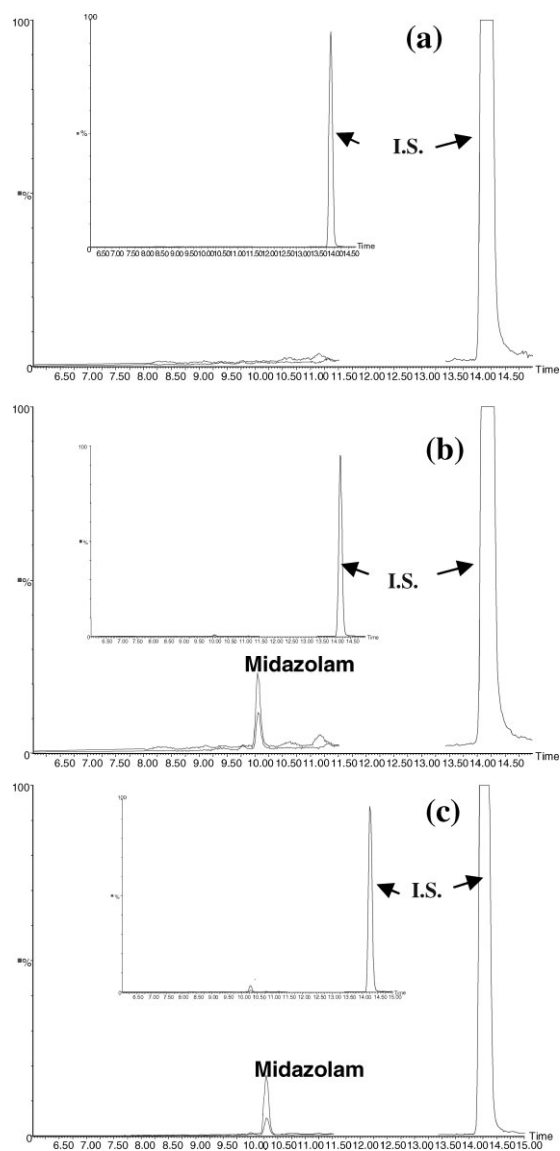
The limit of detection (LOD), defined as the lowest tested concentration yielding a signal-to-noise ratio higher than 3, was 0.5 ng/mL in plasma and 0.1 ng/mL in saliva, using a 0.5-mL sample volume.

The within-day precision, as well as the between-day precision and accuracy, were satisfactory under all the concentrations tested (Tables 2 and 3). The LOQ for midazolam deduced from between-day precision and accuracy was 1 ng/mL in plasma and 0.2 ng/mL in saliva. The linearity of the compound-to-IS peak area ratio versus the theoretical concentration was verified from this LOQ up to 250 and 25 ng/mL in plasma and saliva, respectively, using a  $1/x$  weighted linear regression. The correlation coefficients were typically better than 0.99 and the curvature, tested by analysis of variance on a set of six calibration curves, was not significant. Previously published GC/MS or LC/MS procedures have yielded lower LODs and LOQs than the present technique,<sup>22</sup> but our method uses a smaller volume of sample (only 0.5 mL) and is more sensitive than most of the HPLC or GC techniques published so far, the LODs of which are generally higher than 1 ng/mL,<sup>7-9,11,12</sup> and even more sensitive than some LC/ES-MS/MS techniques previously described.<sup>23</sup> In addition, the procedure is also adequate and

very sensitive to saliva samples with a LOQ of only 0.2 ng/mL, by also using 0.5 mL of sample.

As an alternative to the extension of the calibration curve for the measurement of concentrations which are above the highest calibration standard, the sample can be re-analyzed after dilution with blank matrix.<sup>18,24</sup> The validation of this procedure showed the following results: the 1/5 dilution of a plasma concentration of 1250 ng/mL yielded a result of 240.38 ng/mL (CV = 10.88%), while a 1/5 dilution of a saliva concentration of 250 ng/mL yielded a result of 25.95 ng/mL (CV = 1.02%). These fall within the defined precision and accuracy criteria.

Ion suppression is caused when a chemical present in the sample or in the chromatography run prevents the analyte of interest from being ionized, and therefore reduces or eliminates its signal.<sup>25-27</sup> The evaluation of this matrix effect by the post-column infusion system has the advantage of locating the region in the chromatogram influenced by matrix



**Figure 2.** Selected ion chromatograms of (a) an extract of a blank saliva sample, (b) an extract of a saliva sample spiked at 0.5 ng/mL with midazolam, and (c) an extract of a real saliva sample (measured concentration, 2.6 ng/mL).



**Table 2.** Validation results of the LC/MS determination of midazolam in plasma

Concentration (ng/mL)	Recovery (%) (n=5)	Within-day study (n=6)			Between-day study (n=6)	
		Precision CV (%)	Mean relative error (%)	Mean conc. found (ng/mL)	Precision CV (%)	Mean relative error (%)
1	72.37	2.34	-0.83	0.95	13.72	-5.00
2				1.87	8.85	-6.33
5				4.85	11.04	-3.00
10				10.2	5.87	0.18
25	73.58	3.43	8.23	26.82	6.05	7.29
50				53.45	3.26	6.89
125				130.14	3.82	4.11
250				239.91	2.79	-4.04
<b>Calibration curve</b>						
Slope			0.0049 ± 0.001			
Intercept			0.0017 ± 0.001			
Correlation			0.995 ± 0.003			

**Table 3.** Validation results of the LC/MS determination of midazolam in saliva

Concentration (ng/mL)	Recovery (%) (n=5)	Within-day study (n=6)			Between-day study (n=6)	
		Precision CV (%)	Mean relative error (%)	Mean conc. found (ng/mL)	Precision CV (%)	Mean relative error (%)
0.2	68.30	13.36	3.33	0.19	12.53	3.33
0.5				0.49	7.19	1.43
1				1.06	9.68	6.14
2				2.06	5.43	3.21
10	69.94	5.23	6.62	9.91	7.02	0.86
25				25.01	2.93	0.03
<b>Calibration curve</b>						
Slope			0.0143 ± 0.002			
Intercept			0.0021 ± 0.001			
Correlation			0.998 ± 0.001			

effects on the analyte. In this case no suppressive effect was detected in the region of interest.

The use of oral fluid as a non-invasive specimen alternative to blood as an indicator of recent drug use is particularly indicated in countries where the legislation restricts blood collection, like Spain. Nevertheless, a major problem of this type of sample collection is the difficulty in obtaining constant, or even enough volume of sample, especially in non-collaborating patients. In our study, using the Salivette<sup>®</sup> device, it was only possible to draw the adequate volume of saliva (≥0.5 mL) in less than 50% of cases (Tables 4 and 5): in 27% of cases no saliva sample was available and in 24% of cases the sample volume was not enough, so dilution with blank saliva was required. Blood samples are easier to obtain in unconscious or non-collaborating patients, and the volume can be easily checked while the sample is drawn. Another problem with saliva is the way used to obtain the sample. Basically, saliva can be collected by spitting, which is disagreeable for the subject, or by using a commercial device like the Salivette<sup>®</sup> used in this study. This latter technique is well accepted by patients but can decisively affect the results. In our study the recovery of midazolam from the cotton-roll of Salivette<sup>®</sup> was only 52.2 and 54.9% at 1 and 25 ng/mL, respectively. This means that more than 50% of the drug present in saliva remained in the cotton, which represents

another difficulty in the interpretation of saliva results: It is very risky to establish a relationship between plasma/saliva concentrations, and the real LOQ of the analytical method does not actually correspond with the LOQ in real saliva

**Table 4.** Concentrations of midazolam found in plasma and saliva after continuous infusion of the drug

Case number	Perfusion dose rate (mg/h)	Time after suspensión (h)	Plasma conc. (ng/mL)	Saliva conc. (ng/mL)
1	10		712.0	*
		48	70.94	*
		54	49.84	*
2	15		638.2	29.09
		50	25.81	<0.2
		74	18.45	0
3	20	98	0	0
		6	500.04	39.14
			471.4	31.06
4	25		154.0	19.87
		24	10.82	0.35
5	20		856.8	32.0
		25	618.8	7.45
		24	0	0
		48	0	0

\* No sample available.

**Table 5.** Concentrations of midazolam found in plasma and saliva after the administration of a single 2 mg bolus of the drug

Case number	Bolus dose (mg)	Concentration (ng/mL)	Sample extraction time (min)		
			10	30	50
6	2	Plasma	197.87	54.29	43.36
		Saliva	13.98 <sup>#</sup>	2.56 <sup>#</sup>	1.04
7	2	Plasma	282.9	140.6	51.8
		Saliva	*	*	*
			Sample extraction time (min)		
			20	40	60
8	2	Plasma	1101.74	156.7	28.19
		Saliva	1.98 <sup>#</sup>	0.57	0.57
9	2	Plasma	50.64	25.48	30.2
		Saliva	0.79 <sup>#</sup>	1.42 <sup>#</sup>	0.22 <sup>#</sup>
10	2	Plasma	308.87	26.29	15.04
		Saliva	1.73 <sup>#</sup>	2.16 <sup>#</sup>	*

\* No sample available.

<sup>#</sup> Not enough volume of sample (<0.5 mL).

samples. Further studies to evaluate the usefulness of such specimens should involve pharmacological research to determine the expected concentrations, because, at the moment, the results are still controversial. In any case the proposed analytical procedure is sensitive enough as to detect very low saliva concentrations, which permit the diagnosis of recent consumption of midazolam. Figures 2(a) and 2(b) show the chromatograms of a blank saliva and a 0.5 ng/mL of midazolam saliva sample.

The procedure described herein was applied to 57 real samples, 33 plasma samples and 24 saliva samples, from patients undergoing midazolam for sedation purposes. To one series of patients (cases 1–5) the drug was administered at high doses by continuous infusion, and blood and saliva samples were drawn at different times (Table 4). To the other series of patients (cases 6–10) a single dose of 2 mg of midazolam was administered, and saliva and blood samples were taken at shorter periods of time (Table 5). The times of sampling were variable because of the difficulty of obtaining biological samples in critical patients. As can be seen, in an important number of cases the saliva sample was inadequate. Finally, the concentrations in saliva are very variable, and in our study it was impossible to obtain a fixed relationship with plasma concentrations. Figure 2(c) shows the chromatograms of a real case of saliva extract corresponding to a concentration of 2.6 ng/mL.

## CONCLUSIONS

In summary, we have developed a simple and rapid method for midazolam (MID) quantitation in plasma and oral fluid by using LC/MS. The procedure, which involves a very simple one-step liquid–liquid extraction method, is sensitive and specific enough as to detect 0.1 and 0.5 ng/mL of MID in saliva and plasma, respectively, using only 0.5 mL of sample. It has been completely validated, including the dilution and the ion suppression effects, showing excellent results for all the parameters studied. The method was applied to real samples from patients receiving MID for sedation purposes, in order to obtain some pharmacokinetic data. Finally, it has

been validated to other common BDZs, such as diazepam, lorazepam, alprazolam, etc., by using the same chromatographic conditions. This will allow the use of this method as a screening method for BDZs. At the moment it is also being used to confirm results in the oral fluid samples originating from drivers who tested positive for BDZs in the ROSITA European Project, in which our laboratory is involved.

## Acknowledgements

This work was sponsored by the Secretaria Xeral de Investigación e Desenvolvemento, Xunta de Galicia, Galicia, Spain (grant number PGIDT04PXIB20801PR) and by the EU ROSITA project. The authors are grateful to Dr. Santiago Nogue from the Hospital Clinic of Barcelona (Spain) and Dr. Taboada from the Hospital Clínico of Santiago de Compostela (Spain) for collecting blood and saliva samples.

## REFERENCES

- Nordt SP, Clark RF. *J. Emerg. Med.* 1997; **15**: 357.
- Malinovsky JM, Populaire C, Cozian A, Lepage J-Y, Lejus C. *Anaesthesia* 1995; **50**: 351.
- Marshall J, Rodarte A, Blumer J, Khoo KC, Akbari B, Kearns G. *J. Clin. Pharmacol.* 2000; **40**: 578.
- Kintz P, Samyn N. *Ther. Drug Monit.* 2002; **24**: 239.
- Kaufman E, Lamster IB. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2002; **13**: 197.
- Cone EJ. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1993; **694**: 91.
- Lehmann B, Bouliou R. *J. Chromatogr. B* 1995; **674**: 138.
- Lee TC, Charles B. *Biomed. Chromatogr.* 1996; **10**: 65.
- Carrillo JA, Ramos SI, Agundez JAG, Martinez C, Benitez J. *Ther. Drug Monit.* 1998; **20**: 319.
- Eeckhoudt SL, Desager JP, Horsmans Y, De Winne AJ, Verbeeck RK. *J. Chromatogr. B* 1998; **710**: 165.
- De Kroon IFI, Langendijk PNJ, De Goede PNFC. *J. Chromatogr.* 1989; **491**: 107.
- Fisher LE, Perch S, Bonfiglio MF, Geers SM. *J. Chromatogr. B* 1995; **665**: 217.
- Vasiliades J, Sahawneh T. *J. Chromatogr.* 1982; **228**: 195.
- Vasiliades J. *J. Chromatogr.* 1981; **225**: 266.
- Martens J, Banditt P. *J. Chromatogr. B* 1997; **692**: 95.
- Niessen WM. *J. Chromatogr. A* 2003; **1000**: 413.
- US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services: Beltsville, MD, 2001.

18. Dadgar D, Burnett PE, Choc MG, Gallicano K, Hooper JW. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1995; **13**: 89.
19. Bonfiglio R, King RC, Olah TV, Merkle K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999; **13**: 1175.
20. Muller C, Schafer P, Stortzel M, Vogt S, Weinmann W. *J. Chromatogr. B* 2002; **773**: 47.
21. Hsieh Y, Chintala M, Mei H, Agans J, Brisson J-M, Ng K, *et al.* *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001; **15**: 2481.
22. Marquet P, Baudin O, Gaulier JM, Lacassie E, Dupuy JL, François B, Lachâtre G. *J. Chromatogr. B* 1999; **734**: 137.
23. Lausecker B, Hopfgartner G, Hesse M. *J. Chromatogr. B* 1998; **718**: 1.
24. Buick AR, Doig MV, Jeal SC, Land GS, McDowall RD. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1990; **8**: 629.
25. Hsieh Y, Chintala M, Mei H, Agans J, Brisson JM, Ng K, Korfmacher WA. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001; **15**: 2481.
26. Shou WZ, Naidong W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; **17**: 589.
27. Schuhmacher J, Zimmer D, Tesche F, Pickard V. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; **17**: 1950.



# Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología

Quintela O., Cruz A., Concheiro M., De Castro A. y López-Rivadulla M.

Instituto de Medicina Legal de Santiago de Compostela. Servicio de Toxicología Forense.  
Facultad de Medicina. C/ San Francisco, s/n. C.P. 15873, Santiago de Compostela (A Coruña)

Recibido 16 de Agosto de 2004 / Aceptado 15 de Septiembre de 2004

**Resumen:** En los últimos años el aumento de publicaciones de aplicaciones de la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) en numerosos campos analíticos, incluyendo la toxicología y las ciencias forenses, ha sido verdaderamente espectacular. Este hecho, que no deja de aumentar, se debe probablemente tanto a los avances tecnológicos de la técnica como al descenso real de los precios en torno a esta "novedosa tecnología". Es por ello que numerosos laboratorios están en disposición de adquirir una herramienta, que si bien en sus partes por separado no es desconocida (la cromatografía de líquidos, y la espectrometría de masas), unidas poseen unas características que la hacen especial, tanto en el modo de trabajar como en las aplicaciones a las que puede estar destinada.

El presente trabajo trata de abordar someramente los principios físico-químicos sobre los que se basa la particular forma de compatibilizar el líquido procedente del cromatógrafo de líquidos con un espectrómetro de masas que únicamente puede trabajar con muestras en estado gaseoso. En una segunda parte se describe las interfases de Ionización a Presión Atmosférica (API), con sus dos fuentes de ionización más representativas: Electrospray (ES), e Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI).

Ya por último se realiza una revisión de las aplicaciones de la técnica en un laboratorio de toxicología forense, en donde aparecen reflejadas las más recientes aplicaciones de la técnica, como es el caso del screening general de xenobióticos.

**Palabras clave:** Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas, ionización a presión atmosférica, drogas de abuso.

**Abstract: LC-MS Methodology. General overview and toxicological applications.** In the last few years, the increased use of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) in various analytical fields, including forensic and clinical toxicology, has been spectacular. At the moment, there is not doubt that LC-MS is competing with Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) for the status of the number one analytical technique in Toxicology. This fact is due not only to its technological advantages but also to its lower cost. This work discusses the principles of LC-MS systems, discussing new applications regarding quantitative analysis applied to drugs in different biological matrices. LC-MS, as a useful tool for screening in drug analysis, is presented as one of the best applications.

**Key words:** Liquid chromatography-mass spectrometry, atmospheric pressure ionization, drugs of abuse.

## Introducción

El acoplamiento de un detector de espectrometría de masas a un sistema de separación cromatográfica constituye una herramienta que permite que se resuelvan con las suficientes garantías los problemas de identificación y cuantificación de sustancias que habitualmente les son planteados a los toxicólogos. En efecto, cuando los detectores de masas por impacto electrónico operan en modo *scan* proporcionan una información espectral muy precisa sobre la identidad del producto, y cuando operan en modo *SIM* (modo de selección de ión) proporcionan una excelente sensibilidad con una alta especificidad, lo que posibilita el análisis cuantitativo.

Dicho acoplamiento realizado mediante una interfase comporta ciertas dificultades, que en el caso de la cromatografía de gases (GC) se resolvieron hace bastante tiempo y actualmente aparatos de GC-MS de gran fiabilidad forman parte de la instrumentación básica de los laboratorios de toxicología. Sin embargo, en el caso del acoplamiento de la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas la situación es muy diferente [1].

Los últimos diez años han supuesto un cambio importante en la investigación en el campo de la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS). Teniendo en cuenta que la investigación sobre el acoplamiento de la LC y la MS comienza a principios de los años 70, los siguientes veinte años estuvieron centrados en la resolución de problemas de este difícil acoplamiento y en la innovación tecnológica de diferentes interfases [2].

Cada interfase aplica una tecnología diferente para resolver los dos problemas principales que plantea este tipo de conexión: a) eliminar la gran cantidad de gas, y vapor procedente de la fase móvil antes de entrar a la región de alto vacío del MS; y b) transformar las moléculas en solución de la fase móvil en iones en fase gaseosa, sin que se produzca degradación térmica.

La sensibilidad del análisis por LC-MS va a depender tanto del analito de que se trate como de la interfase empleada. En este sentido, la LC-MS es una técnica adecuada para el análisis de sustancias polares, de peso molecular elevado y de sustancias termolábiles, sin tener que recurrir al proceso de derivatización

previo al análisis de las mismas que habitualmente se lleva a cabo en GC-MS [1].

No es el objeto de este trabajo analizar pormenorizadamente los diferentes tipos de interfase y sus particulares métodos de ionización, sobre todo cuando existen excelentes textos de referencia sobre esta materia [3]. El primer intento de acoplamiento de LC con MS fue descrito por Arpino y cols. en 1974 [4]. Desde entonces se han descritos en la literatura al menos 25 acoplamientos diferentes (interfases o interfases/fuentes de iones) [5] de los que al menos siete han tenido algún éxito. Dentro de las interfases "históricas", de acuerdo con la denominación de Marquet y Lachâtre [6], estarían las siguientes cinco: Direct Liquid Inlet (DLI) [4, 7], Moving belt [8, 9], Fast Atom Bombardment (FAB) [10, 11], Particle Beam (PB) [12, 13] y Thermospray (TSP) [14, 15]. Actualmente, los fabricantes de instrumentación LC-MS han optado por configurar sus equipos con dos interfases que se incluyen dentro de la denominada ionización a presión atmosférica (API), denominadas electrospray (ES) e ionización química a presión atmosférica (APCI). Estas dos últimas constituyen sin lugar a dudas las interfases que han logrado un mayor éxito analítico, lo que se ve reflejado en el gran aumento de publicaciones científicas de estos últimos años. Hoja y cols. en 1997 [1]; Marquet y Lachâtre en 1999 [6]; y Van Bocxlaer y cols. en 2000 [16], publicaron interesantes revisiones de las aplicaciones de LC-MS en el campo de la toxicología y ciencias forenses, en donde además se recoge una breve descripción también de la evolución de la tecnología hasta ese momento.

### Técnicas de ionización a presión atmosférica (API)

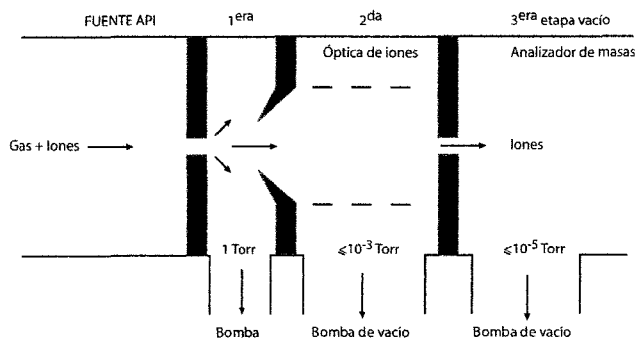
Las primeras técnicas comercializadas de LC-MS (DLI, TSP, moving belt, PB), presentaban ciertas dificultades de uso debido fundamentalmente a su baja sensibilidad y su falta de robustez. Aún así han resultado adecuadas para ciertas aplicaciones específicas, y en algunos casos concretos todavía lo siguen siendo. Sin embargo el imparable aumento de las aplicaciones de la técnica de LC-MS se debe a la introducción de una nueva interfase entre el HPLC y el MS, diferente a las mencionadas hasta el momento. Se trata de la interfase denominada API (siglas de la denominación inglesa *Atmospheric Pressure Ionization*), y que engloba a todas las técnicas en la que los iones se forman a presión atmosférica [17]

Una fuente API consta de cuatro componentes básicos [18]:

1. Dispositivo de introducción de muestra
2. Cámara de ionización, en donde se generan los iones mediante ionización por electrospray, APCI u otro mecanismo (interfase).
3. Cono de muestreo (orificio de entrada de los iones).
4. Sistema de transferencia de iones, en el que éstos son transportados hacia la región de alto vacío del MS.

Cuando una mezcla de gas y de iones es transferida desde una región a presión atmosférica hacia la región a baja presión dentro del MS experimenta un intenso enfriamiento (enfriamiento adiabático) debido a la rápida expansión de la mezcla en el vacío [19, 20]. Si al mismo tiempo se encuentran presentes en la mezcla sustancias polares y neutras (por ejemplo, agua y solventes) tiene lugar la condensación de este solvente sobre el analito, ori-

ginando lo que se conoce como *clusters*. El tamaño de los *clusters* así formados puede exceder el del rango de masas del analizador y disminuir, por tanto, la señal del analito. En todos los aparatos modernos de MS diseñados para trabajar con API, el problema de *clustering* se trata de minimizar, bien previniendo su formación, bien eliminándolos por diferentes métodos.



**Fig. 1.** Esquema general de una interfase de Ionización química a Presión Atmosférica (API) acoplada a un espectrómetro de masas. Pueden observarse las diferentes etapas de vacío que deben emplearse para pasar de presión atmosférica a un vacío aceptable para la detección por MS (adaptación de [17]).

La transmisión desde la región a presión atmosférica hasta la de alto vacío es la etapa en donde se produce la pérdida de la mayor parte del analito en los aparatos de MS actuales, por eso los fabricantes intentan mejorar la instrumentación en este aspecto, para así aumentar la sensibilidad de los equipos [21, 22]. Por tanto, el diseño tecnológico del sistema de transferencia de iones posee una importancia crucial para conseguir buenos niveles de sensibilidad. Este ha sido el objetivo de la última modificación llevada a cabo en la fuente de iones de los instrumentos de Micromass (entre los que se incluye el ZMD con el que se realizó este trabajo) y que ha consistido en el desarrollo de un sistema de transferencia de iones en forma de Z, denominado Z-spray (ver Figura 2). En este sistema los iones son extraídos, mediante un recorrido ortogonal, desde la fuente API hacia una cámara de vacío y de ésta a la región de alto vacío para su análisis de masas. Esta disposición física de la interfase proporciona una mayor sensibilidad, posibilita la eliminación de parte de los aductos formados en la cámara de ionización, y permite el uso de fosfatos en la elaboración de la fase móvil. Además facilita la eliminación de las moléculas neutras que hayan podido pasar desde el spray, para que no pasen al interior del MS, disminuyendo así el ruido de fondo.

En las técnicas API los iones formados a presión atmosférica son transportados desde la fuente a las regiones de alto vacío del analizador a través de diferentes etapas de vacío separada por diferentes lentes (ver Figura 1). En la siguiente etapa, los iones son enfocados y guiados a través de los orificios de las lentes hacia el interior del MS gracias a la aplicación de campos eléctricos adecuados.

Las principales ventajas de API propuestas por Voyksner son cuatro [23]:

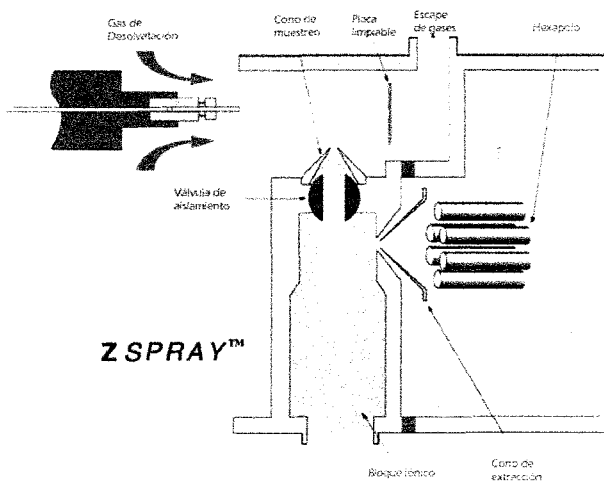


Fig. 2. Dibujo representativo de la sonda de electrospray, con diseño ortogonal que impide la entrada de gran parte de los compuestos neutros y gotas no evaporadas (modificado de Micromass).

1. El volumen de fase móvil utilizado en API se acerca más a los valores típicamente usados en LC (esto no ocurría con el resto de interfases en donde el flujo se debía reducir considerablemente).
2. Las técnicas API son adecuadas para el análisis de compuestos no volátiles, polares y termolábiles, que son los típicamente analizados por LC.
3. El acoplamiento API-MS proporciona una alta sensibilidad, ofreciendo límites de detección comparables e incluso mejores que los alcanzados con la técnica GC-MS.
4. Los sistemas API son muy estables y relativamente fáciles de manejar.

Dentro de las más recientes técnicas de API se diferencian dos modalidades básicas de interfase: ESI (*Electrospray ionization*), y APCI (*Atmospheric, Pressure Chemical Ionization*). A su vez el electrospray (ES) puede subdividirse en ES asistido neumáticamente, ES de multispray, etc., en que la principal diferencia radica en la distinta formación del spray a partir del flujo procedente del HPLC. Veamos un poco más en detalle en qué consisten estos dos tipos de interfase comúnmente usados en LC-API-MS y que se encuentran disponibles en las configuraciones de los aparatos de los diferentes fabricantes:

### Interfases de ionización química a presión atmosférica (APCI)

La primera interfase APCI para LC-MS fue desarrollada por Horning y cols. en los años 70 [24]. A partir de entonces se han sucedido diferentes diseños, algunos de los cuales han llegado a comercializarse. Utilizando la sonda de APCI el líquido que procede del LC es nebulizado y rápidamente evaporado por la acción de una temperatura elevada (300-500 °C). A pesar de que a esta temperatura teóricamente ciertos analitos pueden ser degradados, los altos flujos de gas de nebulización y de N<sub>2</sub> coaxial (también denominado gas de *make-up*), previenen la ruptura de las moléculas (pensemos además que el tiempo que per-

manecen las moléculas a una temperatura elevada es muy pequeño, sobre todo si lo comparamos con el tiempo que permanecerían en la columna cromatográfica de un CG-MS a esa misma temperatura). De esta forma los iones que están presentes en la disolución pueden pasar a fase vapor.

Para incrementar el proceso de ionización se suele aplicar una descarga en corona, del orden de 2-6 kV, justo a la salida de la sonda de APCI en el spray. Esta descarga eléctrica no sólo ioniza las moléculas de analito, sino también las del disolvente de la fase móvil. Éstas a su vez pueden transferir su carga a las de los analitos en la fase gaseosa, de lo que resulta la ionización química de los mismos.

En modo iónico positivo, se forman moléculas protonadas y aductos con cationes. En modo negativo, se forma la especie desprotonada y la combinación con aniones o la captura electrónica. En todo caso la eficacia de la ionización, si la comparamos con la CI "típica" de GC-MS, es mucho mayor al producirse a presión atmosférica, lo que incrementa enormemente la probabilidad de choques entre los iones del solvente y las moléculas de analito.

Una importante ventaja que presenta la sonda de APCI es que su flujo óptimo de trabajo es muy similar al alcanzado en la cromatografía de líquidos acoplada a los detectores tradicionales (0,7-1,2 mL/min).

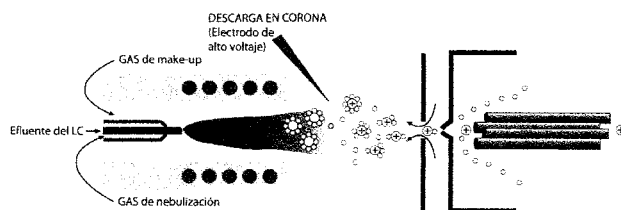


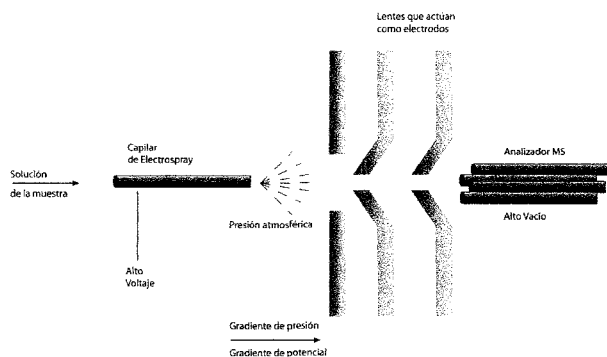
Fig. 3. Fuente de APCI-ionización química a presión atmosférica. La mezcla de líquido y vapor calientes se expande en la interfase a presión atmosférica, donde se produce una primera ionización mediante la descarga en corona. Los iones formados a partir de las moléculas del solvente transfieren su carga a los analitos, produciéndose así su ionización química.

Generalmente la sonda de APCI se utiliza para el análisis de moléculas de menos de 1000 Da, con baja o moderada polaridad. Estos analitos deben poseer además cierta volatilidad y no ser excesivamente termolábiles. Ejemplos de aplicaciones son los pesticidas, numerosos medicamentos y drogas de abuso, esteroides, PAHs...

### Interfase de tipo Electrospray (ES)

El nacimiento del acoplamiento de LC-ES-MS fue descrito en 1984 casi simultáneamente por Yamashita y Fenn [25, 26]. A partir de este momento el incremento de aplicaciones mediante el uso de esta técnica ha sido espectacular. En efecto, se trata de la técnica más extendida actualmente y la que cuenta con un mayor número de aplicaciones.

El proceso físico del electrospray se conoce desde hace bastante tiempo y es el mismo utilizado para procesos tan comunes como la producción de aerosoles para pintar, en la ciencia nuclear, en la liberación de fármacos para inhalación, etc....



**Fig. 4.** Elementos básicos que constituyen una configuración representativa de una fuente de API-electrospray.

En 1917 Zeleny [27] descubre que un alto potencial eléctrico aplicado a un capilar produce la ruptura del solvente en finos hilos que posteriormente se desintegran en pequeñas gotas, y esta es todavía la base del diseño de todas las fuentes comerciales de ESI existentes. Una modificación introducida en la mayoría de los instrumentos actuales es la aplicación de una corriente coaxial de nitrógeno para mejorar la producción del spray en situaciones de elevados caudales de fase móvil. Esta mejora, denominada "ionspray", fue introducida por Bruins y col., [28] y permite aumentar el flujo de la fase móvil por encima de los 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  sin pérdida de sensibilidad. Se han introducido posteriormente más adaptaciones con el mismo objetivo por parte de los diferentes fabricantes.

En la fuente de ESI se distinguen dos electrodos: uno es el capilar de ES y el opuesto lo constituye la entrada de la cámara de presión intermedia del MS. Los valores normales de tensión en el capilar se sitúan entre 2,5 y 3,5 kV. Es necesario mantener una diferencia de potencial en todo el recorrido que deben establecer los iones hasta el detector. La polaridad seleccionada dependerá de la carga (negativa o positiva) que posean los iones que interese analizar.

#### *Nebulización por electrospray:*

Bajo la influencia del campo eléctrico aplicado los iones de la misma polaridad migran hacia el líquido en el extremo del capilar, cuya superficie se alarga formando el denominado "cono de Taylor".

Cuando la acumulación de un exceso de iones de la misma polaridad en la superficie del líquido hace que la fuerza de repulsión columbimétrica supere a la tensión superficial del líquido, se emiten desde el capilar multitud de minúsculas gotas ( $\pm 1 \mu\text{m}$ ) cargadas de iones de la misma polaridad. Estas gotas van reduciendo su tamaño debido a fenómenos de evaporación del solvente (por efecto del gas y de la temperatura) y a la desintegración de las mismas gotas en otras de menor tamaño (3-10 nm)

capaces de producir iones en fase gaseosa. Se consigue de esa manera una ionización muy suave de los analitos que se encuentran en la fase móvil [29].

#### *Mecanismo de producción de iones en fase gaseosa:*

Existen tres modelos que describen la formación de los iones en fase gaseosa a partir de las minúsculas gotas cargadas:

- El modelo de residuo cargado, de Dole y col. [30, 31].
- El modelo de evaporación de iones, de Iribarne y Thomson [32, 33].
- Un modelo alternativo, descrito por Siu y col. [34, 35], que propone que los iones en fase gaseosa no se forman a partir de las gotitas cargadas sino que se emiten directamente desde el extremo del cono de Taylor [33, 36].

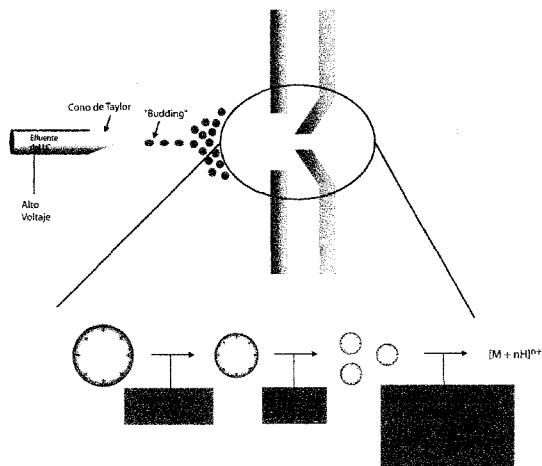
El modelo más aceptado por la comunidad científica es el de la evaporación iónica, si bien la mayoría de las observaciones se pueden explicar aceptablemente mediante los dos primeros modelos.

Kebarle y Tangref [37] observaron que la separación iónica en la punta del capilar de electrospray es electroforética y que la interfase puede ser considerada como una celda electrolítica en la que parte del transporte de la carga tiene lugar en la fase gaseosa. El proceso electroquímico esperado en la interfase líquido/metal del capilar de ES posee implicaciones analíticas, pues pueden generarse cationes a partir de moléculas neutras, permitiendo así, en ocasiones muy concretas, el uso del ES como un método verdadero de ionización, más que un procedimiento para la transferencia de fase de los iones pre-formados [38, 39, 40].

Los iones formados se "extraen" del spray gracias a la diferencia de potencial existente entre el capilar y el cono de entrada. Al entrar en la cámara de presión intermedia las moléculas neutras y los aductos iónicos del solvente son eliminados gracias a una corriente de gas en sentido contrario que impide la entrada de dichas sustancias y a la aceleración de los iones hacia la zona de baja presión del MS. Si se aumenta la aceleración de los iones (aumentando la diferencia de potencial entre los dos electrodos), se puede producir su ruptura por fenómenos de colisión con moléculas de gas residual procedente de la fase móvil y del  $\text{N}_2$  utilizado como gas de nebulización. Los fragmentos producidos mediante este fenómeno, denominado *disociación colisión-inducida* (CID, en inglés) pueden ser usados como iones de confirmación en métodos cuantitativos, o para la elucidación estructural de moléculas [41]. De hecho, la CID en la fuente de ionización proporciona los mismos fragmentos que los producidos por la CID convencional generada por la cámara de colisión de los instrumentos MS/MS [41, 6].

Una característica que diferencia a la interfase ESI de otras utilizadas en LC-MS, es que parece comportarse como un dispositivo concentración-dependiente, pues la respuesta es directamente proporcional a la concentración del analito que entra en la fuente, sin importar el flujo de fase móvil que se esté suministrando. Esta característica permite miniaturizar la técnica sin perder sensibilidad y así incrementar sus aplicaciones, lo que supone una importante ventaja. Buenos ejemplos de ello son la combinación de la espectrometría de masas a la (*Figura 5*) electroforesis capilar [42]; el desarrollo de técnicas de análisis de péptidos y proteínas con nano-ES...[43].





**Fig. 5.** Mecanismo de producción de iones en fase gaseosa cuando trabajamos mediante una fuente de electrospray (modificado de [17]).

#### Aplicaciones de la técnica de ES

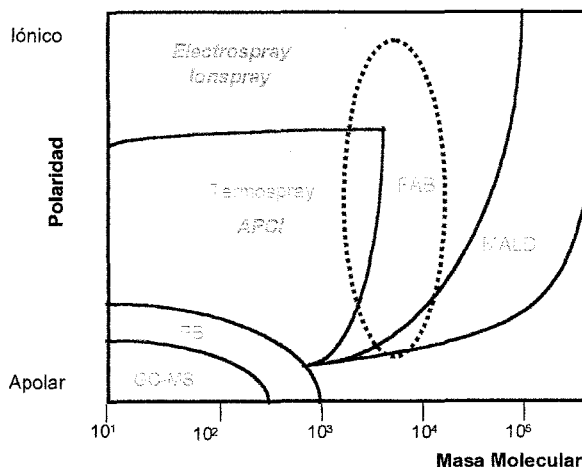
El análisis por ESI puede ser utilizado para un amplio rango de moléculas. Es posible el análisis de moléculas pequeñas y compuestos de baja polaridad capaces de ser (de)protonados o que se combinen con un anión o catión. Sin embargo, su aplicación más interesante es el análisis de moléculas de elevado peso molecular, compuestos termolábiles y biomoléculas polares como péptidos, proteínas, oligonucleótidos, etc. cuyos pesos moleculares pueden llegar a cientos de miles de amu. A diferencia de otras técnicas de ionización, en las que sólo se consiguen iones monocargados, mediante el empleo de ESI es posible obtener especies iónicas de biopolímeros multicargadas. Gracias a que los MS evalúan la relación entre la masa y la carga molecular, es posible la detección de masas moleculares muy elevadas a pesar de contar con analizadores con un rango de masas relativamente pequeño (Cuadrupolo 4000 amu; TOF 20 000 amu).

#### Figura 6

Otra de las características poco comunes de la ESI es su ionización "suave", que hace posible el análisis por impacto electrónico de estructuras poco estables por el efecto de la temperatura. La capacidad de mantener intacta la estructura molecular sin fragmentaciones posee como contrapartida un escaso valor para la elucidación estructural. Como ya se comentó anteriormente, en el caso de necesitar más información que la molecular, se debería emplear la técnica CID.

#### LC-MS en el laboratorio de toxicología: aplicaciones

Una vez planteados los aspectos relacionados con la evolución de la tecnología en LC-MS es el momento de concretar sus aplicaciones y usos en un Laboratorio de Toxicología dedicado a las aplicaciones clínicas y forenses, haciendo especial énfasis en aquellos aspectos que hacen de esta una técnica imprescindible en nuestros días. Aunque el término imprescindible pueda parecer excesivo, es a todas luces, exacto, pues esta técnica proporciona unos resultados con una gran sensibilidad, especificidad,



**Fig. 6.** Diagrama que representa la idoneidad de diferentes técnicas de análisis en función de la polaridad y de la masa molecular de los analitos. Destaca la gran versatilidad que porta la interfase de electrospray.

precisión y exactitud, difíciles de lograr con otras técnicas, cualidades todas ellas que son las que habitualmente se exigen en las distintas técnicas analíticas con aplicaciones clínicas y forenses.

Hasta el momento existen publicadas diferentes revisiones en donde se pone de manifiesto las capacidades de esta técnica en los campos de la toxicología analítica y forense [1, 44, 45, 46] y [47, 6].

Si bien la LC-MS no se puede considerar una técnica imprescindible en la determinación de los niveles de un fármaco o droga ya identificado, sí lo es cuando se requiere determinar pequeñas concentraciones de sustancias obviando los complicados y laboriosos procesos de derivatización.

Como es bien sabido, en el momento actual la identificación de un agente exógeno de naturaleza orgánica en un fluido biológico se puede realizar mediante la aplicación de un ensayo inmunológico multitest en una muestra de orina. No obstante la confirmación de un resultado positivo, necesita de la aplicación de técnicas cromatográficas como son la GC-MS o la HPLC-DAD [45]. La determinación de los niveles en sangre, permitirá en último término, efectuar la interpretación de los resultados e informar de la situación del agente en un caso concreto.

Sin embargo hay que tener en cuenta que este planteamiento tan simple presenta ciertas limitaciones, y así sólo las sustancias térmicamente estables, apolares y de bajo peso molecular podrán ser identificadas por cromatografía gaseosa; aquellas que presenten un buen coeficiente de absortividad molar podrán ser analizadas por espectrofotometría UV o por array de diodos; y las que presenten fluorescencia natural con detectores de fluorescencia, etc. Para aquellos compuestos que no presentan ninguna de estas propiedades, se hace necesario obtener agentes derivados térmicamente estables o derivados fluorescentes que faciliten su identificación, lo que supone tediosas tareas que aumentan el tiempo de preparación de la muestra.

En la década de los 90 la GC-MS ha sido la técnica por excelencia usada en la confirmación de numerosos agentes orgáni-

cos, debido a la disponibilidad de una ingente cantidad de librerías estandarizadas y especializadas en diferentes agentes tóxicos, drogas y metabolitos [48]. Se trata, además, de una técnica reproducible en todos los laboratorios de manera que es posible la obtención de un espectro de masas reproducible en cualquier equipo que aplique unas condiciones similares (normalmente ionización mediante impacto electrónico a 70 eV). Es por eso que todavía se considera el "gold Standard" para la especificidad de la detección por MS [47]. Sin embargo existen una serie de factores limitantes en su aplicación, a los que ya nos hemos referido y que han permitido incrementar las posibles aplicaciones de la LC-MS con fines confirmativos.

No obstante esta última técnica presenta, a su vez, ciertos problemas en su aplicación que es necesario analizar. Debido a que la ionización mediante impacto electrónico produce espectros de masas reproducibles, este modo de ionización es considerado el elemento clave de la especificidad en la identificación de un agente químico. Siendo la fase móvil un líquido, el primer reto para el acoplamiento LC-MS fue la transformación de los iones en fase líquida a la fase vapor, para su posterior análisis por espectrometría de masas. De las primeras interfaces desarrolladas, únicamente las de haz de partículas (PB) eran compatibles con fuentes de ionización electrónica, pero presentaban el mismo factor limitante para las moléculas termolábiles. Por tanto no presentaban ninguna ventaja adicional frente a la GC. Aún así algunos grupos de investigación elaboraron sus propias librerías de masas para centenares de compuestos [49], e incluso llegaron a comercializarlas.

En la actualidad casi ninguna empresa comercializa equipos con PB y por tanto este procedimiento ha caído en franco desuso. Los nuevos sistemas de ES y APCI han reemplazado al PB y se han impuesto como sistemas de interfase en los equipos de nuevo diseño, aunque estos sistemas son incompatibles con la ionización electrónica. Tanto ES como APCI provocan la ionización "suave" de los analitos, produciendo de forma mayoritaria los iones pseudomoleculares (M+1 o M-1). Si bien esto presenta una ventaja en cuanto a los niveles de detección alcanzados con la técnica LC-MS, no lo es tanto si pretendemos tener una selectividad importante que nos asegure que la molécula detectada como un pico cromatográfico es realmente la que sospechamos. Tal y como propone Marquet [47] esta limitación ha sido resuelta mediante el empleo del proceso denominado *Collision Ionization Dissociation* (CID). Los iones son acelerados y se produce un alto número de choques con las moléculas de gas y del solvente, que provocará la ruptura de los analitos. Los fragmentos producidos por CID nos permiten básicamente confirmar la identidad del compuesto e incluso poder diseñar y elaborar una librería para cada equipo de MS, una vez conseguida una energía de fragmentación homogénea. En efecto, mediante este proceso se origina un ión M+ y otros iones (fragmentos) de confirmación, que sólo aparecerán cuando está presente la molécula en cuestión.

Recientemente el grupo de Weinmann [50, 51, 52] y el grupo de Marquet [53, 54] han usado este proceso para elaborar sus propias librerías e identificar así tanto agentes terapéuticos como drogas de abuso. Todo este proceso incrementa notablemente las posibilidades de la LC-MS (y LC-MS/MS) y permite su aplicación al *screening* general. Actualmente existen en el mercado equipos con el diseño adecuado para obtener fragmentaciones homogéneas y casi reproducibles de unos equipos a otros. Es

aquí donde radican las mayores posibilidades de futuro desarrollo de esta técnica en sustitución de la GC-MS. Aunque se trata de un lento y laborioso proceso, las recientes y valiosas aportaciones realizadas por el grupo de Marquet, en Limoges, incluyen la elaboración de librerías para unos 1500 compuestos [53], con buenas perspectivas de reproducibilidad entre laboratorios, aunque todavía se requiere un mayor grado de coordinación entre ellos. Son varios los grupos que están trabajando en este proyecto y que a buen seguro contribuirán con su esfuerzo, y el de las propias empresas comerciales, a que las desventajas que en este momento presenta la LC-MS sean minimizadas, y harán del uso de esta técnica una necesidad en la resolución de los problemas que se plantean en el ámbito de la Toxicología. En este sentido, un reciente artículo publicado por Gergov y cols. en 2004 [55], nos muestra los satisfactorios resultados tras comparar durante un período de tres años los espectros producidos por instrumentos LC-MS/MS de tres fabricantes diferentes en laboratorios diferentes. El grado de concordancia en los resultados (medido como porcentaje de pureza del espectro de masas) se sitúa entre un 79% y 85%. Si la comparación se realiza sobre el mismo instrumento medido durante un período de cuatro años, la reproducibilidad de los iones producidos sobre una molécula aumenta hasta el 94%.

La detección de drogas y fármacos es solo una de las múltiples aplicaciones de esta técnica, pero las expectativas en el campo de la toxicología molecular para dilucidar la estructura de las dianas moleculares y de su cambios ante la presencia de un xenobiotico, son prometedoras para explicar parte de los mecanismos de toxicidad y sus causas,.

Dentro de la técnica de LC-MS el empleo de la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) ofrece una sensibilidad y especificidad superior en el análisis de las sustancias de interés, si se compara con el empleo de un solo cuadrupolo. En este tipo de aparatos, cuando se opera en modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) es posible detectar niveles de analitos muy bajos en las matrices biológicas complejas, a menudo reduciendo la preparación de la muestra y el tiempo de análisis. Además, en la actualidad existen disponibles en el mercado una gran variedad de productos análogos de drogas y medicamentos isotópicamente marcados. Esto nos permite tener los mejores compuestos para llevar a cabo nuestros procesos de estandarización y de cuantificación. La similitud en las propiedades físico-químicas de estos compuestos deuterados con respecto a sus análogos sin deuterar, parece aportar otra gran ventaja: compensa los efectos que pueda causar una menor preparación de la muestra o el efecto de supresión iónica producido por la matriz, típicas desventajas cuando trabajamos con LC-MS(MS).

Hasta la fecha, se han descrito métodos de análisis por LC-MS (y MS/MS) para la mayor parte de los grupos de drogas, incluyendo a los opiáceos y opioides sintéticos, anfetaminas, cocaína y metabolitos, cannabinoides, alucinógenos y derivados benzodiazepínicos [1, 6, 16, 56-58].

Bogusz [46] presenta una propuesta de aplicación de LC-MS en la rutina de su laboratorio de toxicología forense en Aachen. Hace una revisión de tres años de trabajo con casos reales, sobre un modo operativo consistente en tres puntos principales: un solo procedimiento de extracción en fase sólida usado para todos los compuestos básicos; fase móvil para los métodos de LC consistente en dos únicos líquidos, para facilitar el análisis

consecutivo de diferentes sustancias por diferentes métodos; y el uso de un aparato dotado de un analizador de cuadrupolo al que se acopla una interfase de tipo APCI, en modo de ionización positivo trabajando además mediante CID en la fuente.

Teniendo en cuenta las limitaciones comentadas de la LC-MS, y que no resulta todavía una técnica económica si la comparamos con la CG-MS, hoy en día un laboratorio de Toxicología Aplicada en el que se hace necesario "afinar" los resultados para establecer con el mínimo error la implicación de un agente tóxico en una muerte de significación médico-legal, en la influencia de drogas y/o fármacos en la conducción, en el medio laboral, debe de contar con un equipamiento de estas características. Esto no significa en ningún caso la sustitución de esta técnica por la de GC-MS, sino como un complemento de toda una serie de técnicas instrumentales que hacen que el Laboratorio de Toxicología sea preciso, exacto y en definitiva riguroso con los datos que proceso y con los informes que maneja, cuya repercusión es la mayoría de las veces de gran trascendencia social.

## Bibliografía

1. Hoja H, Marquet P, Verneuil B, Lotfi H, Penicaut B, Lachatre G (1997) Applications of liquid chromatography-mass spectrometry in analytical toxicology: a review. *J Anal Toxicol* 21(2): 116-126.
2. Niessen WMA (2003) Progress in Liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. *J Chromatogr A* 1000: 413-436.
3. Niessen WMA (1999) *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 2<sup>nd</sup> ed., Chromatographic Science Series, Vol. 79, Marcel Dekker, New York.
4. Arpino P, Baldwin MA, McLafferty FW (1974) Liquid chromatography-mass spectrometry II. Continuous monitoring. *Biomed Mass Spectrom* 1(1): 80-82.
5. Burlingame AL, Boyd RK, Gaskell, SJ (1994) *Mass Spectrometry Anal Chem.* 66(12): 634R-683R.
6. Marquet P, Lachâtre G (1999) Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B* 733: 93-118.
7. Esmans EL, Geboes P, Luyten Y, Alderweireldt FC (1985) Direct liquid introduction LC/MS microbore experiments for the analysis of nucleoside material present in human urine. *Biomed Mass Spectrom* 12(5): 241-5.
8. Hayes MJ, Lankmayer EP, Vouros P, Karger BL, and McGuire JM (1983) Moving belt interface with spray deposition for liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem.* 55: 1745-1752.
9. Games DE, Hirter P, Kuhnz W, Lewis E, Weerasinghe NCA, Westwood SA (1981) Studies of combined liquid chromatography-mass spectrometry with a moving-belt interface. *J Chromatogr* 203: 131-138.
10. Ito Y, Takeuchi T, Ishii D, Goto M (1985) Direct coupling of micro high-performance liquid chromatography with fast atom bombardment mass spectrometry. *J Chromatogr* 346: 161-166.
11. Shih M, Wang TC, Markey SP (1989) Evaporation device for continuous flow liquid secondary ion mass spectrometry. *Anal Chem.* 61(22) 2582-2583.
12. Winkler PC, Perkins DD, Williams WK, Browner RF (1988) Performance of an improved monodisperse aerosol generation interface for liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem.* 60(5): 489-493.
13. Willoughby RC, Browner RF (1984) Monodisperse aerosol generation interface for combining liquid chromatography with mass spectroscopy. *Anal. Chem.* 56(14): 2625-2631.
14. Vestal ML, Fergusson GJ (1985) Thermospray liquid chromatography/mass spectrometer interface with direct electrical heating of the capillary. *Anal. Chem.* 57(12): 2373-2378.
15. Blakley CR, Vestal ML (1983) Thermospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 55(4): 750-754.
16. Van Bocxlaer JF, Clauwaert KM, Lambert WE, Deforce DL, Van den Eeckhout EG, De Leenheer AP (2000) Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic toxicology. *Mass Spectrom Rev* 19: 165-214.
17. Lemièrre F (2001) Interfaces for LC-MS. LC•GC Europe. Guide to LC-MS, 2-8 (<http://www.lcgceurope.com/lcgceurope/article/articleDetail.jsp?id=8134>).
18. Niessen WMA (1999) *Electrospray Interfacing*, en: Niessen WMA, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 2nd ed, Chromatographic Science Series, Vol. 79, Marcel Dekker, New York. pp. 288.
19. Bruins AP (1997) ESI source design and dynamic range considerations, en: Cole RB, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Fundamentals, Instrumentation & Applications*. Wiley-Interscience, New York. pp. 107-136.
20. Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn, JB (1985) *Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers*. *Anal. Chem.* 57(3): 675-679.
21. Bökman, CF (2002) *Analytical Aspects of Atmospheric Pressure Ionisation in Mass Spectrometry*. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology. 748.
22. Jennings, KR, Dolnikowski, GG (1990) Mass analyzers. *Meth. Enzymol.* 193: 37-61.
23. Voyksner RD (1997) *Combining Liquid Chromatography with Electrospray Mass Spectrometry*, en: Cole RB, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications*. Wiley- Interscience, New York. pp. 223-242.
24. Horning EC, Carroll DI, Dzidic I, Haegele KD, Horning MG, Stillwell RN (1974) Liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical systems. Continuous flow system based on atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *J Chromatogr* 99: 13-21.
25. Yamashita M, Fenn JB (1984) Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* 88: 4451-4459.
26. Yamashita M and Fenn JB (1984) Negative ion production with the electrospray ion source. *J. Phys. Chem.* 88: 4671-4675
27. Zeleny J (1917) Instability of Electrified Liquid Surfaces. *Phys Rev* 10: 1-6.
28. Bruins AP, Covey TR, Henion JD (1987) Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 59: 2642-2646.
29. Niessen WMA (1999) *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 2nd Ed, Marcel Dekker, New York. pp. 314.
30. Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB (1968) Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.* 49(5): 2240-2249.
31. Gieniec J, Mack LL, Nakamae K, Gupta C, Kumar V, Dole M (1984) Electrospray mass spectroscopy of macromolecules: application of an ion-drift spectrometer. *Biomed Mass Spectrom* 11(6): 259-268.
32. Iribarne JV, Thomson BA (1976) On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* 64(6): 2287-2294.
33. Iribarne JV, Dziedzic PJ, Thomson BA (1983) Atmospheric pressure ion evaporation-mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom Ion Process Phys.* 50(3): 331-347.

34. Guevremont R, Siu KWM, Le Blanc JCY, Berman SS (1992) Are the electrospray mass spectra of proteins related to their aqueous solution chemistry?. *J Am Soc Mass Spectrom* 3(3): 216-224.
35. Siu KWM, Guevremont R, Le Blanc JCY, O'Brien RT, Berman SS (1993) Is droplet evaporation crucial in the mechanism of electrospray mass spectrometry?. *Org Mass Spectrom* 28(5): 579-584.
36. Thomson BA, Iribarne JV (1979) Field-induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *J. Chem. Phys.* 71(11): 4451-4463.
37. Kebarle P, Tang L (1993) From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 65(22): 972A-986A.
38. Xu X, Nolan SP, Cole RB (1994) Electrochemical oxidation and nucleophilic addition reactions of metallocenes in electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 66: 119.
39. Van Berkel GJ, Zhou F (1994) Chemical Electron-Transfer Reactions in Electrospray Mass Spectrometry: Effective Oxidation Potentials of Electron-Transfer Reagents in Methylene Chloride. *Anal. Chem.* 66: 3408.
40. Van Berkel GJ, Zhou FM (1995) Characterization of an Electrospray Ion Source as a Controlled-Current Electrolytic Cell. *Anal. Chem.* 67: 2916.
41. Niessen WMA. (1999) Electrospray Interfacing, en: Niessen WMA., *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 2nd ed, Marcel Dekker, New York. pp. 297-298.
42. Edmonds CG, Loo JA, Barinaga CJ, Udseth, HR; Smith RD (1989) Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *J Chromatogr* 474: 21-37.
43. Larsen, McEwen CN (1998) *Mass Spectrometry of Biological Materials*. B.S, Marcel Dekker Inc, New York, USA.
44. Maurer HH (1998) Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B Biomed Sci. Appl.* 713(1): 3-25.
45. Thieme D, Sachs H (2003) Improved screening capabilities in forensic toxicology application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim. Acta* 492: 171-186.
46. Bogusz MJ (2000) Liquid chromatography-mass spectrometry as a routine method in forensic sciences: a proof of maturity. *J Chromatogr B Biomed Sci. Appl.* 748(1): 3-19.
47. Marquet P (2002) Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Ther. Drug Monit.* 24(2): 255-276.
48. Pfiieger K, Maurer HH, Weber A eds. (2000) *Mass Spectral Library of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites*. 3d ed. Agilent. Technologies, Palo Alto, USA.
49. Spratt E, Vallaro GM (1998 Dec) LC/MS with a particle beam interface in forensic toxicology. *Clin. Lab Med* 18(4): 651-663 viii.
50. Weinmann W, Wiedemann A, Eppinger B, Renz M, Svoboda M (1999) Screening for drugs in serum by electrospray ionization/collision-induced dissociation and library searching. *J Am Soc Mass Spectrom* 10(10): 1028-1037.
51. Weinmann W, Lehmann N, Muller C, Wiedemann A, Svoboda M (2000) Identification of lorazepam and sildenafil as examples for the application of LC/ionspray-MS and MS-MS with mass spectra library searching in forensic toxicology. *Forensic Sci. Int.* 113(1-3): 339-344.
52. Weinmann W, Stoertzel M, Vogt S, Wendt J (2001) Tune compounds for electrospray ionisation/in-source collision-induced dissociation with mass spectral library searching. *J Chromatogr A* 926(1): 199-209.
53. Saint-Marcoux F, Lachatre G, Marquet P (2003) Evaluation of an improved general unknown screening procedure using liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry by comparison with gas chromatography and high-performance liquid-chromatography-diode array detection. *J Am Soc Mass Spectrom* 14(1): 14-22.
54. Venisse N, Marquet P, Duchoslav E, Dupuy JL, Lachatre G (2003) A general unknown screening procedure for drugs and toxic compounds in serum using liquid chromatography-electrospray-single quadrupole mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 27(1):7-14.
55. Gergov M, Weinmann W, Meriluoto J, Uusitalo J, Ojanpera I (2004) Comparison of product ion spectra obtained by liquid chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry for library search. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18(10): 1039-1046.
56. Concheiro, M., De Castro, A., Quintela, O., Cruz, A., López-Rivadulla, M. (2004) Development and validation of a method for the quantitation of  $^9\Delta$ Tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography electrospray-mass-spectrometry. *Journal of Chromatography B* 810: 319-324.
57. Quintela, O. Cruz, A, Concheiro, M. De Castro, A y López-Rivadulla, M. (2004). A sensitive, rapid and specific determination of midazdam in human plasma and saliva by liquid chromatography electrospray-mass-spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18: 2976-2982.
58. Quintela, O. Cruz, A, De Castro, A, Concheiro, M. y López-Rivadulla, M. (2004). Liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry for the determination of nine selected benzodiazepines in human plasma and oral fluid. *J Chromatogr B Biomed Sci. Appl.* (en prensa).

**CONFIRMATION BY LC-MS OF DRUGS IN ORAL FLUID  
OBTAINED FROM ROAD SIDE TESTING**

Marta Concheiro, Ana de Castro, Óscar Quintela, Angelines Cruz, Manuel  
López-Rivadulla\*

Forensic Toxicology Service. Institute of Legal Medicine.

University of Santiago de Compostela. Spain.

C/ San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain.

\*Corresponding author. Tel.: +34 981582327

Fax: +34 981580336

E-mail address: [apimlrv@usc.es](mailto:apimlrv@usc.es)

## **Abstract**

The aim of this study was to assess the effectiveness of two current onsite oral fluid drug detection devices (OraLab and Dräger), as part of the Spanish participation in the Roadside Testing Assessment Project (ROSITA Project). The study was done in collaboration with the Spanish Traffic Police, in Galicia (NW Spain), during 2004 and 2005. A total of 468 drivers selected at the police controls agreed to participate through informed consent. In addition, saliva samples were collected and sent to the Laboratory to confirm the onsite results. For this purpose, two different analytical LC-MS methods were used to detect 11 drugs or metabolites in a 300  $\mu$ L sample. Simultaneous analysis of morphine, 6-monoacetylmorphine, amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, cocaine and Benzoyllecgonine was carried out using 100  $\mu$ L of oral fluid, after an automated solid phase extraction. A different LC-MS method was performed to detect  $\Delta^9$ -THC in 200  $\mu$ L of oral fluid using liquid-liquid extraction with hexane at pH = 6. Both methods were fully validated, including linearity (1-250ng/mL, 2-250ng/mL) recovery (>55%), within-day and between-day precision (CV<15%), accuracy (MRE<15%), limit of detection (0.5 and 1ng/mL), quantitation (1 and 2ng/mL) and matrix effect. All of the positive cases and 30% of the negative were analyzed for confirmation analysis. Good results (sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value and negative predictive value > 90%) were obtained for cocaine and opiates by OraLab, and for cocaine by Dräger. However, the results for the other compounds could be improved for both detection devices. Differences in the ease of use and in the interpretation mode (visual or instrumental) were observed.

**Keywords:** LC-MS, oral fluid, drugs of abuse, roadside test.

## **1. Introduction**

Recently, concern about driving under the influence of drugs (DUID) as a risk factor and a cause of road accidents has risen. Illicit drugs can possibly influence driving performance in different ways: opiates induce sedation, indifference to external stimuli and increase reaction time; stimulants such as cocaine, amphetamines and designer drugs (MDMA, MDEA), induce a loss of concentration and attentiveness. Also, dilated pupils increase sensitivity to brightness, and euphoria may lead to increased risk-taking in traffic; cannabis can influence perception, psychomotor performance, cognitive and affective functions [1].

Oral fluid (OF), which contains saliva and other fluids and substances present in the oral cavity, is considered as the main alternative matrix to blood for detecting recent use of medicines or drugs of abuse [2]. Substances tend to be detectable in OF for short periods, typically for 12-24 h after consumption [3]. The main advantages of OF are non invasive sample collection and staff can directly observe patients when they produce the samples, usually by placing a collection tube or device in their mouth; this assures staff that the sample comes from the patient and the procedure respects the patients' dignity. The disadvantage of OF is that people are sometimes unable to produce sufficient amounts of fluid for analysis.

The ROSITA (Roadside Testing Assessment) project was an initiative of the European Commission to evaluate the value of roadside tests of oral fluid. The first part of the ROSITA (ROSITA 1) took place in 1999 and 2000 [4], and the second part (ROSITA 2) from 2003 to 2005. Different devices were assigned to each of the participating countries for testing purposes. In this study for the

ROSITA 2 project, the effectiveness of two on-site drug detection devices (OraLab and Dräger) were assessed, and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) methods for the confirmation analysis were developed using only 300µL of OF. In the literature, methods for the determination of amphetamines, cocaine and opiates [5, 6], and for the determination of THC [7, 8, 9, 10] in oral fluid by LC-MS were found.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Roadside controls*

The study was conducted in Galicia (NW Spain), in places near discotheques or raves, by teams composed of forensic toxicologists working in collaboration with traffic police. The controls were carried out at weekends (Friday and Saturday night, between 2 to 8 a.m.) from November 2004 until July 2005. The selection of drivers was random and always carried out by the traffic police. The control was voluntary, and drivers could refuse to participate. The test was performed by the officers only on those who had agreed by giving their oral and written consent. Additionally, an extra OF sample for confirmation analysis was collected by the research personnel.

### *2.2. Oral fluid samples*

The oral fluid samples for confirmation analysis were collected by spitting into 10mL polypropylene tubes. The samples were centrifuged for 10 min at 12100 x g and stored frozen at -20°C prior to analysis. All the positives cases and 30% of the negative ones were analyzed.

### *2.3. The on-site devices*

All the traffic police officers had received prior instruction on the characteristics and deployment of the devices from the scientific staff of the manufacturers.



### *2.3.1. The on-site Varian OraLab test*

The on-site Varian OraLab test (Lake Forest, CA, USA) is a simple, qualitative assay that detects recent drug use in oral fluid. It consists of two components: the collection device and the test cassette. Its container automatically splits the specimen, using half for immediate drug-of-abuse testing and storing the remaining sample for confirmation testing, if required. In order to collect oral fluid, the collector foam is placed inside the mouth for three minutes, until it is completely saturated with saliva. The OraLab cassette has to be placed on a flat surface. The collector foam is placed vertically into the sample well on top of the device, and the collector is pushed slowly and firmly downward until it comes to a stop. Saliva flows directly into the test cassette. The right band of the cassette allows the detection of methamphetamine and THC, and the left band detects cocaine, morphine and amphetamine. Test validity and results must be interpreted between 10 and 15 minutes after initiating the test, when a rose line appears in the valid test window. If the test is positive a rose line appears next to the drug name, and if it is negative no line is shown. The drugs detected and the cut-offs according to manufacture are: morphine (40ng/mL), cocaine (20ng/mL), d-amphetamine (50ng/mL), d-methamphetamine (50ng/mL) and THC (100ng/mL).

### *2.3.2. The on-site Dräger Drug test*

The on-site Dräger Drug test (Lübeck, Germany) is also an immunoassay for the detection of drugs in oral fluid. The device consists of three pieces (the collection device, the buffer cartridge and the cassette), and the analyzer. The collection device is inserted between the cheek and the gum and swabbed side to side in the mouth until the collector is saturated. After that, it is necessary to

strictly follow the instructions for use of the device: the buffer cartridge is inserted into the lower groove of the test cassette by aligning the lower tabs on the cartridge with notches on the cassette. The buffer cartridge cap is rocked and removed. The sample collection device is inserted into the buffer cartridge and pressed down on the sample collection device. The handle of the sample collection device is removed by means of an anticlockwise quarter turn. The buffer cartridge is closed and it incubates for 4 min. Then, the buffer cartridge is turned clockwise until the upper groove is positioned above the groove of the test cassette. The buffer cartridge is pushed down firmly until the cartridge wings touch the edge of the cassette. The fluid is allowed to develop for 8 min. After that time, the cassette is inserted into the analyzer, which finally reports the results (as positive or negative) on the screen in 4 min. The drugs detected and the cut-offs according to manufacture are: opiates (40ng/mL), cocaine (5ng/mL), amphetamine (50ng/mL), methamphetamine (10ng/mL) and THC (20ng/mL).

#### *2.4. Analysis of oral fluid*

All analytical procedures regarding confirmation process of drugs involved in the project were done by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS). Two methods were developed, one for the simultaneous determination of morphine, 6-monoacetylmorphine (6-MAM), amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, cocaine and benzoylecgonine, and another one for the detection of  $\Delta^9$ -THC, using a total of 300 $\mu$ L of oral fluid.

For both methods, liquid chromatography was performed using a Waters Alliance 2795 separation module with a Waters Alliance series column

heater/cooler (Waters, Milford, MA, USA), and the detection was performed using a Micromass ZMD 2000 mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) fitted with a Z-spray ion interface. Ionisation was achieved using electrospray in the positive ionisation mode (ESI+). Nitrogen was used as nebulisation and desolvation gas. The optimal MS parameters chosen were: drying gas temperature 300°C, source heater temperature 120°C, nebulisation gas flow 500 L/h, cone gas flow 50 L/h, and capillary voltage 3500 V for THC and 3000 V for the other compounds. Data acquisition peak integration and calculation were interfaced to a computer workstation running MassLynx NT 3.5 and QuanLynx 3.5 software.

The detection of  $\Delta^9$ -THC in oral fluid samples was performed according to a published validated procedure [7]. The chromatographic separation was carried out using an XTerra MS C<sub>18</sub> column (2.1x100mm, 3.5 $\mu$ m) at 26°C, eluted in isocratic mode using 0.1% formic acid in acetonitrile (15:85), and delivered at a flow rate of 0.25mL/min. A liquid-liquid extraction in the presence of its deuterated analogue  $\Delta^9$ -THC-d<sub>3</sub> (25 $\mu$ L at 1  $\mu$ g/mL) was employed. 200 $\mu$ L of oral fluid were mixed with 1mL of pH 6 phosphate buffer, and with 5mL of hexane in a 10mL borosilicate glass tube.

A published validated procedure for the detection of morphine, 6-MAM, amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, cocaine and benzoylecgonine in plasma [11] was used for the detection of these compounds in oral fluid. The chromatographic separation was achieved with an Atlantis dC<sub>18</sub> column (2.1x100mm, 3 $\mu$ m) at 26°C. The mobile phase, delivered at a flow rate of 0.2mL/min, was a gradient of acetonitrile and pH 3 ammonium formate buffer, programmed as follows: 5% acetonitrile during 1 min, linearly increased to 50%

in 10min, kept that percentage for 1 min, decreased to 5% in 1 min (original conditions), and equilibrated for 4 min, which resulted in a total run time of 17 min.

The extraction procedure was an automated solid phase extraction, using OASIS ® HLB cartridges (3cc, 60 mg) Waters (Milford, MA, USA) and Gilson AspecXL solid phase extraction (Villiers Le Bel, France). To 100µL of oral fluid, 50µL of a mixed working solution of internal standards, IS (d,l-Methamphetamine-d<sub>5</sub>, d,l-MDMA-d<sub>5</sub>, d,l-MBDB-d<sub>5</sub>, benzoylecgonine-d<sub>3</sub> and cocaine-d<sub>3</sub> at 0.1mg/L) were added, and 1mL of pH 9.0 borate buffer in a 3mL borosilicate tube. After conditioning with 2mL methanol and 2mL water, the samples were loaded onto the SPE cartridges. Clean-up was accomplished with successive 2mL washes of water-5% methanol (95:5, v/v) and a mixture of water-2%NH<sub>4</sub>OH in methanol (80:20, v/v). The cartridges were dried for 5 min before elution with 2mL of 2% acetic acid in methanol. The elution solution was evaporated to dryness at 35°C under a stream of nitrogen. The dry extract was re-dissolved in 100µL of a mixture of a pH 3.0 ammonium formate buffer and acetonitrile (95:5, v/v), and 20µL were injected into the LC-MS.

#### *2.5. Validation of the analytical method*

The analytical method validation was performed according the recommendations of Shah [12] and Peters [13]. The specificity of the method was evaluated by analysing oral fluid from 10 healthy non-drug-consuming subjects. Linearity was obtained with an average coefficient of determination ( $r^2$ ) > 0.99 over a range from the lower limit of quantitation (LLOQ) up to the upper limit of quantitation (ULOQ). A weighting factor 1/x was used. Within-day and between-day precision and accuracy were determined at four concentration

levels (the LLOQ, the ULOQ and two intermediate levels) by preparing and analysing for each level six replicates on the same day and on six different days. Precision, expressed as the coefficient of variation (CV) of the measured values, was expected to be less than 15% for all concentration levels, except for the LLOQ, for which 20% was acceptable. Similarly, accuracy was evaluated by using mean relative error (MRE), measured as a percentage deviation from the accepted reference value, which should be less than 15% for all concentration levels, except for the LLOQ, in which case 20% was acceptable.

The limit of detection (LOD) was defined as the lowest concentration of the drug resulting in a signal-to-noise ratio of 3:1. LLOQ was defined as the lowest concentration yielding within-day and between-day CV and MRE less than 20%. Recoveries were determined in quintuplicate at two concentration levels (low and high) for each compound in oral fluid. For each concentration, five blank samples were fortified with the appropriate amount of each compound. These fortified samples and five blank samples were extracted as previously described. The dry extracts of the fortified samples were re-dissolved in 100 $\mu$ L of the reconstitution solvent containing the IS, while the extracts of the blank samples were re-dissolved with 100 $\mu$ L of the reconstitution solvent containing the respective nominal amounts of the compounds and the IS. The latter were used as neat standards.

The ion suppression effect on the ESI response was evaluated according to the next procedure [14]: nine drug-free oral fluid samples from different sources were extracted as described previously. The extracts were then fortified with all drugs at a concentration of 50ng/mL. Three reference solutions in mobile phase were also fortified with all drugs to the same nominal concentration. The

reconstituted extracts and the reference solutions were injected into the LC-MS. Peak areas obtained from the extracts were compared with the corresponding peak areas produced by the reference solutions. The ion suppression percentage was calculated as follows:  $(\text{mean peak area "reconstituted extract in oral fluid"} - \text{mean peak area "reference solution"}) \times 100 / \text{mean peak area "reference solution"}$ . The oral fluid samples above the ULOQ (Upper Limit of Quantitation) were diluted with drug-free oral fluid.

#### *2.6. Device results analysis*

Comparing the device results and the laboratory results, and bearing in mind the cut-offs given by manufactures, the following parameters were calculated: true negatives (TN; number of confirmed device negative cases/total number of negative cases); true positives (TP; number of confirmed device positive cases/total number of positive cases); false negatives (FN; number of device negative cases confirmed as positives/total number of negative cases) and false positives (FP; number of device positive cases confirmed as negative/total number of positive cases).

From these 4 categories, the following characteristics were calculated: sensitivity, true positives expressed as percent of all positives,  $TP/(TP+FN)$ ; specificity, true negatives expressed as percent of all negatives,  $TN/(TN+FP)$ ; positive predicted value, percent of samples with positive results who are true positives,  $TP/(TP+FP)$ ; negative predicted value, percent of samples with negative results who are true negatives,  $TN/(TN+FN)$ ; and accuracy, percent of all samples correctly classified by the tests,  $(TP+TN)/(TP+TN+FP+FN)$ . The ROSITA criteria for a good screening test were: sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value  $\geq 90\%$ , and accuracy  $\geq 95\%$  [15].

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Validation of the method for the determination of amphetamines, cocaine and opiates in oral fluid

The application of the plasma method [11] to oral fluid samples required a new validation. The ion chromatograms of the ten compounds are shown in Fig. 1, and the retention times and the selected ions are reported in Table 1. Likewise, their respective optimised fragmentation voltages are shown in the same table. Under the used chromatographic conditions, there were no interferences with the analytes by any extractable endogenous components of the oral fluid.

The linearity of the compound-to-IS peak area ratio versus the theoretical concentration was verified in oral fluid by using a  $1/x$  weighted linear regression. Linearity was from 1 to 250ng/mL for amphetamine, methamphetamine, MDEA, MBDB, cocaine and benzoylecgonine, and from 2 to 250ng/mL for morphine, 6-MAM, MDA and MDMA. The coefficients of determination were above 0.99 and the curvature was tested on a set of six calibration curves. The within-day precision and accuracy, as well as the between-day precision and accuracy were satisfactory for all the tested concentrations (LLOQ, ULOQ, 10 and 50ng/mL). The CV for the within and between-day precision were between 0.7-14% and 2.1-14.4%, respectively. The MRE for the within and between day accuracy were between 0.2-16.6% and 0-14.1%, respectively. The LOD obtained was 0.5ng/mL for amphetamine, methamphetamine, MDEA, MBDB, cocaine and benzoylecgonine, and 1ng/mL for morphine, 6-MAM, MDA and MDMA. The LLOQ was 1ng/mL for amphetamine, methamphetamine, MDEA, MBDB, cocaine and benzoylecgonine, and 2ng/mL for morphine, 6-MAM, MDA and MDMA. The ULOQ was 250ng/mL for all compounds. The recoveries

obtained at 5ng/mL and 125ng/mL for all compounds ranged from 55.6 to 87.3%.

No matrix effect was detected for morphine, 6-MAM, cocaine and benzoylecgonine, but surprisingly there was ion suppression in the case of all amphetamines, which was -70% for amphetamine and methamphetamine, and -60% for MDA, MDMA, MDEA and MBDB. The same method applied to plasma samples [11] did not show matrix effect. For this reason, it is important to select the appropriate IS with the same matrix effect (Table 1). In any case, despite the matrix effect, the other validation parameters were satisfactory, and good LOD and LLOQ were achieved.

The amount of sample spent in this method is lower than the amount used in the previous published methods: Mortier et al. [5] needed 200 $\mu$ L of oral fluid and Wood et al. [6] 250 $\mu$ L of preserved oral fluid. The present method was developed using LC-MS, and the other two using LC-MS/MS.

The two confirmatory analytical methods developed in this study, for the determination of opiates, cocaine and amphetamines and for the determination of THC, were successfully applied to the roadside collected OF samples (Fig. 2).

### *3.2. Evaluation of the on-site Varian OraLab test*

A total of 212 OraLab devices were tested of which 25% did not complete the test satisfactorily, and only 160 were valid. The absence of the right or both bands in the test validity window was possibly caused by insufficient oral fluid collected in the collection foam.



Of the 160 valid devices, 39 tested positive, mainly for cocaine (21). Other positive cases were for THC (5), opiates (2), amphetamine (1), a combination of cocaine and THC (7), and a combination of cocaine and opiates (3).

The OraLab results were compared with the lab results for sensitivity, specificity and accuracy. Also, the positive predictive value and negative predictive value were calculated (Table 2). The results obtained were good for cocaine, opiates and THC in terms of sensitivity and specificity (>90%), and accuracy (>95%), but in the case of THC positive predictive value was < 90%. For amphetamine and for methamphetamine, specificity was >90% and accuracy was > 95%, but sensibility did not satisfy the criteria.

### *3.3. Evaluation of the on-site Dräger Drug test*

The total number of Dräger devices tested was 256, of which 26 were invalid and 230 valid, thus approximately 10% of devices did not complete the test properly. The failure detected was that the analyzer did not read the cassette. The possible causes of this failure were that not enough oral fluid was collected or the cassette had been unduly moved.

Of the 230 valid devices, 104 tested positive, principally for cocaine and THC (30 each) or a combination of both (20). The others were positive for amphetamine (6), amphetamine + methamphetamine (8), cocaine + amphetamine (7), THC + amphetamine (4), cocaine + THC + amphetamine (9) and cocaine + THC + opiates (2).

Comparing the Dräger results with the lab results, sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value and negative predictive value were calculated (Table 3). The results obtained were good only for cocaine (sensitivity and specificity > 90%, and accuracy > 95%). For opiates, specificity

and accuracy were good enough, but sensibility was 22.2%. For THC, amphetamine and methamphetamine the test should be improved. Also, special emphasis should be given to the excessive number of amphetamine false positives found (86%).

#### *3.4. Comparison OraLab vs. Dräger*

The traffic police officers found the OraLab device much simpler to handle, whereas the Dräger device demanded a more exhaustive control to follow the different steps required to carry out the test. Nevertheless, the subjective interpretation of the OraLab (rose line present or not) was completely rejected in favour of the printed result that appeared in the screen of the Dräger, because sometimes these lines are rather dim and difficult to discern in the conditions of the roadside night controls. Another negative issue to consider is the test failure in its final stage, which caused the police officers certain frustration. With regard to the rapidity of the test, the officers would prefer it to be a little faster.

The OraLab and the Dräger devices performed well in the detection of cocaine and opiates, but encountered some pitfalls in the detection of the other compounds such as THC, which have been reported in the bibliography [16, 17]. Also, OraLab requires more positive cases of amphetamine and methamphetamine in order to evaluate the test correctly.

Another important issue to consider was the cut-off points. The OraLab cut-offs for all compounds were much higher than those proposed by the SAMHSA [18]. Also, in the case of Dräger, the cut-offs for opiates, amphetamine and THC were higher than those proposed. This remains a key concern for this kind of test.

#### **4. Conclusion**

The aim of this study was to assess the effectiveness of two current onsite oral fluid drug detection devices (OraLab and Dräger), as part of the Spanish participation in the Roadside Testing Assessment Project (ROSITA). OraLab devices showed a good sensitivity, specificity and accuracy for cocaine and opiates, and Dräger devices for cocaine, but both of them were insufficient for THC, amphetamine and methamphetamine detection. However, the police officers complained of occasional doubt in discerning the presence or not of the rose line in the OraLab device, and found the Dräger to be rather complicated to use. Support from the Dräger team for any problems encountered during the test was excellent, and members of the staff participated directly in the controls. The two confirmation methods in oral fluid by LC-MS were fully validated and successfully applied to the roadside collected samples. A total of 300µL of oral fluid was used in the confirmation analysis.

#### **Acknowledgements**

Special contribution of Tte Coronel JL Ulla, Chief of Traffic Section of NW of Spain, and of Dirección General de Tráfico (DGT), Ministerio del Interior.

Special thanks to the laboratory technician Daniel González Aido who worked very hard and long hours to make this work possible, and to all those officers who were involved in the controls.

This work was made possible thanks to financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (F.P.U. Grant number AP-2002-2935 and AP-2002-2878).

## References

- [1] V. Maes, C. Charlier, O. Grenez, A. Verstaete, Drugs and medicines that are suspected to have a detrimental impact on road user performance, in: A. Verstraete (Project coordinator), ROSITA: Roadside Testing Assessment. ROSITA Contract No. DGVII PL 98-3032, Ghent University, Ghent, Belgium, 2000, pp. 5-44.
- [2] N. Samyn, G. De Boeck and A. Verstraete, The use of Oral Fluid and Sweat Wipes for the detection of Drugs of Abuse in Drivers, *J Forensic Sci.* 47 (2002) 1-8.
- [3] E.J.Cone, Saliva testing for drugs of abuse, *Ann. N. Y. Sci.* 694 (1993) 91-127.
- [4] A. Verstraete (Project coordinator), ROSITA: Roadside Testing Assessment. ROSITA Contract No. DGVII PL 98-3032, Ghent University, Ghent, Belgium, 2000.
- [5] K.A. Mortier, K.E. Maudens, W.E. Lambert, K.M. Clauwaert, J.F. Van Bocxlaer, D.L. Deforce, C.H. Van Peteghem, A.P. De Leenhaer, Simultaneous, quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and Benzoyllecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 779 (2002) 321-330.
- [6] M. Wood, M. Laloup, M.M. Ramírez Fernández, K.M. Jenkins, M.S. Young, J.G. Ramaekers, G. De Boeck, N. Samyn, Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 150 (2005) 227-238.

- [7] M. Concheiro, A. de Castro, O. Quintela, A. Cruz, M. López-Rivadulla, Development and validation of a method for the quantitation of  $\Delta^9$ tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatograph electrospray-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 810 (2004) 319-324.
- [8] M. Laloup, MdelM Ramírez Fernández, M. Wood, G. De Boeck, C. Henquet, V. Maes, N. Samyn, Quantitative analysis of delta9-tetrahydrocannabinol in preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1082(1) (2005) 15-24.
- [9] H. Teixeira, P. Provenca, A. Verstraete, F. Corte-Real, D.N. Vieira, Analysis of Delta9-tetrahydrocannabinol in oral fluid samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 150(2-3) (2005) 205-211.
- [10] H. Teixeira, P. Provenca, A. Castanheira, S. Santos, M. López-Rivadulla, F. Corte-Real, E.P. Marques, D.N. Vieira, Cannabis and driving: the use of LC-MS to detect delta9-tetrahydrocannabinol (delta9-THC) in oral fluid samples. *Forensic Sci. Int.* 146(Suppl.) (2004) S61-S63.
- [11] M. Concheiro, A. de Castro, O. Quintela, M. López-Rivadulla, A. Cruz, Determination of drugs of abuse and their metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. An application to 156 road fatalities. *J. Chromatogr. B* 832 (2006) 81-89.
- [12] V.P. Shah, K.K. Mida, J.W.A. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. Mckay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonnelli, C.T. Viswanattan, A. Jacobi, Bioanalytical Method Validation – A Revisit with a Decade of Progress. *Pharm. Res.* 17(12) (2000) 1551-1557.

- [13] F.T. Peters, H.H. Maurer, Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – A review. *Accred. Qual. Assur.* 7 (2002) 441-449.
- [14] T. Annesley, Ion Suppression in Mass Spectrometry, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1041-1044.
- [15] A. Verstraete, M. Puddu, Evaluation of different road side drug test, in: A. Verstraete (Project coordinator), ROSITA: Roadside Testing Assessment. ROSITA Contract No. DGVII PL 98-3032, Ghent University, Ghent, Belgium, 2000, pp. 167-232.
- [16] J.M. Walsh, R. Flegel, D.J. Crouch, L. Cangianelli, J. Baudys, An Evaluation of Rapid Point-of-Collection Oral Fluid Drug-Testing Devices, *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 429-439.
- [17] M. Laloup, M.M. Ramírez Fernández, M. Wood, G. De Boeck, V. Maes, N. Samyn, Correlation of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol concentrations determined by LC-MS-MS in oral fluid and plasma from impaired drivers and evaluation of the on-site Dräger DrugTest®, *Forensic Sci. Int.* 161 (2006) 175-179.
- [18] Substance Abuse and Mental Health Administration, Mandatory guidelines for Federal workplace drug testing programs, *Fed. Regist.* 59 (1994) 29908-29931.

Table 1. SIR functions, time windows of SIR functions, selected ions, cone voltages, retention times and corresponding IS, for morphine, amphetamine (A), MDA, methamphetamine (MA), 6-MAM, MDMA, MDEA, benzoylecgonine (BZG), MBDB, cocaine and their deuterated analogues.

Compound	SIR Funtion	Time window SIR Function (min)	Selected m/z ratios <sup>a</sup>	Cone voltage (V)	Retention time (min)	I.S.
Morphine	Function1:	2.0-5.0	<b>286</b>	40	4.3	Cocaine-d <sub>3</sub>
	SIR of 2 m/z		201	55		
A	Function 2:	5.0-7.5	<b>136</b>	15	7.4	MA-d <sub>5</sub>
	SIR of 2 m/z		119	15		
MDA	Function 3:	7.4-8.3	<b>180.2</b>	15	7.6	MDMA-d <sub>5</sub>
	SIR of 9 m/z		163.2	15		
MA			<b>150.1</b>	15	7.7	MA-d <sub>5</sub>
			119	20		
6-MAM			<b>328.1</b>	30	7.7	Cocaine-d <sub>3</sub>
			211	60		
MDMA			<b>194.2</b>	15	7.9	MDMA-d <sub>5</sub>
			163.2	15		
MA-d <sub>5</sub>			155.3	15	7.7	
MDMA-d <sub>5</sub>			199.3	15	7.9	
MDEA	Function4:	8.2-9.5	<b>208.3</b>	20	8.4	MBDB-d <sub>5</sub>
	SIR of 7 m/z		163.2	20		
BZG			<b>290</b>	20	8.6	BZG-d <sub>3</sub>
			168.2	25		
MBDB			<b>208.3</b>	20	8.8	MBDB-d <sub>5</sub>
			177.1	25		
BZG-d <sub>3</sub>			293.2	25	8.6	
MBDB-d <sub>5</sub>			213.3	15	8.8	
Cocaine	Function 5:	9.3-17.0	<b>304.2</b>	20	9.7	Cocaine-d <sub>3</sub>
	SIR of 3 m/z		182.1	30		
Cocaine-d <sub>3</sub>			307.1	25	9.7	

<sup>a</sup> Quantifier ions are in bold characters

Table 2. Sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of OraLab devices.

Compound	Sensitivity	Specificity	Accuracy	PPV	NPV
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
THC	93.3	98.6	98.1	87.5	99.3
Cocaine	100	97.9	98.3	91.4	100
MA	-	99.4	99.4	-	100
A	50	99.4	98.8	50	99.4
Opiates	100	100	100	100	100



Table 3. Sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of Dräger devices.

Compound	Sensitivity	Specificity	Accuracy	PPV	NPV
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
THC	58.6	89.8	77.7	78.4	77.4
Cocaine	90.1	98.8	95.7	97.6	94.8
MA	30	99.2	96.5	60	97.2
A	62.5	91.2	86.7	13.9	98.6
Opiates	22.2	100	97.3	100	97.2

## Figure legends

Fig. 1. LC-MS quantifier ion chromatograms of an oral fluid sample spiked at 5ng/mL of morphine, amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, 6-MAM, MDEA, MBDB, benzoylecgonine and cocaine.

Fig. 2. Chromatograms corresponding to two real cases, (a) and (b). Figure (a) shows the quantifier and confirmation ion for morphine (446.2ng/mL) and (b) for THC (240.6ng/mL).

Figure 1

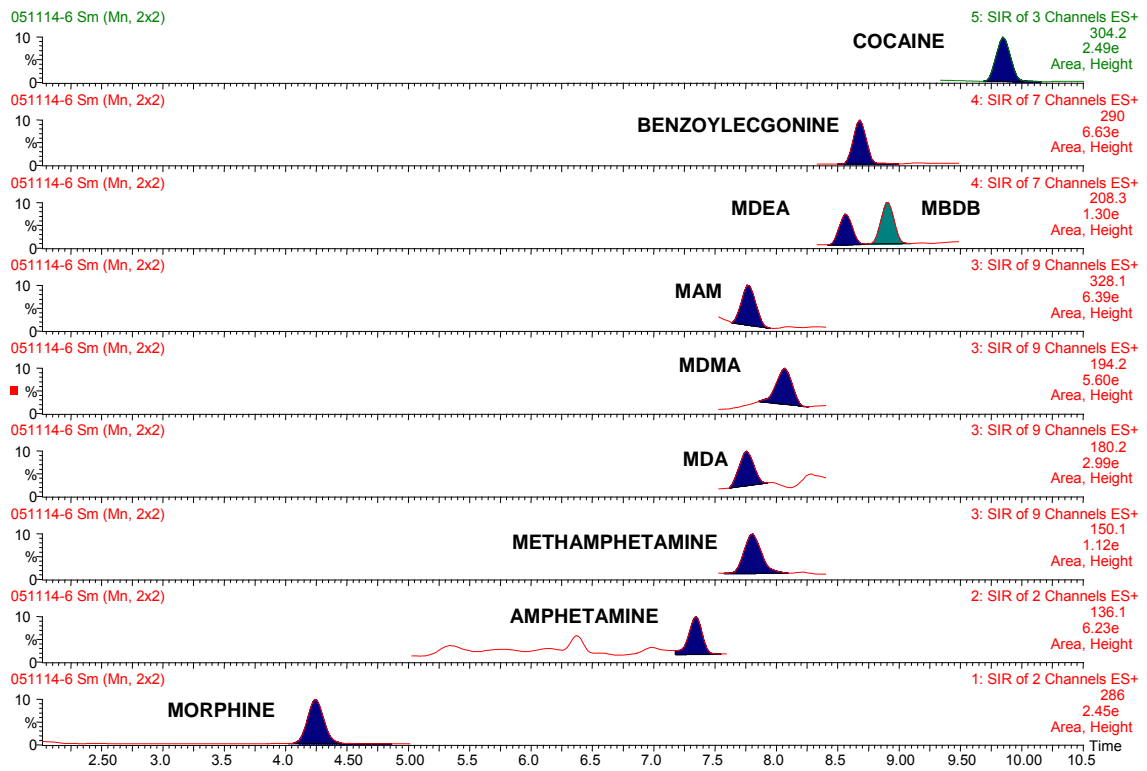
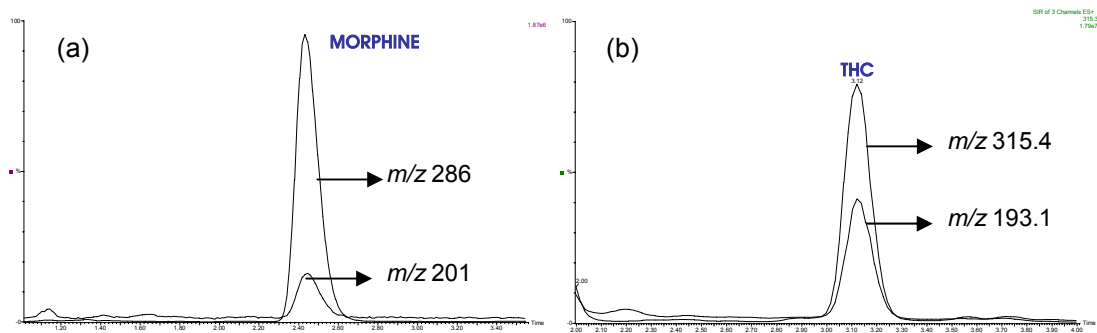


Figure 2



**HIGH-THROUGHPUT ON-LINE SPE-LC-MS/MS METHOD FOR THE SIMULTANEOUS ANALYSIS OF 14 ANTIDEPRESSANTS OF AND THEIR METABOLITES**

Ana de Castro<sup>1\*</sup>, Maria del Mar Ramírez Fernandez<sup>2</sup>, Marleen Laloup<sup>2</sup>, Nele Samyn<sup>2</sup>, Gert De Boeck<sup>2</sup>, Michelle Wood<sup>3</sup>, Viviane Maes<sup>4</sup>, Manuel López-Rivadulla<sup>1</sup>.

*<sup>1</sup>Forensic Toxicology Service. Institute of Legal Medicine. University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain; <sup>2</sup>Federal Public Service Justice, National Institute of Criminalistics and Criminology, Brussels, Belgium; <sup>3</sup>Waters Corporation, MS Technologies Centre, Manchester, UK; <sup>4</sup>Department of Clinical Chemistry-Toxicology, Academic Hospital, Free University of Brussels, Brussels, Belgium.*

\*CORRESPONDING AUTOR:

Forensic Toxicology Service. Institute of Legal Medicine. University of Santiago de Compostela. San Francisco s/n. 15782 Santiago de Compostela, Spain.

Tel.: +34 981582327

Fax: +34 981580336

E-mail address: anadeca@usc.es

## **Abstract**

A rapid, sensitive and fully automated on-line solid-phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS) method was developed and validated for the direct analysis of 14 antidepressants and their metabolites in plasma. Integration of the sample extraction and LC separation into a single system permitted direct injection of the plasma without prior sample pre-treatment. The applied gradient ensured the elution of all the examined drugs within 14 min and produced chromatographic peaks of acceptable symmetry. The total process time was 20 minutes and only 50 µL of sample was required. Selectivity of the method was achieved by a combination of retention time and two precursor-product ion transitions for the non-deuterated compounds. The use of SPE was demonstrated to be highly effective and led to significant decreases in the interferences present in the matrix. Extraction was found to be both reproducible and efficient with recoveries >99% for all the analytes. The method showed an excellent intra-assay and inter-assay precision (coefficients of variation (CV) and bias <20%) for quality control samples (QC) spiked at a concentration of 40, 200 and 800 µg/L and the  $r^2 > 0.99$  over the range investigated (10-1000 µg/L). Limits of quantification (LOQ) were estimated to be 10 µg/L. Furthermore, the processed samples were demonstrated to be stable for at least 48 hours, except for clomipramine and norclomipramine, where a slight negative trend was observed, but did not compromise the quantification. The method was subsequently applied to authentic samples previously screened by a routine HPLC method with diode array detection (DAD).

*Key words: antidepressant, plasma, on-line SPE, LC-MS/MS.*

## 1. Introduction

Major depressive disorder (MDD) is a condition characterized by a prolonged depression of mood or by a marked loss of interest or pleasure. Depression has received increased attention owing to the growing recognition of its prevalence. For many years, the prevailing hypothesis has been that the condition is caused by (or associated with) a deficiency of the monoamines, notably noradrenalin and serotonin; current theories also acknowledge that other factors may be involved in the pathogenesis of depression.

Pharmacological treatment for depression has advanced greatly since the development of the first therapies in the 1950s, with the introduction of monoamine oxidase inhibitors (MAOIs) and tricyclic antidepressants (TCAs) [1]. Since the late 1980s, a whole new generation of chemically and neuropharmacologically unrelated agents have been introduced which appear to be safer and better tolerated [2]. These include: selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), serotonin and noradrenalin reuptake inhibitors (SNaRIs), noradrenergic and specific serotonergic antidepressants (NaSSAs) and noradrenalin reuptake inhibitors (NaRIs) [3].

TCAs are characterized by having a narrow therapeutic window with risk of cardiac and CNS toxicity. In addition, a high variability in interindividual pharmacokinetics has been observed [4, 5]. Thus, therapeutic drug monitoring (TDM) for this class of antidepressant agents has become widely used because of its efficacy, safety and cost-effectiveness, the novel antidepressants show a less predictable concentration-efficacy relationship [6, 7, 8, 9], in combination with a relatively low toxicity. Therefore, several authors also support the benefit of TDM for these drugs in special situations, such as to monitor compliance in the case of those patients who do not respond to an apparently adequate dose to identify those individuals who have particularly slow or rapid drug clearance, during pharmacokinetic studies and when administered to special populations (*i.e.*, elderly or people with organic diseases) [7, 10, 11, 12].

Several methods have been published for the determination of one or more antidepressants in different biological matrices such as plasma or urine for monitoring or toxicological purposes [13-27]. In these reports, the use of gas chromatography (GC) coupled nitrogen phosphorus (NPD) [13,14], flame ionization (FID) [15], electron capture (ECD) [16] and mass spectrometry (MS) detectors [17-19] have been described. Liquid-liquid or solid-phase extraction (SPE) have been used for sample clean-up followed, in some cases, by a derivatization step [16-19]. However, in most of these reports, HPLC has been used in conjunction with UV [20, 21, 22] or fluorescence (FL) detectors [22, 23], thus necessitating an appropriate derivatization step to increase the fluorescence capacities of the compounds of interest. More recently, LC-MS or LC-MS/MS have been applied [24, 25, 26, 27]. These techniques provide a high selectivity and sensitivity in combination with a good precision and accuracy over a wide dynamic range, allowing the development of very rapid and efficient analytical methods. Therefore, in many cases it is now the sample pre-treatment process that has become the bottleneck in method development and sample analysis [28, 29].

High-throughput analysis is becoming increasingly important in all areas of science, the forensic sciences being no exception. Many efforts have been made to develop on-line extraction techniques, allowing automation and a high throughput of samples [30-32]. These procedures have been applied for the detection of only a few antidepressants. Recently, Sauvage et al. [33] have developed an innovative method for the determination of 13 antidepressants and some metabolites using turbulent-flow liquid chromatography (TFC). The antidepressants were divided into two groups depending on their chromatographic properties, thus two injections were necessary to screen all the compounds.

The aim of this study was to develop a simple, rugged and high-throughput on-line SPE-LC-MS/MS method for rapid and simultaneous bio-analysis of the main antidepressants prescribed in Belgium and their metabolites in plasma. The method involves a fully automated



SPE system (Spark Symbiosis™ Pharma), which allows the simultaneous extraction of the second sample in one clamp and the elution of the first sample in a second clamp, as such, achieving an optimal use of the extraction time. This system offers the entire process of conditioning, sample application, washing and elution taking place at constant flow rates, yielding better precision in comparison with off-line driven extraction procedures. Another important advantage is that no manual transfers are made and that the whole of the eluate is loaded onto the LC column without the need for a pre-concentration step.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Reagents**

Individual stock solutions of amitriptyline, nortriptyline, imipramine, desipramine, trazodone, fluoxetine, norfluoxetine, paroxetine, fluvoxamine, sertraline (all certified at a concentration of 1 mg/mL in methanol), and the internal standards (IS) imipramine-d<sub>3</sub>, desipramine-d<sub>3</sub>, clomipramine-d<sub>3</sub>, fluoxetine-d<sub>6</sub> and paroxetine-d<sub>6</sub> (certified concentration of 0.1 mg/mL in methanol) were obtained from Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Venlafaxine as a solid was obtained from Lederle Laboratories (New York, USA). Norclomipramine and citalopram in solid form were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and clomipramine as a solid was a gift from Novartis Farmacéutica, S.A. (Barcelona, Spain).

Ammonium hydrogen carbonate (99% purity) and formic acid (mass spectroscopy grade) was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Acetonitrile and methanol (both LC-MS grade) and water were purchased from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands). Isopropyl alcohol and ammonia solution (32%, extra pure) were from Merck (Darmstadt, Germany).

Oasis<sup>®</sup> MCX (Mixed Mode Cation Exchange) Prospekt<sup>™</sup> cartridges (30mg, 1cc) were from Waters (Milford, MA, USA).

### **2.2. Specimens**

Pooled blank plasma samples were used for development and validation of the procedure and were obtained from a local blood bank. Authentic plasma samples were obtained from hospital cases.

### **2.3. Preparation of standard solutions**

Separate working solutions of the drugs, for tuning and selectivity experiments, were prepared in the laboratory at a concentration of 1 mg/L in methanol. A mixed working solution

of non-deuterated compounds at 10 mg/L in methanol was used for the preparation of calibrators and QC samples. A mixed internal standard (IS) working solution of 1 mg/L was prepared in methanol. Working solutions were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ , and were prepared monthly. To obtain the lower concentrations needed for internal standardization and validation of each experiment, further dilutions in water were prepared the same day.

## **2.4. SPE-LC-MS/MS**

### *2.4.1. Sample preparation: XLC (On-line SPE)*

Sample extraction was performed using the on-line SPE Symbiosis<sup>TM</sup> Pharma System (Spark Holland<sup>TM</sup>, Emmen, The Netherlands). It comprises two integrated units: the Reliance<sup>TM</sup> autosampler with two binary LC pumps integrated and the on-line SPE unit Prospekt-2 system (consisting of the automated cartridge exchange (ACE) unit and two high-pressure dispensers (HPD)). The entire system was operated by SparkLink<sup>TM</sup> software (version 3.10, Spark Holland<sup>TM</sup>). The extraction procedure was carried out in total recovery screw top vials of high quality glassware (Waters). Nine hundred and fifty microlitres of 0.1% formic acid and 50  $\mu\text{L}$  of the IS working solution (0.1 mg/L) were added to 50  $\mu\text{L}$  of plasma. The following XLC program was subsequently used (Figure 1): After conditioning with 1 mL of methanol, 1 mL of water and 1 mL of 0.1% formic acid (Figure 1.A), 100  $\mu\text{L}$  of the diluted plasma sample was applied onto the SPE MCX cartridge (cation exchange mode) using 1 mL of 0.1% of formic acid as transport solvent. Clean-up was accomplished with successive 1 mL washes of 0.1% of formic acid and methanol in order to wash out salts and endogenous interferences present in the biological sample (Figure 1.B). The cartridge was then physically moved with a robotic arm to the elution (right) clamp in line with the LC pumps, leaving the extraction (left) clamp ready to start with a new sample. Whilst the elution step was being performed, a new cartridge was conditioned, loaded and washed in the left clamp. The elution was performed

with 300  $\mu\text{L}$  of 5% ammonia in methanol (at 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Following the elution step, several automated clamp and valve washes were carried out to avoid contamination between samples.

#### *2.4.2. Chromatographic conditions*

Focusing of the eluate was simultaneously performed as the compounds were eluted from the SPE cartridge by the use of a focusing column, Gemini  $\text{C}_{18}$  guard column (4 x 2.0 mm, 5 $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex, Torrance, CA, USA), and a gradient elution with 10 mM ammonium bicarbonate (pH 10) (A) and acetonitrile (B) (Figure 1.C). A gradient was carried out starting from 0% B and a flow rate of 1 mL/min for 3 min, as the eluate was diverted to the waste using the MS/MS Rheodyne<sup>®</sup> switching valve. At 3.01 min, a switch of the valve delivered the eluent to the analytical Gemini  $\text{C}_{18}$  column (150 x 2 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex) (Figure 1.D) to start with the separation of the compounds at a flow rate of 0.3 mL/min and 50% B over the next minute. From 4 min to 5 min, B was subsequently increased to 70%, and then kept for 6.5 min. At 11.5 min, B was increased to 95% in 1.5 min before returning to 50% within 0.5 min and equilibrating for 4.5 min. At 18 min a switch of the MS/MS valve diverted the eluent again to the waste, returning to the initial conditions to be ready for the analysis of the following sample.

#### *2.4.3. Tandem mass spectrometry*

A Quattro Premier tandem mass spectrometer (Waters) was used for all analyses. Ionization was achieved using electrospray in positive ionization mode (ESI+). Nitrogen was used as nebulisation and desolvation gas at a flow rate of 800L/h and heated to 350°C. Capillary voltage and source block temperature were 1 kV and 120°C, respectively.

In order to establish the appropriate multiple reaction monitoring (MRM) conditions for the individual compounds, solutions of standards (200 µg/L, in 10 mM ammonium bicarbonate (pH 10) - acetonitrile (50:50, v/v)) were infused into the mass spectrometer and the cone voltage (CV) optimised to maximise the intensity of the protonated molecular species  $[M + H]^+$ . Collision-induced dissociation (CID) of each protonated molecule was performed. The collision gas (argon) pressure was maintained at 0.35 Pa ( $3.5 \times 10^{-3}$  mBar) and the collision energy (eV) adjusted to optimise the signal for the most abundant product ions, which were subsequently used for MRM analysis.

All aspects of data acquisition were controlled using MassLynx NT 4.0 software with automated data processing using the TargetLynx™ software (Waters).

## **2.5. On-line SPE-LC-MS/MS assay validation**

The analytical validation was performed according to the recommendations of Peters and Maurer [34] and Shah et al. [35].

### *2.5.1. Linearity, limit of quantification (LOQ), precision and accuracy.*

Quantification was performed by integration of the area under the specific MRM chromatograms in reference to the integrated area of the deuterated analogues. Freshly prepared working solutions of 0.02, 0.1, 0.5, and 2 mg/L in water were used to prepare plasma calibrators at a concentration of 10, 25, 50, 125, 250, 500 and 1000 µg/L. Standard curves, freshly prepared with each batch of QC and authentic samples, were generated using a least-squares linear regression, with a 1/x-weighting factor for most of the compounds, except for trazodone, nortrityline and norclomipramine, for which a quadratic response was found to be more suitable.

The limit of quantification (LOQ) was defined as the concentration of the lowest calibrator that was calculated within  $\pm 20\%$  of the nominal value and with a % relative standard deviation (RSD) less than 20%.

QCs were prepared for every run in blank plasma at a concentration of 200, 400 and 800  $\mu\text{g/L}$ . Intra-assay precision was evaluated by replicate ( $n=5$ ) analysis of the three QC samples in one run. Inter-assay precision was evaluated by replicate analysis of the QC samples in several experiments performed on six different days. Comparing the calculated concentrations of all calibrators and QC samples to their respective nominal values, provided data on the accuracy (bias) of the method.

#### *2.5.2. Selectivity and specificity*

The selectivity of the method against endogenous interferences was verified by examination of the chromatograms obtained after the extraction of six different blank plasma samples conserved in two different anticoagulants (sodium citrate ( $n=3$ ) and sodium fluoride ( $n=3$ )).

The combination of benzodiazepines with antidepressants potentiates the treatment of depression, thus, benzodiazepines are frequently encountered in these samples. For this reason, the specificity of the method was also assessed by the analysis of plasma samples spiked at 2  $\text{mg/L}$  of a solution containing 27 benzodiazepines used for routine analysis in our laboratory.

#### *2.5.3. Stability of samples*

The stability of the drugs in plasma was monitored in diluted plasma samples as follows; 50  $\mu\text{L}$  of blank plasma spiked at the initial concentrations of 40, 200 and 800 ( $n=9$ , at each concentration) were diluted with 950  $\mu\text{L}$  of 0.1% formic acid. The IS was added to the control samples ( $n=3$ ) and the concentrations were determined immediately. Another pool of samples

were kept in the autosampler at  $6 \pm 2^\circ\text{C}$  and analyzed prior to the addition of the IS, after 24 hours ( $n=3$ ) and 48 hours ( $n=3$ ). Stability was tested against a lower acceptance limit corresponding to 90% of the mean of control samples by one-sided t-test ( $P < 0.05$ ).

For an evaluation of freeze/thaw stability, the control samples at the concentrations of 40 and 200  $\mu\text{g/L}$  ( $n=3$ ) were spiked with the IS and analysed immediately. The stability samples, spiked at the same concentrations ( $n=3$ ), were subjected to three freeze/thaw cycles. For each freeze/thaw cycle, the samples were frozen at  $-20^\circ\text{C}$  for 24 h, thawed, and then maintained at ambient temperature for 1 h. After the three cycles, the samples were spiked with the IS and analyzed. Stability was tested against a lower percentage limit corresponding to 90% of the mean value of control samples by on-sided t-test ( $P < 0.05$ ).

#### *2.5.4. Assessment of matrix effects.*

To assess any potential suppression or enhancement of ionization due to the sample matrix, two different analyses were carried out. The first one involved a post-column infusion experiment. The study was based on a continuous post-column infusion of a mixture of the drugs and their internal standards (10  $\mu\text{g/L}$  at a flow rate of 10  $\mu\text{L/min}$ ) to produce a constant elevated response in the MRM channels. The interference of this constant response was monitored following the injection of plasma samples (in two different anticoagulants: sodium citrate ( $n=3$ ) and sodium fluoride ( $n=3$ )) and compared to the response following the injection of mobile phase only. A second type of experiment consisted of a comparison of the peak responses of the analysis of a blank plasma sample spiked at 1000  $\mu\text{g/L}$  calibrator ( $n=3$ ) with those obtained from water spiked at the same concentration level.

#### *2.5.5. Recovery.*

Recoveries were estimated by performing two experiments. In order to optimize the elution conditions *i.e.* elution volume and flow rate, a 1000 µg/L calibrator (n=3) was injected in the absence of both the analytical and focusing column. As such the compounds elute directly to the MS/MS as they elute from the SPE cartridge. In a second experiment, performed to calculate the total recovery, a 1000 µg/L calibrator (n=3) was loaded and washed in a first SPE cartridge while a second cartridge was placed in series to determine the breakthrough of the first one. Both cartridges were subsequently eluted independently. Recovery was considered to be the ratio between the response obtained after elution of the first cartridge and the total response (sum of both, the first and the second SPE cartridge).

### **3. Results and discussion**

The method was validated for linearity, LOQ, precision and accuracy by the analysis of spiked plasma samples. In each case, a weighted (1/x) linear regression line was applied, except for trazodone, nortriptyline and norclomipramine, for which a quadratic response was found to be more suitable to obtain the best fit across the calibration range [34]. Correlation coefficient of  $r^2 > 0.99$  was achieved in the range investigated: from 10 up to 1000 µg/L. Figure 2 shows the MRM chromatograms obtained following the analysis of the lowest calibrator (10 µg/L). At this concentration a signal to noise (S:N) > 10:1 was observed for the qualifier and the criteria for LOQ were satisfied.

The applied gradient ensured the elution of all the drugs examined within 14 min and produced chromatographic peaks of acceptable symmetry. Since a focusing step is a crucial factor to obtain good peaks and sensitivity, many efforts were made to determine the optimal conditions.

Selectivity of the method was achieved by a combination of retention time, precursor and product ions.



The most prominent precursor-product transitions were used for quantification of the non-deuterated compounds and the next most abundant, used as qualifiers.

For the corresponding deuterated analogues, only one transition was monitored. Table 1 summarises the MRM transitions and conditions of all quantifiers and qualifiers for all analytes and IS.

Injection of single analyte solutions did not produce interference in the other MRM channels. Linearity data are shown in Table 2. No interference peaks were observed in the antidepressants MRM channels when blank plasma samples spiked with 27 benzodiazepines were analysed.

The intra-assay precision (repeatability) and inter-assay precision were satisfactory, with all relative standard deviations less than 20% (Table 3). Results indicated that the bias (accuracy) of the assay was <19%.

The stability of spiked samples (40, 200, 800 µg/L) was monitored at 24 hours and 48 hours while kept in the autosampler at  $6 \pm 2^\circ\text{C}$ . No statistical significant difference could be observed for the three different concentrations, except for clomipramine and norclomipramine where a slightly negative trend was observed ( $P>0.05$ ), but it did not compromise de quantification.

Insufficient sample clean-up can result in matrix effects, leading to either suppression or enhancement of the analyte response. This can lead to variable sensitivities and decreased precision and accuracy. Consequently, in the development of any LC-MS(/MS) method, the potential for any such ion suppression or enhancement should be assessed. Post-column infusion experiments (based on the method described by Bonfiglio et al. [37]), were performed to provide information of the effect of the matrix throughout the course of the elution time for the analytes. An example of the effect on drug response, obtained following the injection of a mobile phase control, is shown in Figure 3.A. As expected, no changes in response were

observed. Another example of the effects obtained following the injection of a sample subjected to XLC are given in Figure 3.B. The results confirm the utility/benefits of the extraction as a sample clean-up before chromatography to obtain reproducible and reliable quantitative results for all the compounds without major interferences of matrix compounds. A second experiment was carried out and we compared peak responses obtained when the antidepressants were spiked to a blank plasma sample with the responses obtained when the antidepressants were added to a sample where the plasma was substituted with water. No statistically significant differences in peak areas were observed.

The Oasis<sup>®</sup> MCX Prospekt<sup>™</sup> cartridges (30mg, 1cc) utilise mixed-mode (cation-exchange) sorbents, which provide effective sample clean-up for basic drugs. The results of the extraction recovery study are presented in Table 4. Very high and reproducible recoveries were obtained with this SPE procedure for all analytes and all compounds were totally eluted from the SPE cartridge at the elution step conditions.

The validated SPE-LC-MS-MS method was applied to the analysis of 11 authentic samples from clinical cases and previously analysed by liquid chromatography coupled to a diode array detector (LC-DAD) using a routine screening method. Figure 4 shows the chromatogram obtained after the analysis of one of these samples, positive for trazodone and venlafaxine. The measured concentrations varied in a wide range and several samples had to be re-analysed after 1:10 dilution with blank plasma.

#### **4. Conclusions**

To our knowledge, this is so far the first on-line SPE method with single use cartridges, coupled to LC-MS/MS applied for the direct analysis of 14 antidepressants and metabolites in plasma. The combination of on-line SPE with MS/MS allowed the development of a high-throughput, fast and sensitive method with a 20 min total analysis time without compromising

the method validation criteria. The method was successfully applied to 11 authentic plasma samples, proven to be appropriate for the quantification of low both dose as high dose of these compounds in plasma collected from forensic toxicology cases.

### **Acknowledgements**

This work was done in part thanks to financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (F.P.U. Grant number AP-2002-2878).

## References

- [1] S.E. To, R.A. Zepf, A.G. Woods, *J Neurosci. Nurs.* 37 (2005) 102.
- [2] S. Caccia, *Clin Pharmacokinet.* 34 (1998) 281.
- [3] J.M. Kent, *The Lancet.* 355 (2000) 911.
- [4] L.F. Gram, P.K. Sorensen, C.B. Kristensen, M. Moller, O.L. Pedersen, P. Thayssen, *Adv Biochem. Psychopharmacol.* 39 (1984) 399.
- [5] P.J. Goodnick, *Clin. pharmacokinet.* 27 (1994) 307.
- [6] S.H. Preskron G.A. Fast, *J Clin Psychiatry* 52 (1991) 23.
- [7] B.B. Rasmussen, K. Brosen, *Ther. Drug Monit.* 22 (2000) 143.
- [8] P. Baumann, *Clin. Pharmacokinet.* 31 (1996) 444.
- [9] C. Hiemke, S. Härtter, *Pharmacol. Ther.* 85 (2000) 11.
- [10] P.B. Mitchel, *Clin. Chem. Lab. Med.* 42 (2004) 1212.
- [11] M.J. Burke, S.H. Preskorn, *Clin. Pharmacokinet.* 37 (1999) 147.
- [12] J. Lundmark, F. Bengtsson, C. Nordin, M. Reis, J. Walinder, *Acta Psychiatr. Scan.* 110 (2000) 354.
- [13] M.A. Martínez, C. Sánchez de la Torre, E. Almarza, *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 174.
- [14] R. De la Torre, J. Ortuno, J.A. Pascual, S.Gonzalez, J. Ballesta, *Ther. Drug Monit.* 20 (1998) 340.
- [15] J.J. Berzas, M.J. Llerena, A.M. Contento, E. Aguas, *J. Chromatogr. Sci.* 38 (2000) 200.
- [16] L. Zhao-Qian, T. Zhi-Rong, W. Dan, H. Song-Lin, W. Lian-Sheing, Z. Hon-Hao, *J. Chromatogr. B.* 769 (2002) 305.
- [17] C. Salgado-Petinal, P. Lamas, C. García-Jares, M. Llompart, R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1351.
- [18] B.A Way, D. Stickle, M.E. Mitchell , et al, *J. Anal. Toxicol.* 22 (1998) 374.

- [19] C.B. Eap, G. Bouchoux, M. Amey, N. Cochard, L. Savary, P. Baumann, *J. Chromatogr. Sci.* 36 (1998) 365.
- [20] K. Titier, N. Castaing, E. Scotto-Gómez, F. Pehourcq, N. Moore, M. Molimard, *Ther. Drug Monit.* 25 (2003) 581.
- [21] J. Karpinska, B. Starczewska, *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 29 (2002) 519.
- [22] L. Kristoffersen, A. Bugge, E. Lundanes, L. Slødal, *J. Chromatogr. B.* 734 (1999) 229.
- [23] S. Ertürk, S. Müge, S. Atmaca, L. Ersoy, G. Baktir, *Ther. Drug Monit.* 27 (2005) 38.
- [24] H. Zhang, K. Heinig, J. Henion, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 423.
- [25] K.E. Goeringer, I.M. McIntyre, O.L. Drummer, *J. Anal. Toxicol.* 27 (2003) 30.
- [26] U. Guttek, K. Rentsch, *Clin. Chem. Lab. Med.* 41 (2003) 1571.
- [27] M. Kollroser, C. Schobert, *Ther. Drug Monit.* 24 (2002) 537.
- [28] R.S. Plumb, G.J. Dear, D.N. Mallet, D.M. Higton, S. Pleasance, R.A. Biddlecombe, *Xenobiotica* 31 (2001) 599.
- [29] E. Brewer, J. Henion, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 395.
- [30] J.L. Veuthey, S. Souverain, S. Rudaz, *Ther. Drug Monit.* 26 (2004) 161.
- [31] S. Souverain, M. Mottaz, S. Cherkaoui, J.L. Veuthey, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 880.
- [32] M. Kollroser, C. Schober, *Chromatographia* 57 (2003) 133.
- [33] F.L. Sauvage, J.M. Gaulier, G. Lachâtre, P. Marquet, *Ther. Drug Monit.* 1 (2006) 123.
- [34] F.T. Peters, H. Maurer, *Accred. Qual. Assur.* 7 (2002) 441.
- [35] V.P. Shah, K.K. Midha, J.W.A. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonnelli, C.T. Viswanathan, A. Jacobi, *Pharm. Res.* 17 (2002) 1551.
- [36] T.M. Annesley, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1041.

- [37] R. Bonfiglio, R.C. King, T.V. Olah, K. Merkle, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1175.
- [38] J.C. Saraiva, T.M. Monteiro, C.S. de Miranda, K.R. da Silva, N.M. Volpato, V.A. Silva, R. Caminha, M.R. Bencke, F. Monteiro, G. Estolano, F. Noël, *Ther. Drug Monit.* 27 (2005) 601.
- [39] A. Schellen, B. Ooms, D. van de Lagemaat, R. Vreeken, W. van Dongen, *J. Chromatogr. B.* 788 (2003) 251.

**Table 1**

MRM transitions and conditions for all the compounds and their deuterated analogues.

Underlined transitions were used for quantification.

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Trazodone	372.1	147.9	40	35
		<u>176.0</u>		25
Fluvoxamine	319.1	<u>70.8</u>	25	15
		86.8		15
Norfluoxetine	296.1	30.0	15	8
		<u>133.9</u>		6
Paroxetine	330.1	<u>69.8</u>	40	28
		192.1		20
Citalopram	325.1	<u>108.8</u>	30	25
		115.8		25
Venlafaxine	278.1	<u>57.8</u>	20	18
		260.1		12
Fluoxetine	310.1	<u>43.9</u>	20	12
		147.9		8
Desipramine	267.2	44.0	25	30
		<u>71.8</u>		15
Nortriptyline	264.1	<u>90.8</u>	25	20
		233.2		15
Norclomipramine	301.1	43.9	25	35
		<u>71.8</u>		20
Imipramine	281.2	57.7	25	35
		<u>85.7</u>		10
Sertraline	306.1	<u>158.8</u>	15	30
		275.0		12
Amitriptyline	278.1	<u>90.8</u>	30	25
		104.8		20
Clomipramine	315.1	57.9	30	30
		<u>85.8</u>		18
Paroxetine-d <sub>6</sub>	336.1	75.8	35	32
Fluoxetine-d <sub>6</sub>	316.1	43.9	20	12
Desipramine-d <sub>3</sub>	270.2	74.8	25	15
Imipramine-d <sub>3</sub>	284.2	88.8	25	18
Clomipramine-d <sub>3</sub>	318.1	88.8	30	20

**Table 2**

Linearity data for 14 antidepressants and their metabolites.

<b>Compound</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>LOQ (µg/L)</b>
Trazodone	0.99995	10
Fluvoxamine	0.99848	10
Norfluoxetine	0.99890	10
Paroxetine	0.99939	10
Citalopram	0.99793	10
Venlafaxine	0.99727	10
Fluoxetine	0.99720	10
Desipramine	0.99945	10
Nortriptyline	0.99922	10
Norclomipramine	0.99702	10
Imipramine	0.99951	10
Sertraline	0.99900	10
Amitriptyline	0.99845	10
Clomipramine	0.99947	10



**Table 3**

Intra-assay and inter-assay precision and bias of the QC samples prepared in plasma at a concentration of 40, 200 and 800 µg/L

Compound	Concentration of QC (µg/L)	Intra-assay precision (n=5)			Inter-assay precision (n=6)		
		Mean concentration found (µg/L)	CV (%)	Bias (%)	Mean concentration found (µg/L)	CV (%)	Bias (%)
Trazadone	40	43.6	6.1	9.0	41.0	11.5	2.5
	200	233.2	1.5	16.6	199.6	7.0	-0.2
	800	692.6	4.7	-13.4	673.4	13.2	-15.8
Fluvoxamine	40	41.9	7.2	4.8	36.5	10.9	-8.8
	200	216.5	3.3	8.3	189.4	7.6	-5.3
	800	843.8	3.8	5.5	807.0	8.7	0.9
Norfluoxetine	40	45.6	7.5	14.0	41.1	14.3	2.8
	200	236.1	3.8	18.1	193.2	15.0	-3.4
	800	880.9	7.5	10.1	801.5	8.6	0.2
Paroxetine	40	40.8	6.4	2.0	38.5	6.5	-3.8
	200	212.8	2.2	6.4	193.6	7.2	-3.2
	800	807.3	4.3	0.9	805.9	8.8	0.7
Citalopram	40	44.1	4.4	10.3	43.1	7.8	7.8
	200	222.0	2.0	11.0	201.3	7.8	0.7
	800	796.7	2.8	-0.4	780.7	10.1	-2.4
Venlafaxine	40	44.0	5.6	10.0	43.1	12.5	7.8
	200	227.4	1.7	13.7	198.3	10.4	-0.8
	800	780.8	5.5	-2.4	785.4	13.0	-1.8
Fluoxetine	40	43.8	7.3	9.5	40.0	10.7	0.0
	200	220.0	3.0	10.0	196.3	9.8	-1.8
	800	817.0	8.3	2.1	814.3	9.9	1.8
Desipramine	40	43.3	5.4	8.2	40.5	5.4	1.3
	200	213.7	3.1	6.9	194.4	6.2	-2.8
	800	830.6	3.2	3.8	791.0	11.1	-1.1
Nortriptyline	40	41.7	6.4	4.3	38.1	8.4	-4.8
	200	211.0	3.6	5.5	192.1	8.3	-4.0
	800	813.4	5.1	1.7	800.0	13.6	0.0
Norclomipramine	40	40.0	6.5	0.0	36.6	15.4	-8.5
	200	226.9	15.5	13.5	197.0	7.0	-1.5
	800	798.6	3.4	-0.2	808.9	5.5	1.1
Imipramine	40	43.4	2.3	8.5	40.1	6.4	0.3
	200	226.1	1.3	13.1	198.1	7.4	-1.0
	800	827.1	3.8	3.4	806.5	11.4	0.8
Sertraline	40	42.2	5.2	5.5	37.2	14.1	-7.0
	200	221.9	3.5	11.0	193.9	9.2	-3.1
	800	850.2	5.5	6.3	824.6	7.6	3.1
Amitriptyline	40	38.3	5.9	-4.3	35.2	10.1	-12.0
	200	203.1	3.1	1.6	181.8	9.2	-9.1
	800	805.6	4.2	0.7	780.1	9.7	-2.5
Clomipramine	40	43.9	6.5	9.8	41.5	9.9	3.8
	200	219.1	1.7	9.6	207.1	7.5	3.6
	800	764.4	5.1	-4.5	808.2	10.3	1.0

**Table 4**

Extraction recovery and matrix effect

Data represent the mean of three experiments with a 1000 µg/L calibrator.

	<b>Recovery (%) (n=3)</b>	<b>Estimated matrix effect after SPE (%) (n=3)</b>
Trazodone	99.9	-10.9
Venlafaxine	99.8	-10.6
Citalopram	99.9	-5.9
Desipramine	99.8	-9.1
Imipramine	99.9	-7.1
Nortriptyline	99.6	-11.8
Amitriptyline	99.9	-22.8
Paroxetine	99.8	-6.7
Fluvoxamine	99.7	-16.8
Norfluoxetine	99.8	0.5
Fluoxetine	99.9	-12.1
Sertraline	99.9	-15.2
Clomipramine	99.7	-17.7
Norclomipramine	99.9	-10.4

## Figure legends

**Figure 1.** Scheme of on-line SPE system-LC (Symbiosis Pharma™) coupled to the MS/MS. (A) The sample is loaded into the sample loop while the first SPE cartridge is conditioned in the left clamp. (B) The sample is loaded onto the cartridge followed by a washing step. (C) The cartridge is moved to the right clamp, where the sample is eluted; the analytes are subsequently retained on the focussing column. Simultaneously, a second sample is subjected to the initial procedure of extraction in the left clamp. (D) After the elution step the MS valve is switched and the analytes are now directed to the analytical column in connection to the MS/MS. Following the analysis of the first sample, the second SPE cartridge is transferred to the right clamp in order to be eluted and analysed.

**Figure 2.** MRM chromatograms obtained following the analysis of a spiked plasma sample with 10 µg/L of (1) clomipramine, (2) amitriptyline, (3) sertraline, (4) imipramine, (5) norclomipramine, (6) nortriptyline, (7) desipramine, (8) fluoxetine, (9) venlafaxine, (10) citalopram, (11) paroxetine, (12) norfluoxetine, (13) fluvoxamine and (14) trazodone. Peak intensity is shown on the right-hand corner of each trace.

**Figure 3.** Post-column infusion experiments: matrix effect. (1) trazodone, (2) paroxetine, (3) nortriptyline and (4) amitriptyline, of an injection of a mobile phase control (A) and a blank sample following the extraction of plasma (B). The shaded area indicates the elution position of the respective antidepressants.

**Figure 4.** Typical MRM chromatograms obtained following the analysis of one authentic plasma sample. Concentrations were 127 µg/L for venlafaxine (A) 1036 µg/L for trazodone (B). The figure shows the response for the two transitions of both compounds (quantifier and qualifier). Peak intensity is shown in the top right-hand corner of each trace.

Figure 1

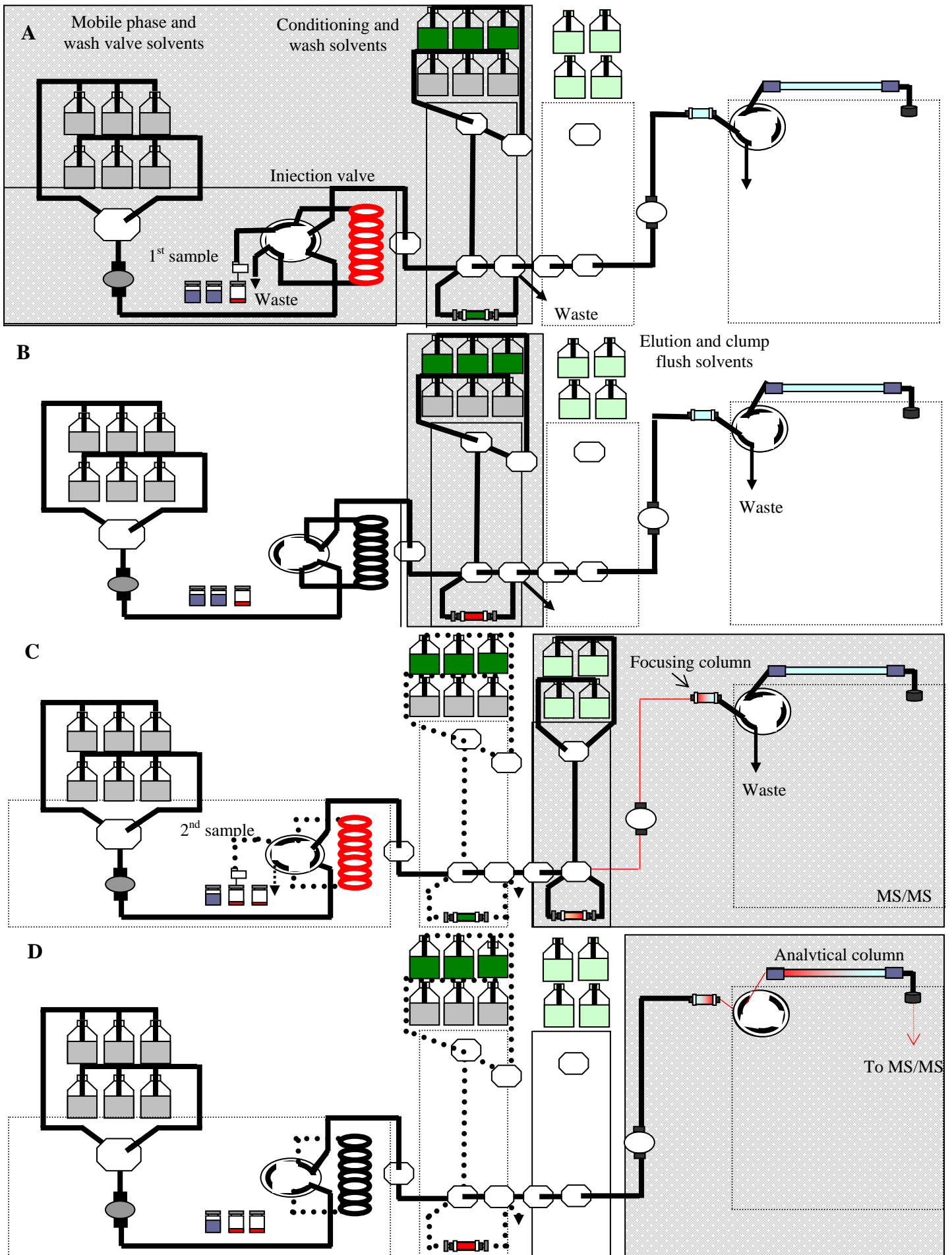
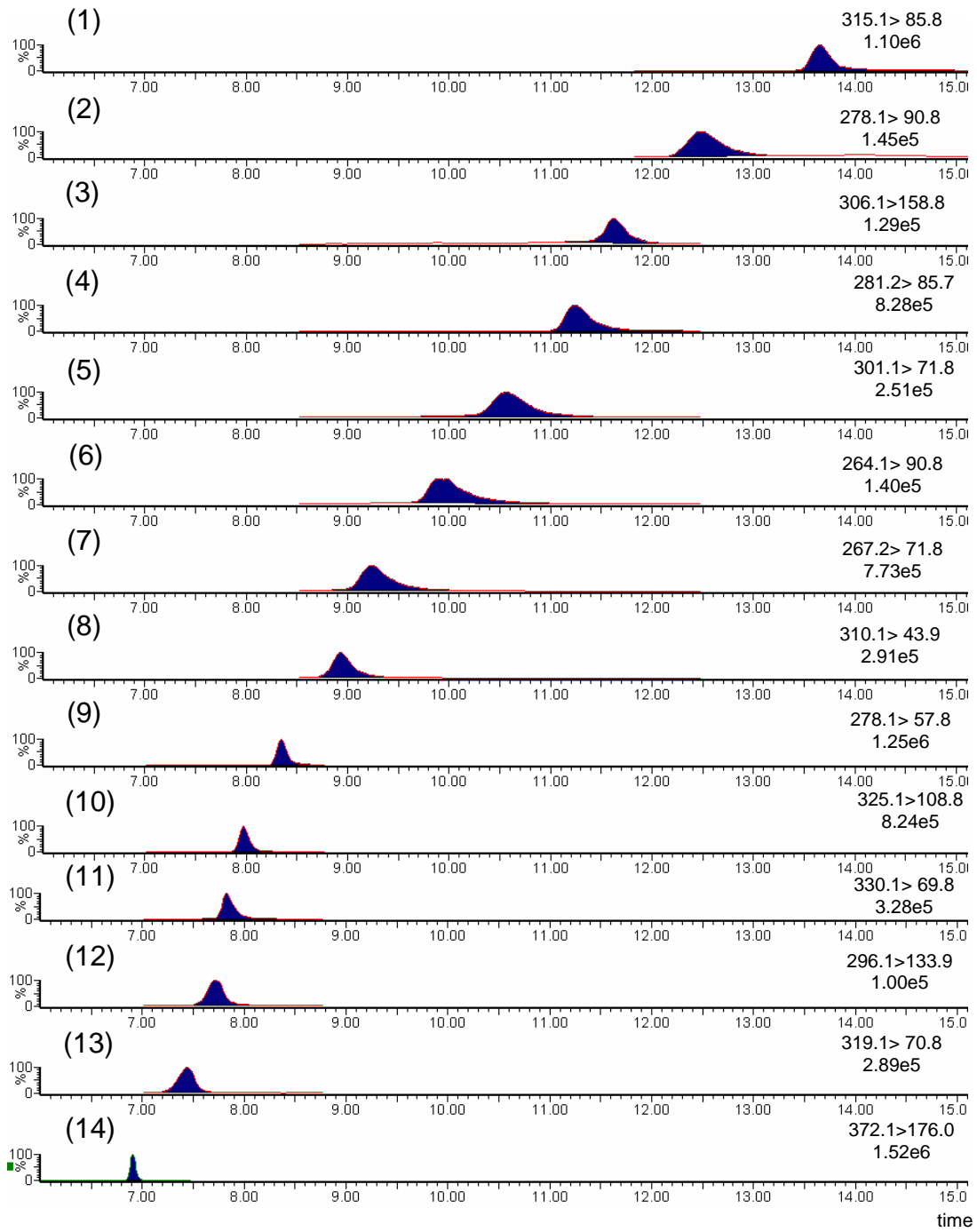
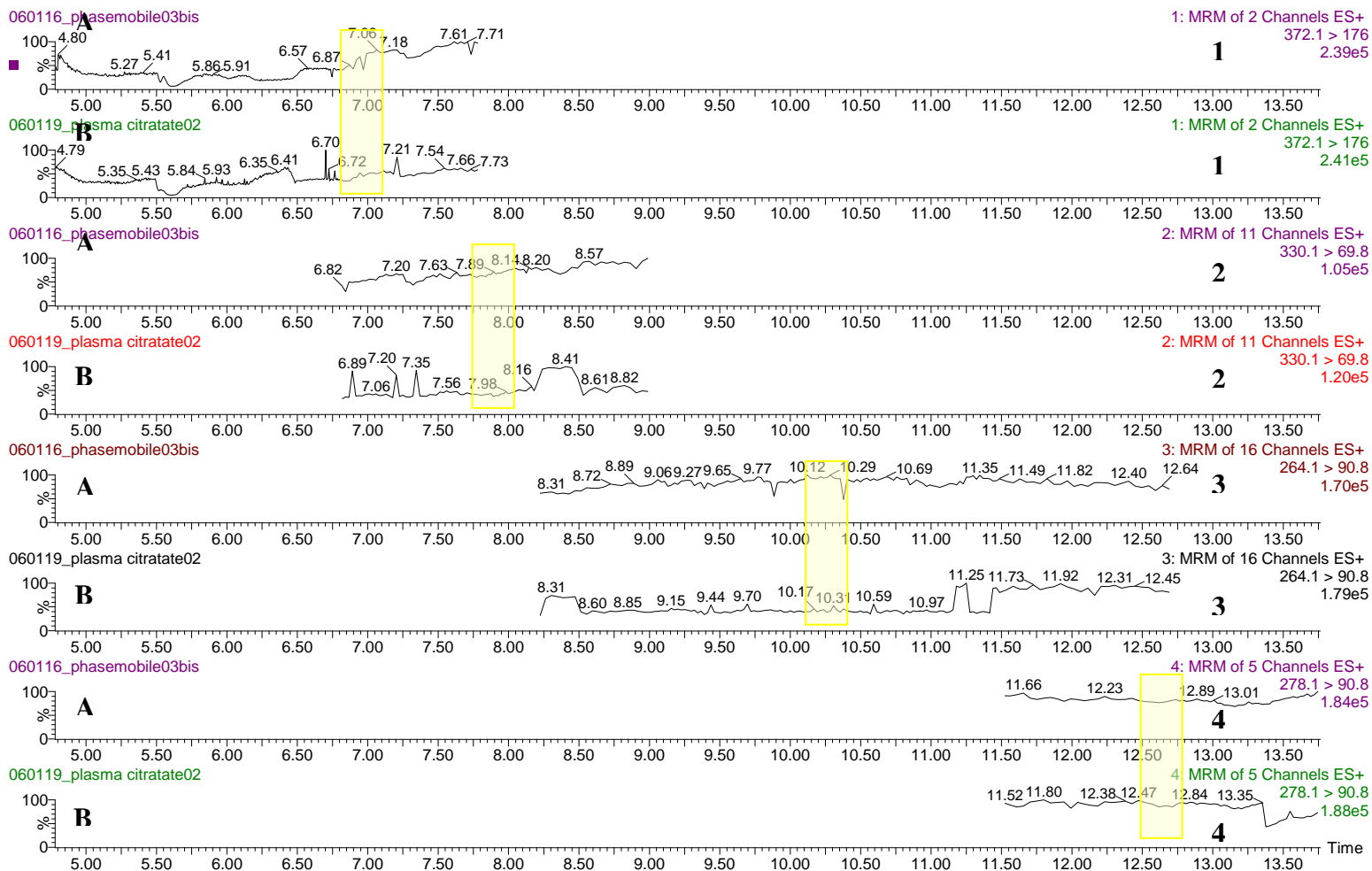


Figure 2



**Figure 3**



**Figure 4**

