

**Estudio de los ésteres etílicos de los
ácidos grasos, etil glucurónido y
fosfatidiletanol en diferentes muestras
biológicas para la determinación del
consumo crónico de alcohol**

PAMELA CABARCOS FERNÁNDEZ

Santiago de Compostela
2013

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias Forenses



**ESTUDIO DE LOS ÉSTERES ETÍLICOS DE LOS ÁCIDOS
GRASOS, ETIL GLUCURÓNIDO Y FOSFATIDILETANOL EN
DIFERENTES MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA LA
DETERMINACIÓN DEL CONSUMO CRÓNICO DE
ALCOHOL**

Pamela Cabarcos Fernández

Memoria para optar al grado de Doctora con Mención Europea por la
Universidad de Santiago de Compostela

Santiago de Compostela, Septiembre 2013



Facultad de Medicina y Odontología

Dpto. de Anatomía Patológica y Ciencias
Forenses

Dña. Ana María Bermejo Barrera, Catedrática de Toxicología, Dña. María Jesús Tabernero Duque, Profesora Contratada Doctora, y Dña. Purificación Fernández Gómez, Catedrática de Toxicología de la Universidad de Santiago de Compostela

Certifican:

Que la presente memoria titulada “Estudio de los ésteres etílicos de los ácidos grasos, etil glucurónido y fosfatidiletanol en diferentes muestras biológicas para la determinación del consumo crónico de alcohol”, que presenta la Licenciada Pamela Cabarcos Fernández para optar al grado de Doctora con Mención Europea, 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, firman el presente informe en Santiago de Compostela, a 20 de Septiembre de 2013.

Ana María Bermejo Barrera

M^a Jesús Tabernero Duque

Purificación Fernández Gómez

AGRADECIMIENTOS

Acknowledgments

“Sólo aquellos que se arriesgan a ir muy lejos pueden llegar a saber lo lejos que pueden ir”

T.S. Elliot

Este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo y la ayuda de muchas personas. A todos vosotros ¡¡GRACIAS!!

○ *A mis directoras de tesis, Ana M^a Bermejo Barrera, M^a Jesús Tabernero Duque y Purificación Fernández Gómez, por la oportunidad que me habéis dado y por la confianza que habéis depositado en mí durante todos estos años.*

○ *A José Ángel Cocho, por permitir el desarrollo de uno de los métodos de esta Tesis Doctoral en el Laboratorio de Metabolopatías, en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS).*

○ *A Antonio Moreda, por brindarme su ayuda de manera incondicional siempre que lo he necesitado.*

○ *A José Luis Otero Cepeda, por su aporte estadístico a esta Tesis.*

○ *A José Manuel, por su gran ayuda con los trámites administrativos.*

AGRADECIMIENTOS

Acknowledgments

○ *Mi agradecimiento también a la Fundación Segundo Gil Dávila, por otorgarme una beca de investigación durante los dos primeros años de los estudios de doctorado, contribuyendo también a la posibilidad de realizar una estancia predoctoral en la Universidad de Glasgow.*

○ *To “Foresic team” from Forensic Medicine and Science in the University of Glasgow, for giving me the opportunity to work with them. Special thanks to Huda, for her advice and support, for her warm welcome during all my stage in the UK and mainly, for her friendship.*

○ *¡¡A la chica de las tres carreras!! Ana, gracias por aconsejarme y ayudarme siempre que lo he necesitado. Echaré de menos nuestras largas charlas nocturnas ☺.*

○ *A Juan, por hacer que su “chica” haya formado parte de esta Tesis Doctoral. ¡¡Gracias por tus diseños fotográficos!!*

○ *A mis compañeros del laboratorio de Toxicología, tanto a los que ya se han ido como a los que todavía están. Especialmente a Patri, por haber sido mi guía durante los primeros años de investigación y a Martha, por compartir conmigo todos sus conocimientos sobre LC. Pero sobre todo, gracias por vuestra amistad más allá de los cromatogramas, extracciones, derivatizaciones... Tampoco me puedo olvidar de Iván, por brindarme su ayuda en todo momento.*

AGRADECIMIENTOS

Acknowledgments

○ ¡¡No podría olvidarme de vosotras, mis amigas de siempre!! A las “emigrantes” y a las ferrolanas, a las casadas, casadas con el banco ☺ y a las solteras, a las embarazadas y no embarazadas: María, Mónica, Raquel, Lore, Sabe, Belén y Pau. ¡Gracias por ser mi vía de escape! ¡¡No me olvido de vosotros chicos...Manel, Rober y Rubén!!

○ Y por último, aunque realmente ocupan el primer lugar, a mi familia. Ellos son los que de verdad se merecen un ¡¡GRACIAS!! Mamá y papá, los verdaderos co-autores de todo este trabajo. Todavía no se ha inventado una palabra, frase o expresión que indique todo lo que habéis hecho por mí. ¡Lo más importante lo he aprendido de vosotros!! A Estefanía y Alberto, los anfitriones de la Boda del Año, por vuestro apoyo, positivismo y quizá también por alguna que otra reprimenda o advertencia a tiempo ☺. Y, a Martín...por acompañarme en la escritura de esta Tesis con palabras de ánimo y motivación y sobre todo, por estar a mi lado.



A mis padres

Abreviaturas	13
Abbreviations and acronyms	
Resumen	21
Summary	
SECCIÓN I. INTRODUCCIÓN	25
INTRODUCTION	
CAPÍTULO I.I. GENERALIDADES SOBRE EL ALCOHOL	29
OVERVIEW ABOUT ALCOHOL	
I.I.1. Consumo de alcohol	30
I.I.2. Alcohol	37
CAPÍTULO I.II. MARCADORES DEL CONSUMO DE ALCOHOL	49
BIOMARKERS OF ALCOHOL CONSUMPTION	
I.II.1. Marcadores de exposición al alcohol etílico	49
CAPÍTULO I.III. MUESTRAS BIOLÓGICAS	65
BIOLOGICAL SAMPLES	
I.III.1. Tipos de muestras biológicas	65
CAPÍTULO I.IV. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	79
EXTRACTION METHODS	
I.IV.1. Técnicas de extracción en muestras biológicas	79
CAPÍTULO I.V. MÉTODOS DE DETECCIÓN	103
DETECTION METHODS	
I.V.1. Métodos de detección empleados	103
CAPÍTULO I.VI. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	121
STATE OF ART	
SECCIÓN II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	183
EXPLANATIONS AND OBJECTIVES	

ÍNDICE

Contents

SECCIÓN III. PUBLICACIONES	189
SCIENTIFIC PAPERS	
SECCIÓN IV. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	249
STATISTICAL ANALYSIS	
IV.1. Estadística descriptiva	255
IV.2. Análisis estadístico bivariente	261
SECCIÓN V. DISCUSIÓN	271
DISCUSSION	
V.1. FAEEs, EtG and PEth: Study and incorporation	276
V.2. Study of fatty acid ethyl esters (FAEEs) in hair	280
V.3. Study of ethyl glucuronide (EtG) in hair	288
V.4. Study of fatty acid ethyl esters (FAEEs) in meconium	295
V.5. Study of phosphatidylethanol (PEth) in blood	306
SECCIÓN VI. CONCLUSIONES	329
CONCLUSIONS	

ABREVIATURAS

Abbreviations and acronyms

A

ADH:	Alcohol deshidrogenasa Alcohol dehydrogenase
AEAT:	Acil-CoA/etanol O-acil-transferasa Acyl-coenzyme A:estradiol acyltransferase
AED:	Detector de emisión atómica Atomic Emission Detector
ALDH2:	Aldehído deshidrogenasa Aldehyde dehydrogenase
ALT:	Alanina aminotransferasa Alanine aminotransferase
APCI:	Ionización química a presión atmosférica Atmospheric Pressure Chemical Ionization
API:	Ionización a presión atmosférica Atmospheric Pressure Ionization
APPI:	Fotoionización a presión atmosférica Atmospheric Pressure Photoionization
AST:	Aspartato aminotransferasa Aspartate transaminase
AUDIT:	Cuestionario de identificación de los trastornos debidos al consumo de alcohol Alcohol Use Disorders Identification Test

B

BSTFA:	N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide
--------	--

C

C.V.:	Coefficiente de variación Coefficient of variation
CAGE:	Evaluación del alcoholismo crónico Chronic Alcoholism General Evaluation
CDT:	Transferrina carbohidrato deficiente Carbohydrate Deficient Transferrine

ABREVIATURAS

Abbreviations and acronyms

CI:	Ionización química <small>Chemical ionization</small>
CID:	Disociación inducida por colisión <small>Collision Induced Dissociation</small>
CIE-10:	Clasificación Internacional de Enfermedades (décima versión) <small>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD)</small>
CR:	Caso real <small>Real case</small>

D

DC:	Corriente continua <small>Direct current</small>
DLLME:	Extracción líquido-líquido dispersiva <small>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</small>

E

ϵ' :	Pérdida dieléctrica <small>Dielectric loss</small>
ϵ'' :	Constante dieléctrica <small>Dielectric constant</small>
E14:	Etil miristato <small>Ethyl myristate</small>
E16:	Etil palmitato <small>Ethyl palmitate</small>
E18:	Etil estearato <small>Ethyl stearate</small>
ECD:	Detector de captura electrónica <small>Electron Capture Detector</small>
EI:	Impacto electrónico <small>Electronic impact</small>
ELL:	Extracción líquido-líquido <small>Liquid-liquid extraction</small>
ELSD:	Detector de evaporación por dispersión de luz <small>Evaporative Light Scattering Detector</small>
ESI:	Ionización por electrospray <small>Electrospray ionization</small>
EtG:	Etil glucurónido <small>Ethyl glucuronide</small>
EtS:	Etil sulfato <small>Ethyl sulfate</small>

ABREVIATURAS

Abbreviations and acronyms

F

FAEEs:	Ésteres etílicos de los ácidos grasos <small>Fatty acid ethyl esters</small>
FAS:	Síndrome de Alcoholismo Fetal <small>Fetal Alcohol Syndrome</small>
FDA:	Agencia de Alimentos y Medicamentos americana <small>Food and Drug Administration</small>
FID:	Detector de ionización de llama <small>Flame Ionization Detector</small>
FPD:	Detector fotométrico de llama <small>Flame Photometric Detector</small>
FTIR:	Detector de infrarrojos por transformada de Fourier <small>Fourier Transform Infrared Detector</small>

G

GABA:	Ácido γ -aminobutírico <small>γ-Aminobutyric acid</small>
GC:	Cromatografía de gases <small>Gas chromatography</small>
GC-MS/MS:	Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en tándem <small>Gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry</small>
GC-MS:	Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas <small>Gas chromatography coupled to mass spectrometry</small>
GGT:	Gamma glutamil transpeptidasa <small>γ-Glutamyl transpeptidase</small>

H

5-HIAA:	Ácido 5-hidroxitriptofol <small>5-Hydroxyindoleacetic acid</small>
5-HTOL:	5-hidroxitriptofol <small>5-Hydroxytryptophol</small>

ABREVIATURAS

Abbreviations and acronyms

HPLC:	Cromatografía líquida de alta eficacia	High Performance Liquid Chromatography
HS-SPME:	Microextracción en fase sólida por espacio de cabeza	Head-Space Solid Phase Microextraction

I

IEA:	Intoxicación Etílica Aguda	Acute Ethanol Intoxication
ISCA:	Interrogatorio sistematizado de consumos alcohólicos	The Systematic Interview of Alcohol Consumption
IUGR:	Crecimiento Intrauterino Restringido (CIR)	Intrauterine Growth Restriction
IUPAC:	International Union of Pure and Applied Chemistry	

L

LC:	Cromatografía de líquidos	Liquid chromatography
LC-MS/MS:	Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tandem	Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
LLOQ:	Límite inferior de cuantificación	Lower limit of quantification
LOD:	Límite de detección	Limit of detection

M

m/z:	Relación masa/carga	mass-to-charge ratio
MAE:	Extracción asistida por microondas	Microwave Assisted Extraction

ABREVIATURAS

Abbreviations and acronyms

MALT:	Münchner Alcoholismus Test <small>Test de alcoholismo Munich</small>
MCV:	Volumen corpuscular medio de los hematíes <small>Mean Corpuscular Volume</small>
MEOS:	Sistema microsomal oxidativo del etanol <small>Microsomal Ethanol Oxidizing System</small>
MRM:	Monitorización por reacción múltiple <small>Multiple Reaction Monitoring</small>
MS:	Espectrometría de masas <small>Mass spectrometry</small>
MSD:	Detector selectivo de masas <small>Mass Selective Detector</small>

N

NACE:	Electroforesis capilar en medio no acuoso <small>Non-Aqueous Capillary Electrophoresis</small>
NAD ⁺ :	Nicotinamida-adenín-dinucleótido <small>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</small>

O

OMS:	Organización Mundial de la Salud
------	----------------------------------

P

PA:	Ácido fosfatídico <small>Phosphatidic acid</small>
PA:	Poliacrilato <small>Polyacrylate</small>
PC:	Fosfatidilcolina <small>Phosphatidylcholine</small>
PDMS/DVB:	Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno <small>Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene</small>
PEth:	Fosfatidiletanol <small>Phosphatidylethanol</small>

ABREVIATURAS

Abbreviations and acronyms

PF:	Factor de preconcentración	Preconcentration factor
PID:	Detector de fotoionización	Photo Ionization Detector
PLC:	Fosfolipasa D	Phospholipase D
PLD:	Fosfolipasa	Phospholipase
PNsD:	Plan Nacional sobre Drogas	

R

RF:	Radiofrecuencia	Radiofrequency
RIA:	Radioinmunoensayo	Radioimmunoassay

S

SCAN:	Modalidad de barrido de iones	
SCD:	Detector de quimioluminiscencia del azufre	Sulfur Chemiluminescence Detector
SIJ:	Índice de ácido siálico de la apolipoproteína J	Sialic acid index of apolipoprotein J
SIM:	Monitorización de iones seleccionados	Selected Ion Monitoring
SNC:	Sistema nervioso central	Central nervous system
SoHT:	Society of Hair Testing	
SPE:	Extracción en fase sólida	Solid Phase Extraction
SRM:	Monitorización de reacciones seleccionadas	Selected Reaction Monitoring
SULT:	Sulfotransferasas	Sulfotransferases

ABREVIATURAS

Abbreviations and acronyms

T

tan δ :	Factor de disipación <small>Dissipation factor</small>
TCD:	Detector de conductividad térmica <small>Thermal Conductivity Detector</small>
TDF:	Detector de tiempo de vuelo <small>Time of Flight Detector</small>
TID:	Detector termoiónico <small>Thermoionic Detector</small>
TLC:	Cromatografía en capa fina <small>Thin layer chromatography</small>
TMCS:	Clorotrimetilsilano <small>Trimethylchlorosilane</small>
TSA:	Ácido siálico total <small>Total sialic acid</small>

U

UGT:	UDP-Glucuronosiltransferasa <small>UDP-glucuronosyl transferase</small>
ULOQ:	Límite superior de cuantificación <small>Upper limit of quantification</small>
UV:	Ultravioleta <small>Ultraviolet</small>

V

V _d :	Volumen de distribución <small>Volume of distribution</small>
------------------	---

Summary

The consumption of alcohol is very much rooted in our society to serious cultural, social and clinical implications, which subsequently leads to the necessity to improve daily the methods of detection used. Ethanol is still nowadays the most widely studied molecule to express the degree of blood alcohol level in an individual. Amongst the health problems caused, Fetal Alcohol Syndrome (FAS), suffered by the newborn due to the mother's consumption of ethyl alcohol during pregnancy, is worth highlighting.

The study of ethanol is reduced to its determination in traditional samples as its chemical and physical properties make its detection in alternative samples, such as hair and meconium, inappropriate. Traditionally, methods for the diagnosis of alcohol consumption based on the analysis of indirect markers (MCV, CDT, γ -GT, etc) have been used. Nevertheless, due to its limitations, the study of direct markers of alcohol consumption was begun. These result from the non-oxidative metabolism of ethanol, and are capable of determining retrospective alcohol consumption and thus establishing a chronological profile.

The main objective of this Doctoral Thesis has been to demonstrate the possibility of determining alcohol consumption via the study of three of these metabolites of ethanol (FAEEs, EtG & PEth) using hair, meconium and blood, the last of which is generally used in Forensic Toxicology Laboratories. Finally, the optimization and posterior validation of the new methods of extraction and detection of these metabolite markers of ethyl alcohol consumption have been carried out.

Currently, there is no definite marker that allows us to totally ensure alcohol consumption on behalf of a person. The Toxicology Laboratories

normally analyse various markers to avoid giving false positives and negatives, thus offering the most reliable result possible.

All the studies on the determination of the 3 metabolites of ethanol studied in this Doctoral Thesis dating from the end of the 90s until now have been gathered. The samples analysed, the extraction methods and the separation techniques, as well as the validation results obtained and their use in real cases have been described.

Resumen

El consumo de alcohol está muy arraigado en nuestra sociedad con serias implicaciones culturales, sociales y clínicas, situación que desencadena la necesidad de mejorar día a día los métodos de detección. El etanol continúa siendo hoy en día la molécula más ampliamente estudiada para expresar el grado de alcoholemia de un individuo. Entre los problemas de salud que ocasiona, cabe destacar el Síndrome de Alcoholismo Fetal (FAS), sufrido por el recién nacido debido al consumo de alcohol etílico de la madre durante el período de gestación.

El estudio del etanol queda reducido a su determinación en las muestras tradicionales debido a que sus propiedades químicas y físicas lo hacen inapropiado para su detección en las muestras alternativas, como el pelo o el meconio. Tradicionalmente, se han usado métodos para el diagnóstico del consumo de alcohol basados en el análisis de marcadores indirectos (MCV, CDT, γ -GT, etc.). Sin embargo, debido a sus limitaciones, comenzaron a estudiarse marcadores directos del consumo de alcohol. Estos resultan del metabolismo no oxidativo del etanol y son capaces de determinar un consumo retrospectivo de alcohol y establecer de este modo un perfil cronológico.

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido demostrar la posibilidad de determinar el consumo de alcohol mediante el estudio de tres de estos metabolitos del etanol (FAEEs, EtG y PEth) empleando pelo, meconio y sangre, ésta última usada habitualmente en los Laboratorios de Toxicología Forense. Finalmente, se ha llevado a cabo la optimización y posterior validación de los nuevos métodos de extracción y detección de estos metabolitos marcadores del consumo de alcohol etílico.

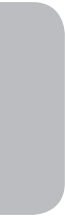
En la actualidad, no existe un marcador definitivo que permita asegurar con total seguridad el consumo de alcohol de una persona. Los Laboratorios de Toxicología normalmente analizan varios marcadores para evitar dar falsos positivos y negativos, ofreciendo un resultado lo más fiable posible.

Se han recogido todos aquellos trabajos desde finales de los 90 hasta la actualidad sobre la determinación de los 3 metabolitos del etanol estudiados en esta Tesis Doctoral. Se han descrito las muestras analizadas, los métodos de extracción y las técnicas de separación así como los resultados de validación obtenidos y su aplicación a casos reales.

SECCIÓN I. INTRODUCCIÓN

SECTION I. Introduction

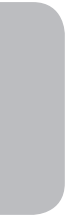




CAPÍTULO I.I: GENERALIDADES SOBRE EL ALCOHOL

CHAPTER I.I: Overview about alcohol

I.I.1. Consumo de alcohol	29
I.I.1.1. Consumo de alcohol en España	30
I.I.1.2. Consumo de alcohol según el sexo	31
I.I.1.3. Daños producidos por el consumo de alcohol	32
I.I.1.4. Consumo de alcohol durante el embarazo	32
I.I.1.5. Intoxicación etílica aguda	33
I.I.1.6. Alcoholismo crónico	34
I.I.1.7. Síndrome de dependencia	35
I.I.2. Alcohol	37
I.I.2.1. Propiedades químicas	37
I.I.2.2. Farmacocinética del etanol	37
I.I.2.2.1. Absorción	37
I.I.2.2.2. Distribución	38
I.I.2.2.3. Eliminación	39
Referencias bibliográficas	44



I.I.1. Consumo de alcohol

El consumo de alcohol ha estado muy extendido a lo largo de la historia. Las bebidas alcohólicas se emplearon a menudo como medicina, una práctica que ha persistido hasta principios del siglo XX y la entrada de la Medicina Moderna. Existían leyes sobre alcohol, más destinadas a mantener el orden público o a regular el mercado que a proteger la salud pública. Sin embargo, el panorama cambió a raíz de una serie de transformaciones en la Europa medieval y moderna, que incluyen la industrialización, la mejora de las comunicaciones y el descubrimiento de las bebidas destiladas [Anderson y col., 2006].

La Figura 1 refleja el consumo de alcohol per cápita en mayores de 15 años. Los niveles más altos de consumo se encuentran en los países desarrollados, mayoritariamente en los países del hemisferio norte pero también se dan grandes consumos en Argentina, Australia y Nueva Zelanda. Un nivel de consumo medio se encuentra en Sudáfrica, Norteamérica y Sudamérica. Los consumos más bajos se dan en los países del norte de África y el África sub-sahariana, la región del Mediterráneo oriental y el sur asiático. Estas regiones engloban una alta tasa de abstemios debido a razones religiosas. Como se puede ver, Europa es la región del mundo donde se consume más alcohol pero los tipos de bebidas alcohólicas consumidas varían mucho de unas regiones a otras. Así encontramos que un 44% consume cerveza, un 34% consume vino y un 23% licores. Los países del sur de Europa hacen uso sobre todo del vino, mientras que los países nórdicos y de centroeuropa consumen mayoritariamente cerveza [Álvarez y col., 2007; Alwan, 2011].

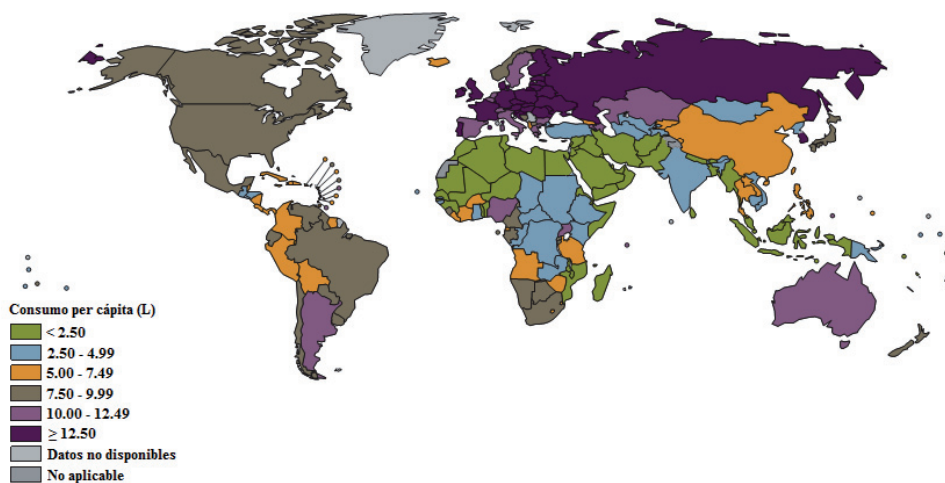


Figura 1. Consumo adulto per cápita, en litros de alcohol puro (Fuente: Alwan, 2011).

I.I.1.1. Consumo de alcohol en España

El alcohol sigue siendo la sustancia psicoactiva con un consumo más extendido entre la población española [OMS, 2006].

Se pueden diferenciar dos etapas en la historia del consumo de alcohol en España. Una primera etapa, que abarcaría desde 1950 hasta 1975 y que estaría marcada por un crecimiento progresivo del consumo global de alcohol y otra desde 1975 hasta la actualidad, caracterizada por una estabilización del consumo.

Por otra parte, no todos los grupos etarios presentan las mismas características; es el grupo adolescente el que marca las diferencias a partir de la década de los 90 dando lugar a un cambio en el patrón de consumo. Se consolidan dos patrones de consumo de alcohol diferenciados entre los adultos y los jóvenes. Así, el consumo de alcohol pasó de estar integrado en el ambiente familiar como elemento cultural (consumo típicamente mediterráneo; consumo

diario moderado y acompañando las comidas) a un consumo fuera del ámbito del hogar, bebiendo en lugares públicos en compañía de amigos durante los fines de semana centrándose el consumo en la cerveza y en los combinados [Pascual, 2002; Meguías y col., 2007].

I.I.1.2. Consumo de alcohol según el sexo

El género ha sido una de las variables clasificadoras a la hora de hablar de consumo de sustancias nocivas para la salud. Así, encontramos en la bibliografía que los hombres han mantenido consumos superiores a las mujeres en todo el elenco de sustancias disponibles, legales e ilegales. Sin embargo, en los últimos años se ha venido observando una tendencia hacia la homogeneización de los patrones de consumo entre ambos sexos, tendencia que también se observa en otros países europeos. Hasta tal punto es así, que las mujeres han superado las prevalencias de consumo de tabaco de los hombres, se han igualado en gran parte los indicadores del consumo de alcohol, y se han acercado notablemente a las prevalencias de consumo experimental de otras sustancias, sobre todo del cannabis. Debe señalarse, no obstante, que en las investigaciones más recientes aparecen ciertas discrepancias respecto a la evolución de esa tendencia igualatoria entre ambos sexos, mostrando en el caso de los hombres un comportamiento más abusivo y caracterizándose el de las mujeres por un mayor autocontrol.

La edad de inicio en el consumo del alcohol se sitúa en los 12.5 años, produciéndose la primera embriaguez a los 14 años. Estos datos indican que las mujeres hacen uso del alcohol en la edad fértil, lo que puede dar lugar al consumo de esta sustancia durante el embarazo, con las repercusiones derivadas del mismo [Pascual, 2002].

I.I.1.3. Daños producidos por el consumo de alcohol

El abuso del alcohol se relaciona con un amplio rango de problemas de salud, tanto físicos como mentales (más de 60 enfermedades) y sociales.

Los principales daños que produce el consumo abusivo de alcohol son: 1) enfermedades neuropsiquiátricas; 2) enfermedades gastrointestinales, metabólicas y endocrinas; 3) neoplasias malignas; 4) daños en el sistema inmune; 5) daños en el sistema músculo-esquelético; 6) enfermedades cardiovasculares; 7) síndrome de alcoholismo fetal (FAS) y complicaciones de nacimiento prematuro; 8) lesiones intencionales y no intencionales; 9) problemas sociales; 10) muerte súbita.

Esta toxicidad en la mayoría de los tejidos del organismo se debe a consumos elevados de alcohol. Sin embargo, su ingesta en dosis moderadas no parece causar ninguna enfermedad, e incluso se ha sugerido que este tipo de consumo podría tener efectos beneficiosos para la salud [Estruch, 2002; Meguías, 2007; Álvarez y col., 2007].

I.I.1.4. Consumo de alcohol durante el embarazo

Aunque muchas mujeres reducen o suprimen el consumo de alcohol durante la gestación, se estima que hasta un 25-50% de las mujeres embarazadas en la Unión Europea continúan consumiéndolo durante este período [OMS, 2006].

El consumo de alcohol étlico durante el embarazo puede afectar directamente al feto, ya que esta sustancia tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria. El alcohol provoca principalmente un retraso en el crecimiento intrauterino dando lugar a recién nacidos de bajo peso, así como anomalías congénitas (especialmente en boca y tracto genitourinario),

irritabilidad, retraso intelectual y, en los casos más graves, el Síndrome de Alcoholismo Fetal (FAS, Fetal Alcohol Syndrome).

El síndrome alcohólico fetal es en España la tercera causa de retraso mental grave y la más fácilmente evitable. Las anomalías craneofaciales incluyen alteraciones oculares como cavidades oculares pequeñas, ptosis palpebral y estrabismo, nariz pequeña con puente nasal ancho, y labio superior grande. Las alteraciones del sistema nervioso central incluyen numerosos defectos estructurales y funcionales cuyas consecuencias son microcefalia, hipoplasia del nervio óptico, disminución de la agudeza auditiva, dificultad de aprendizaje y retraso mental [Parés y col., 2002].

I.I.1.5. Intoxicación etílica aguda

La intoxicación etílica aguda (IEA) es un síndrome clínico producido por el consumo de bebidas alcohólicas de forma rápida y en cantidad superior a la tolerancia individual de la persona. La CIE-10 (Clasificación Internacional de Enfermedades, décima versión) lo define como aquel estado transitorio consecutivo a la ingesta y asimilación de alcohol que produce alteraciones a nivel de conciencia, de la cognición, de la percepción, del estado afectivo, del comportamiento o de otras funciones y respuestas fisiológicas o psicológicas.

Se ha de tener en cuenta que el alcohol actúa como depresor del sistema nervioso central; su acción va a estar relacionada con la dosis, de tal manera que, salvo casos particulares, a bajas dosis actúa como desinhibidor mientras que a altas dosis el efecto depresor será evidente. Así pues, pocos minutos después de haber ingerido bebidas alcohólicas, pueden aparecer una serie de efectos, cuya manifestación varía según la cantidad ingerida y las características de cada persona.

Por orden de aparición en el tiempo y en relación con la concentración de alcohol en el organismo, estos efectos serían los siguientes:

- Desinhibición
- Euforia
- Relajación
- Aumento de la sociabilidad
- Dificultad para hablar
- Dificultad para asociar ideas
- Descoordinación motora

Además de la cantidad consumida, también existen otras circunstancias que pueden acelerar o agravar los síntomas, como son: la edad, el peso y el sexo, la cantidad y rapidez de la ingesta, la combinación con bebidas carbónicas, la ingestión simultánea de comida y la combinación con otras sustancias [PNsD, 2007; Calabuig y col., 2004].

La IEA es el trastorno orgánico más común inducido por alcohol y la intoxicación aguda más frecuente en nuestro país. Afecta al 1.1% de la población, sobre todo varones entre los 19-28 años [Izquierdo, 2002].

I.I.1.6. Alcoholismo crónico

El consumo crónico y de grandes cantidades o excesivo provoca dependencia (el etanol constituye, junto con la morfina y los barbitúricos la tríada de mayores productores de dependencia), con trastornos de ansiedad, cuadros depresivos, trastornos de sueño, trastornos sexuales y deterioro psicoorgánico. Al interrumpir el consumo se manifiesta un fuerte síndrome de abstinencia y el llamado delirium tremens, caracterizado por obnubilación, insomnio, agitación y alucinaciones visuales, auditivas, táctiles y olfatorias. Este tipo de consumo alto y reiterado origina lesiones en los distintos órganos y

sistemas, como por ejemplo en el hígado, sistema cardiocirculatorio, musculatura esquelética, sistema nervioso central (SNC), riñón, sistema endocrino, sistema inmunitario y cáncer [Calabuig y col., 2004; Repetto y col., 2009].

I.I.1.7. Síndrome de dependencia

El diagnóstico del síndrome de dependencia tiene una gran importancia médico-legal, ya que diferentes legislaciones aluden a esta circunstancia o bien al estado clínico asimilable a la dependencia.

Se trata de un diagnóstico clínico, que se hace en función de distintos elementos: la valoración de la exploración clínica, los resultados analíticos y, fundamentalmente, la valoración de la actitud y vivencia del individuo frente al alcohol. La CIE-10 considera que el diagnóstico de dependencia sólo debe hacerse si en algún momento de los doce meses previos o de un modo continuo han estado presentes tres o más de los siguientes rasgos:

- Deseo intenso de consumir una sustancia
- Disminución de la capacidad para controlar el consumo de una sustancia o alcohol
- Síntomas somáticos de un síndrome de abstinencia cuando el consumo de la sustancia se reduce o cesa
- Tolerancia
- Abandono progresivo de otras fuentes de placer o diversiones
- Persistencia en el consumo a pesar de problemas relacionados con el alcohol

Mentalmente, la dependencia ocasiona un progresivo deterioro de las funciones psíquicas, conduciendo a la demencia en un grado más o menos elevado. Lo primero que se detecta es un cambio en el comportamiento y en los

modos de reacción del individuo alcohólico. Se produce un deterioro cognitivo que va avanzando con el tiempo y se estrecha el círculo de sus intereses vitales, reduciéndose a la búsqueda de alcohol. Pueden producirse también episodios psicóticos conocidos como psicosis alcohólica, destacando por su frecuencia de aparición el delirium tremens, alucinosis alcohólica, delirio de celos y síndrome de Korsakoff [Calabuig y col., 2004; Repetto y col., 2009].

I.I.2. Alcohol

I.I.2.1. Propiedades químicas

El alcohol etílico o etanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, es un líquido incoloro, volátil e inflamable, con un marcado carácter polar que le confieren los grupos $-\text{OH}$. Pertenece al grupo de los alcoholes alifáticos de cadena corta.

Se trata de una molécula anfipática, aunque se disuelve mejor en el agua que en los lípidos. Su volumen de distribución (V_d) es de 0.6 L/Kg, semejante al del agua en el organismo. La molécula del etanol difunde a través de las membranas celulares fácilmente y es absorbido por el tracto gastrointestinal rápidamente [Barile, 2010]. Debido a su estructura y pequeño tamaño puede atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica y placentaria distribuyéndose por todas las células y tejidos [OMS, 2006]. Su aporte energético es de 7.1 Kcal/g.

I.I.2.2. Farmacocinética del etanol

I.I.2.2.1. Absorción

La absorción del etanol en el organismo se puede producir de diferentes maneras (vía dérmica, inhalatoria o intravenosa) pero, de forma prácticamente exclusiva, el etanol es consumido por vía oral (el 100% del etanol ingerido es absorbido y está disponible farmacológicamente).

La absorción del etanol se produce en el tracto digestivo, principalmente en el intestino delgado, debido a que en este órgano la presencia de microvellosidades aumenta de forma notable la superficie de absorción.

Existen una serie de factores que parecen tener importancia en dicho proceso. Entre ellos cabe destacar:

- Tipo de bebida alcohólica consumida. Las bebidas carbonatadas aumentan la absorción; por el contrario, las grasas la ralentizan.
- Nivel de concentración de las bebidas alcohólicas. Existe una relación de U invertida entre la concentración de la bebida y la velocidad de absorción, alcanzando su nivel máximo cuando la concentración de etanol se sitúa en torno a un 40%.
- Enfermedades que afecten a la función gastrointestinal. Aquellas enfermedades que aumenten la motilidad del tracto gastrointestinal aumentarán también la velocidad de absorción y viceversa.
- Presencia de alimentos en el estómago. Provoca un retraso en la absorción.
- Consumo de tabaco, junto con el consumo de etanol parece producir una reducción de la concentración máxima de etanol, posiblemente debido a que enlentece el tránsito del paso de etanol desde el estómago al intestino.

1.1.2.2.2. Distribución

Una vez que el etanol ha sido absorbido en el intestino delgado se produce su paso al torrente sanguíneo mediante un proceso de difusión simple.

El etanol se distribuye también por otros tejidos o fluidos del organismo dependiendo de su contenido en agua: la concentración del etanol será mayor cuanto mayor sea el contenido en agua. También se encuentran diferencias en cuanto a la distribución del etanol en plasma o en sangre total. El plasma contiene entre un 12 y 20% más de agua que la sangre total, lo que produce que la concentración de etanol en el primero sea mayor que en la segunda.

Otra de las matrices biológicas tradicionalmente utilizada para la determinación de la concentración de alcohol es la orina. Alrededor del 20% de la sangre que entra en el riñón se filtra, la cual es reabsorbida en buena parte (menos del 1% es excretado).

Dado que el etanol presenta una mayor solubilidad en agua que en medios lipídicos esto origina posibles diferencias en la distribución del etanol entre dos individuos con diferente proporción de grasa corporal, aún cuando la cantidad ingerida de esta sustancia y su peso corporal sean idénticos. Así, los V_d entre hombres y mujeres serán diferentes (0.7 L/Kg en hombres y 0.6 L/Kg en mujeres) debido a las diferencias genéticas en la cantidad de grasa.

Por otra parte, el etanol cruza sin dificultad la barrera placentaria y la barrera hematoencefálica. Con idéntica facilidad, el etanol accede a los pulmones desde el torrente sanguíneo y se vaporiza en el aire a una velocidad constante, siendo por ello posible determinar la concentración plasmática del alcohol a partir de los niveles contenidos en el aire exhalado.

1.1.2.2.3. Eliminación

La mayor parte de la eliminación del etanol ocurre vía metabólica, pero existe un pequeño porcentaje de etanol que se elimina por medio de otras rutas sin sufrir transformación alguna (a través de la orina, las heces, el sudor y el aire exhalado). De hecho, para las dosis y concentraciones de etanol consumidas habitualmente, sólo el 1% de la eliminación está ligada a factores no metabólicos.

Existen varias cifras que marcan las velocidades y tasas de eliminación de etanol entre diferentes sujetos, pero se suele considerar que la media de la población elimina entre 6-8 gramos/hora. Aquí no parece que la edad o el sexo sean factores determinantes, pero sí parecen serlo la asiduidad de los episodios

de bebida, ya que conforme aumenta ésta, también aumentará la capacidad metabólica y de eliminación del etanol. Además, existen otros factores que parecen repercutir en dicha eliminación, como son: factores genéticos, enfermedades hepáticas, consumo de azúcares, capacidad metabólica, anticonceptivos orales y otros fármacos, y consumo de tabaco [Aragón y col., 2002; Levine, 2003; Barile, 2010].

❖ Metabolismo del etanol

El alcohol es eliminado del organismo por varias rutas metabólicas oxidativas y no oxidativas.

Rutas oxidativas

Las enzimas que forman parte en este proceso son:

▪ ADH (alcohol deshidrogenasa)

La enzima citosólica ADH es la encargada de catalizar la conversión reversible del alcohol a acetaldehído, un subproducto altamente reactivo y tóxico que puede contribuir a dañar los tejidos y, posiblemente, al efecto adictivo del alcohol. Este proceso oxidativo involucra un transporte de electrones mediante NAD⁺ (Nicotinamida-Adenín-Dinucleótido), pasando a su forma reducida. Como resultado de este proceso, las células del hígado están más predispuestas a sufrir daños por la aparición de subproductos como el acetaldehído y los radicales libres. Este tipo de oxidación contribuye al 90-95% de la eliminación del etanol en bebedores sociales.

▪ Citocromo P450

Este segundo tipo de metabolismo oxidativo, localizado en el retículo endoplasmático liso del hígado, se denomina sistema microsomal

oxidativo del etanol (MEOS). Forma parte de la familia de los citocromos microsomales P450, siendo la forma más común de nombrarlo P450 CYP2E1. La vía microsomal se estimula con el aporte etílico prolongado y puede producir, incluso en ausencia de alcohol, cantidades de agentes oxidantes (superóxido o peróxido de hidrógeno) que dañan la membrana celular. Por lo tanto, este citocromo adquiere importancia ante niveles muy elevados de alcohol o alguna deficiencia en el sistema principal, ya que la enzima ADH se satura fácilmente al tener una constante de Michaelis-Menten (K_m) muy baja. Además, la oxidación puede ocurrir también en otros tejidos, como por ejemplo en el cerebro. Contribuye con el 5-10% a la oxidación del etanol en bebedores sociales, pero aumenta hasta el 25% en bebedores crónicos.

- Catalasa

Esta enzima, localizada en los peroxisomas de las células, es capaz de oxidar el etanol in vitro en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Su contribución es mínima.

El acetaldehído producido por cualquiera de estas tres vías es posteriormente metabolizado a acetato y NADH en las mitocondrias, principalmente por medio de ALDH2 (aldehído deshidrogenasa). Tiene la capacidad de unirse a proteínas y también de formar aductos, lo que puede contribuir a la dependencia alcohólica. El acetato se convierte en CO_2 . Puede causar un aumento del flujo sanguíneo, depresión del SNC y/o afectar a varios procesos metabólicos. También se puede transformar a AcetilCoa, el cual está implicado en la biosíntesis de los lípidos y el colesterol (Figura 2) [Sanchís y col., 1999].

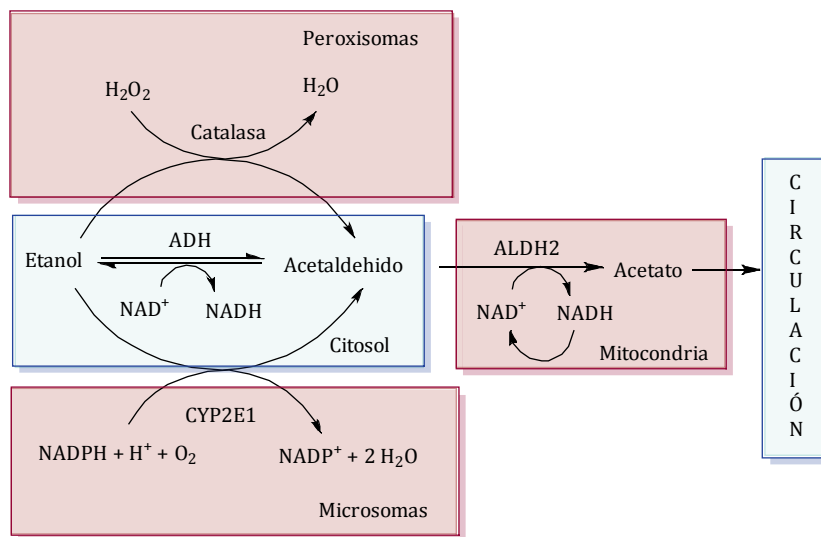


Figura 2. Metabolismo oxidativo del etanol (Figura adaptada de Zakhari, 2006).

Rutas no oxidativas

Se consideran rutas minoritarias, aunque sus productos tienen cierta importancia. Existen al menos 4 rutas no oxidativas.

- 1) Formación de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEEs) mediante la reacción del alcohol con los ácidos grasos. Se pueden detectar en plasma y otros tejidos después de la ingesta de alcohol y persisten aún después de desaparecer el etanol del organismo. El daño que provoca la presencia de estas moléculas en los tejidos no está todavía muy estudiado.
- 2) Formación de fosfolípidos, conocidos como fosfatidiletanol. Por medio de la enzima fosfolipasa D se descomponen los fosfolípidos dando lugar a la formación del ácido fosfatídico. Esta reacción ocurre predominantemente cuando hay grandes concentraciones de alcohol en sangre. El fosfatidiletanol es pobremente metabolizado, acumulándose hasta alcanzar niveles elevados.
- 3) El tercer metabolito minoritario es el etilglucurónido (EtG), formándose en el hígado cuando reacciona con el ácido glucurónico. Es fácilmente excretable a través de la orina.
- 4) El último conjugado del etanol es el etilsulfato (EtS). También se trata de un metabolito

minoritario excretado por la orina [Zakhari, 2006; Maenhout y col., 2013]. Estas cuatro rutas metabólicas no oxidativas aparecen representadas en la Figura 3.

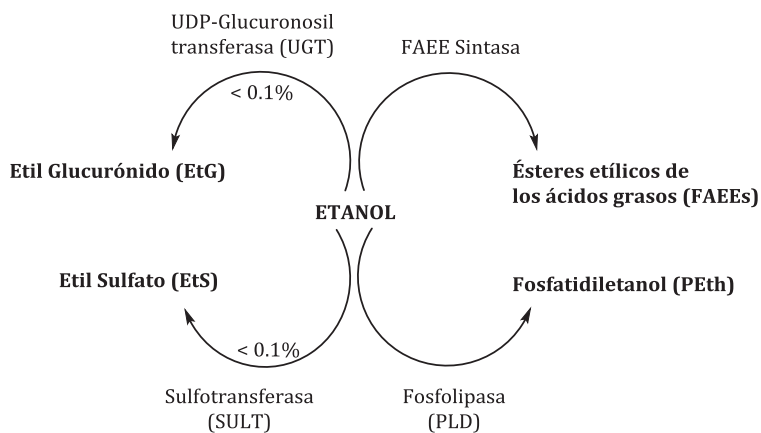


Figura 3. Metabolismo no oxidativo del etanol (Figura adaptada de Maenhout y col., 2013).

Referencias bibliográficas

Álvarez J.; Cabezas M.; Colom J.; Galán I.; Gual A.; Lizarbe V.; Rodríguez A. Prevención de los problemas derivados del alcohol. 1ª Conferencia de prevención y promoción de la salud en la práctica clínica en España. Ministerio de Sanidad y Consumo (2007).

Alwan A. Global status report on alcohol and health. World Health Organization (WHO) (2011).

Anderson P.; Baumberg B. El alcohol en Europa. Una perspectiva de salud pública. Institute of Alcohol Studies. Reino Unido (2006).

Aragón C.; Miquel M.; Correa M.; Sanchis-Segura C. Alcohol y metabolismo humano. Adicciones 14 (1):23-42 (2002).

Barile A. Clinical Toxicology. Principles and mechanisms. Informa Healthcare (2010).

Comité de expertos de la OMS en problemas relacionados con el alcohol. Segundo informe. Serie de Informes Técnicos 944. Organización Mundial de la Salud. Ginebra (2006).

Encuesta domiciliaria sobre alcohol y drogas en España (EDADES) 2009/2010. Plan Nacional sobre Drogas. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad 2010.

Estruch R. Efectos del alcohol en la fisiología humana. Adicciones 14 (1):43-61 (2002).

Gisbert Calabuig J.A.; Villanueva Cañadas E. Medicina legal y toxicología 6ª Edición (2004).

Guía de drogas. Plan Nacional sobre Drogas. Ministerio de Sanidad y Consumo (2007).

Izquierdo M. Intoxicación alcohólica aguda. Adicciones 14 (1):175-193 (2002).

Levine B. Principles of Forensic Toxicology. Second Edition. AACCPress (2003).

Maenhout T.; De Buyzere M.; Delanghe J. Non-oxidative ethanol metabolites as a measure of alcohol intake. Clin Chim Acta 415:322-329 (2013).

Megías E.; Ballesteros J.C.; Conde F.; Elzo J.; Laespada T.; Megías I.; Rodríguez E. Adolescentes ante el alcohol. La mirada de padres y madres. Fundación “La Caixa” (2007).

Parés A.; Caballería J. Patología orgánica. Adicciones 14 (1):155-173 (2002).

Pascual F. Percepción del alcohol entre los jóvenes. Adicciones 14 (1):123-131(2002).

Plan de acción sobre prevención y control del daño asociado al consumo de alcohol en menores y poblaciones vulnerables 2010-2014. Plan Nacional sobre Drogas. Ministerio de Sanidad y Política Social.

Repetto M.; Repetto G. Toxicología Fundamental. Díaz de Santos 4ª edición (2009).

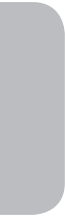
Sanchís Fortea M.; Cueves Badenes J.; Sanchís Arnau M.A. Enzimas del metabolismo del etanol. Su posible contribución a la predisposición genética del alcoholismo. *Adicciones* 11 (2):115-126 (1999).

Zakhari S. Overview: How is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Research & Health* 29 (4): 245-254 (2006).

CAPÍTULO I.II: MARCADORES DEL CONSUMO DE ALCOHOL

CHAPTER I.II: Biomarkers of alcohol consumption

I.II.1. Marcadores de exposición al alcohol etílico	49
I.II.1.1. Introducción	49
I.II.1.2. Definición y características de los biomarcadores	50
I.II.1.3. Tipos de biomarcadores	51
❖ FAEEs	53
❖ EtG	56
❖ PEth	57
Referencias bibliográficas	59



I.II.1. Marcadores de exposición al alcohol étílico

I.II.1.1. Introducción

Como ya se ha mencionado anteriormente, el consumo de alcohol es una costumbre muy arraigada en España y, en general, se puede hablar de un consumo socialmente aceptado por la mayoría de los países, independientemente de las implicaciones que ello conlleva para la salud. Esta situación desencadena la necesidad de buscar unos marcadores adecuados que permitan discriminar entre los diferentes consumos del alcohol (abusivo o social) y verificar la abstinencia después de un período de consumo excesivo del alcohol.

Para el diagnóstico del consumo abusivo de alcohol se utilizan diversos métodos, entre los que destacan el interrogatorio del paciente y sus allegados, los cuestionarios más o menos complejos y una serie de pruebas de laboratorio. Existen varios cuestionarios de detección del consumo de alcohol, como por ejemplo, test de CAGE (Chronic Alcoholism General Evaluation); Cuestionario MALT (Münchner Alkoholismus Test); Cuestionario AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test) o el cuestionario ISCA (Interrogatorio Sistematizado de Consumos Alcohólicos) que permiten detectar problemas relacionados con el alcohol [Betancourt y col., 2000; Guardia y col., 2008]. Sin embargo, este tipo de recursos carecen de una buena sensibilidad, por lo que no son suficientes para detectar un consumo incontrolado de alcohol. Deberían ser considerados como material complementario. Son necesarias medidas más objetivas, como la realización de análisis de laboratorio que ayuden a confirmar un consumo de alcohol.

Los análisis tradicionales para demostrar un consumo de etanol se realizan principalmente en sangre y orina. Sin embargo, ambas muestras tienen el mismo problema, una ventana de detección pequeña, mostrando consumos

de esta sustancia sólo en las últimas 24-48 horas. Se necesitan otras muestras biológicas que permitan unas ventanas de detección más amplias. Éste es el caso del pelo o del meconio; sin embargo, en estas muestras no es posible la determinación de etanol. Esto hace necesario el estudio de biomarcadores del alcohol como los ya mencionados, productos del metabolismo no oxidativo, que tienen una vida media mucho más larga que la del etanol. En la actualidad no existe un marcador definitivo que permita asegurar con total fiabilidad las cantidades de alcohol ingeridas. Los laboratorios que realizan estos análisis normalmente determinan varios marcadores para poder dar un resultado lo más fiable posible [Maenhout y col., 2013].

I.II.1.2. Definición y características de los biomarcadores

Los marcadores biológicos, biomarcadores o bioindicadores se pueden definir como *“aquellos parámetros que pueden utilizarse para identificar un efecto tóxico en un organismo, y pueden permitir la extrapolación interespecies”*. Otra posible definición sería, *“indicadores que señalan un acontecimiento o una situación en una muestra o sistema biológico y proporcionan una medida de la exposición, el efecto o la susceptibilidad”* [Repetto y col., 2009].

Los biomarcadores deben tener las siguientes características:

- Alta sensibilidad y especificidad.
- Ser aptos para análisis rutinario.
- Servir tanto para el diagnóstico del consumo de alcohol como para el control de la abstinencia de los pacientes sometidos a tratamiento de deshabituación [Betancourt y col., 2000].

I.II.1.3. Tipos de biomarcadores

Se pueden diferenciar dos grandes grupos de marcadores del etanol:

Marcadores de rasgo: Informan sobre la posible predisposición genética a un abuso del alcohol y al alcoholismo. Este tipo de marcadores deberían satisfacer 3 criterios: a) ser hereditario; b) estar relacionado con el alcoholismo en la población en general y c) ser independiente del grado de alcoholismo que sufra el individuo. Su determinación en sangre o plasma podría verse alterada por causas patógenas [Peterson, 2005, Jurado, 2009]. Algunos de ellos son:

- Actividad de la adenil-ciclasa
- Ácido γ -aminobutírico (GABA)
- Dopamina
- B-endorfina
- Serotonina

Marcadores de estado: Informan sobre un posible consumo de alcohol. Estos marcadores pueden clasificarse en dos grupos, directos o indirectos. Cada uno de estos a su vez se clasifica en marcadores de consumo actual o reciente y marcadores de consumo crónico [Peterson, 2005].

A. Marcadores directos

Este tipo de marcadores derivan de la molécula de etanol, siendo metabolitos minoritarios de la misma, que todavía contienen sus dos átomos de carbono, o incluso pueden ser la propia molécula del etanol. Su determinación en sangre, orina o plasma tiene un tiempo de detección muy corto [Jurado, 2009].

Marcadores de consumo reciente

- Etanol en orina o sangre
- Etilglucurónido en orina o sangre
- FAEEs en plasma
- Etilsulfato y etilfosfato en orina o sangre
- Fosfatidiletanol en sangre
- Cocaetileno en orina o sangre

Marcadores de consumo crónico

- FAEEs en pelo o meconio
- EtG en pelo o meconio
- Cocaetileno en pelo
- Aductos de acetaldehído de proteínas en pelo
- B-carbolinas en pelo

B. Marcadores indirectos

Se originan por alteraciones patológicas o metabólicas ocasionadas por el consumo excesivo de alcohol [Jurado, 2009].

Marcadores de consumo reciente

- 5-hidroxitriptofol (5-HTOL)
- Ácido 5-hidroindol-3-acético (5-HIAA)

Marcadores de consumo crónico

- GGT (gamma glutamil transpeptidasa)
- AST (aspartato aminotransferasa)

- ALT (alanina aminotransferasa)
- CDT (transferrina carbohidrato-deficiente)
- Beta-Hex (N-acetyl- β -hexosaminidasa)
- MCV (volumen corpuscular medio de los hematíes)

Existen otros marcadores como:

- SIJ (índice de ácido siálico de la apolipoproteína J)
- TSA (ácido siálico total)

Durante décadas, la búsqueda de marcadores del consumo crónico de alcohol ha sido un tema de investigación con gran trascendencia desde el punto de vista tanto forense como clínico. Hoy en día se continúa con la búsqueda de un biomarcador que permita medir diferentes aspectos del consumo de alcohol y obtener unos resultados exactos, precisos, sensibles y específicos. Este hallazgo permitiría mejorar las técnicas de detección a la vez que desarrollar un tratamiento para la dependencia al consumo de alcohol. Mientras tanto, una combinación de varios marcadores parece ser la opción más recomendada.

❖ FAEEs (Fatty acid ethyl esters)

Los FAEEs son un grupo de más de 20 compuestos diferentes con carácter lipofílico y estables a pH neutro. Pueden ser determinados en pelo, pero hay que tener en cuenta la sensibilidad que muestran ante los tratamientos capilares a pH alcalinos [SoHT, 2012].

Su formación tiene lugar principalmente en el hígado y en el páncreas mediante una esterificación enzimática del etanol con ácidos grasos libres, triglicéridos, lipoproteínas y fosfolípidos, empleando dos tipos de enzimas: FAEE sintasa y acil-CoA/etanol O-acil-transferasa (AEAT) (Figura 4).

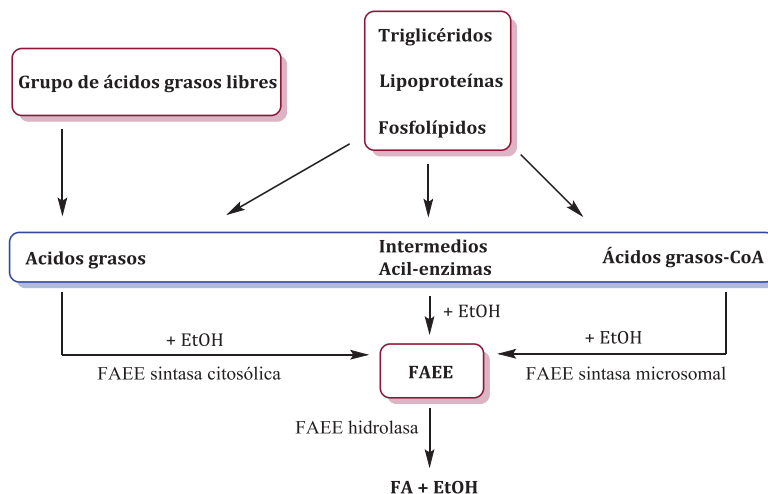


Figura 4. Rutas de formación e hidrólisis de los ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs) (Figura adaptada de Pragst, 2007).

Los FAEEs pueden ser detectados en diferentes matrices biológicas como la sangre, el pelo o el meconio. En la sangre se pueden detectar hasta 24 horas después del último consumo de alcohol o hasta 99 horas después en caso de bebedores abusivos; es por ello que esta matriz es útil para un consumo reciente. Por el contrario, para establecer un consumo crónico se emplean otras matrices biológicas, como es el caso del pelo. Los FAEEs son también empleados como biomarcadores en la exposición prenatal al alcohol usando como matriz el meconio. Representan una medida directa de la exposición al alcohol durante el embarazo ya que, una vez que el etanol atraviesa la placenta, se van acumulando en el meconio del feto, desde la doceava semana de gestación hasta el parto. Los FAEEs son también usados como marcadores postmortem en el hígado (hasta 24 horas) o en el tejido adiposo (hasta 12 horas) debido a la posible formación endógena en la sangre [Peterson, 2005].

En general, se usa la suma de las concentraciones de cuatro ésteres etílicos (etil miristato, palmitato, oleato y estearato) para diferenciar entre

consumo ocasional y consumo abusivo [SoHT, 2012], estableciéndose como cut-off 0.4-0.6 ng/mg para el caso del pelo. Si el valor de la suma de las concentraciones es inferior al cut-off establecido se tratará de consumidores ocasionales o de abstemios. Se debe tener especial cuidado en la interpretación de los resultados obtenidos puesto que hay factores que pueden influir en el resultado y deben ser tenidos en cuenta, como son el uso de lociones que contengan alcohol y ocasionen un resultado falso positivo, contaminación ambiental, ingesta de determinados alimentos o un pequeño porcentaje que procede de su formación endógena en el organismo [Pragst y col., 2006; Gareri y col., 2011; Joya y col., 2012; Suesse y col., 2012].

En este trabajo se han elegido para su estudio el etil miristato (E14), el etil palmitato (E16) y el etil estearato (E18) (Figura 5).

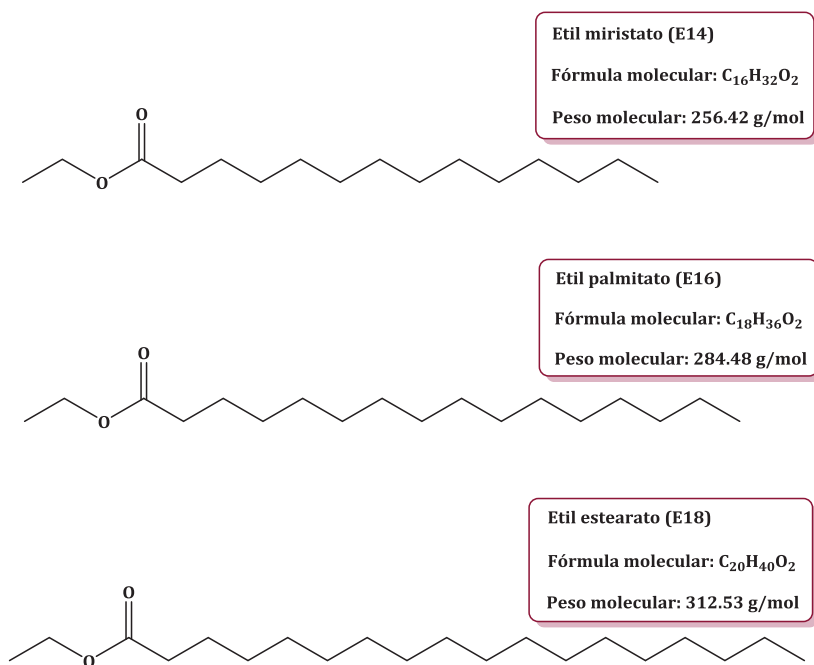


Figura 5. Ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs) estudiados en esta Tesis Doctoral.

La SoHT (Society of Hair Testing) establece que el estudio de los FAEEs debe ser complementado con otro marcador y, según este mismo organismo, el más adecuado será el EtG [SoHT, 2012].

❖ EtG (Ethyl β -D-6-glucuronide; $C_8H_{14}O_7$)

Este metabolito minoritario del etanol fue descrito por Kamil y col. en 1952 y su uso como posible biomarcador del consumo de alcohol fue investigado principalmente por Skopp y col [Kamil y col., 1952].

Se trata de una molécula polar, hidrofílica, ligeramente ácida (pKa 3.21), no volátil y estable pero sensible a los tratamientos cosméticos. Su peso molecular es de 222.1945 g/mol y su punto de ebullición es 150 °C [Weinmann y col., 2004; Pragst y col., 2006; SoHT, 2012].

La biotransformación del etanol a EtG tiene lugar en el retículo endoplasmático de las células hepáticas y, en menor proporción, en las células de la mucosa intestinal y en el pulmón.

La reacción del etanol con el ácido glucurónico(que transforma las moléculas en otras más solubles para facilitar su eliminación del organismo), y la enzima UDP-glucuronosiltransferasa (UGT), da lugar a la formación de EtG, pero sólo un pequeño porcentaje es metabolizado por esta vía [Peterson, 2005](Figura 6).

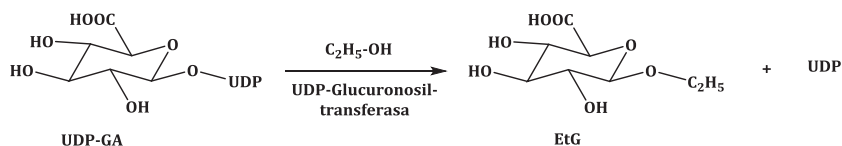


Figura 6. Reacción de formación del etil glucurónido (EtG) (Fuente: Pragst, 2007).

El EtG puede ser detectado en varias matrices biológicas, tanto en las consideradas matrices tradicionales (sangre y orina) como en las matrices alternativas (pelo y meconio), y también en tejidos postmortem (hígado, tejido adiposo, cerebro, etc.). Su eliminación a través de la orina supone aproximadamente el 0.02-0.06% de la cantidad total de alcohol consumido. Esta vía de eliminación resulta de gran interés, ya que permite su detección hasta pasados 3-5 días de la completa eliminación del alcohol del organismo. En la sangre, se detecta hasta 36 horas. Por otra parte, su análisis en pelo se utiliza para determinar un consumo crónico de alcohol, aunque su incorporación a esta matriz es pobre debido a sus propiedades químicas (el pelo tiene unas características básicas y carácter lipofílico) [Pragst et al., 2000].

La SoHT, durante su reunión en Roma en el año 2009, establecía un cut-off para pelo de 30 pg/mg. En su siguiente reunión en el año 2012 ya proponían que una concentración mayor o igual a 7 pg/mg significaría un fuerte consumo de alcohol [SoHT 2009; SoHT, 2012].

❖ PEth (Fosfatidiletanol)

Fue descubierto por Gustavsson en 1995. Engloba un grupo de fosfolípidos debido a que está formado por un grupo fosfoetanol no polar común y 2 cadenas de ácidos grasos, normalmente con cadenas hidrocarbonadas de 16, 18 o 20 carbonos. Las numerosas combinaciones de las cadenas hidrocarbonadas y de los dobles enlaces posibilita la formación de un gran número de especies (24 especies), siendo las especies predominantes 16:0/18:1 y 16:0/18:2 (número de C:número de dobles enlaces) [Helander y col., 2009].

Se forma en las membranas celulares solamente en presencia de etanol, lo que le confiere una gran importancia como marcador.

La reacción del etanol con la fosfatidilcolina (PC) es catalizada por la enzima fosfolipasa D (PLD) dando lugar a PEth. Sin embargo, si no hay consumo de alcohol, la enzima da lugar a ácido fosfatídico (PA) y colina (Figura 7).

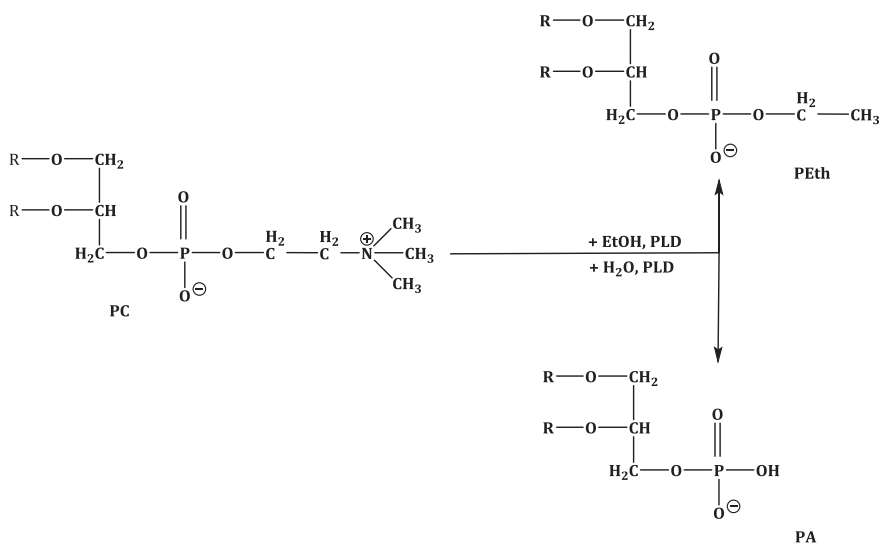


Figura 7. Reacción de formación del fosfatidiletanol (PEth) (Figura adaptada de Pragst y col., 2000).

Su velocidad de degradación es lenta en comparación con su velocidad de formación.

Este biomarcador se puede encontrar en los eritrocitos de la sangre con una vida media de aproximadamente 7 días. Si se trata de consumo crónico de alcohol, se pueden encontrar concentraciones altas de PEth en sangre hasta después de 29 días.

Para evitar la formación endógena de PEth, las muestras deben ser guardadas a -80 °C, ya que la enzima PLD es altamente activa a bajas temperaturas [Maenhout y col., 2013].

Referencias bibliográficas

- Betancourt Pulsan A.; Cuevas Badenes J.; Terrado Quevedo S.; Valls Álvarez M. Marcadores biológicos en alcohólicos abstinentes. *Adicciones* 12 (1):137-143 (2000).
- Consensus of the Society of Hair Testing (SoHT) on hair testing for chronic excessive alcohol consumption 2009.
- Gareri J.; Appenzeller B.; Walasek P.; Koren G. Impact of hair care products on FAEE hair concentrations in substance abuse monitoring. *Anal Bioanal Chem* 400 (1):183-188 (2011).
- Guardia J.; Jiménez Arriero M.A.; Pascual Pastor F. Flórez Menéndez E. Contel Guillamón M. Alcoholismo. Guías clínicas basadas en la evidencia científica. *Socidrogalcohol*. Segunda edición (2008).
- Gustavsson L. Phosphatidylethanol formation: specific effects of ethanol mediated via phospholipase D. *ESBRA 1994 Award Lecture. Alcohol* 30 (4):391-406 (1995).
- Helander A.; Zheng Y. Molecular species of the alcohol biomarker phosphatidylethanol in human blood measured by LC-MS. *Clin Chem* 55 (7):1395-1405 (2009).
- Joya X.; Friguls B.; Ortigosa S.; Papaseit E.; Martínez S.E.; Manich A. Determination of maternal fetal biomarkers of prenatal exposure to ethanol. A review. *J Pharmaceut Biomed Anal* 69:209-222 (2012).

Jurado C. Marcadores del consumo de alcohol en muestras de pelo. Cuadernos de Medicina Forense. 15 (58):265-278 (2009).

Kamil I.A.; Smith J.N.; Williams R.T. A new aspect of ethanol metabolism: isolation of ethyl glucuronide. Biochem J 51:32-33 (1952).

Maenhout T.; De Buyzere M.; Delanghe J. Non-oxidative ethanol metabolites as a measure of alcohol intake. Clin Chim Acta 415:322-329 (2013).

Peterson Karen. Biomarkers for alcohol use and abuse. A summary. Alcohol Res Health 28(1):30-37 (2005).

Pragst F.; Balikova M.A. State of the art in hair analysis for detection of drugs and alcohol abuse. Clin Chim Acta 370:17-49 (2006).

Pragst F.; Spiegel K.; Sporkert F.; Bohnenkamp M. Are there possibilities for the detection of chronically elevated alcohol consumption by hair analysis? A report about the state of investigation. Forensic Sci Int 107 (1-3):201-223 (2000).

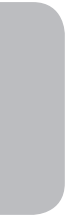
Pragst F.; Yegles M. Alcohol markers in hair. Analytical and practical aspects of drug testing in hair (pp. 287-323). CRC Press. Boca Raton (2007).

Repetto M.; Repetto G. Toxicología Fundamental. Díaz de Santos, 4ª edición (2009).

Suesse S.; Pragst F.; Mieczkowski T.; Selavka C.M.; Elian A.; Sachs H.; Hastedt M.; Rothe M.; Campbell J. Practical experiences in application of hair fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide for detection of chronic alcohol abuse in forensic cases. Forensic Sci Int 218 (1-3):82-91 (2012).

Use of alcohol markers in hair for abstinence assessment 2012. Consensus of the Society of Hair Testing (SoHT).

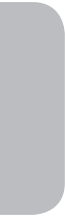
Weinmann W.; Schaefer P.; Thierauf A.; Schreiber A.; Wurst F.M. Confirmatory analysis of ethyl glucuronide in urine by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry according to forensic guidelines. J Am Soc Mass Spectrom 15 (2):188-193 (2004).



CAPÍTULO I.III: MUESTRAS BIOLÓGICAS

CHAPTER I.III: Biological samples

I.III.1. Tipos de muestras biológicas	65
I.III.1.1. El pelo	65
I.III.1.1.1. Composición del pelo	65
I.III.1.1.2. Crecimiento del pelo	66
I.III.1.1.3. Mecanismos de incorporación del alcohol al pelo	67
I.III.1.1.4. Recogida y pretratamiento de la muestra	68
I.III.1.1.5. Ventajas e inconvenientes del uso del pelo como matriz biológica	69
I.III.1.2. El meconio	70
I.III.1.2.1. Composición del meconio	71
I.III.1.2.2. Mecanismos de incorporación del alcohol en el meconio	71
I.III.1.2.3. Ventajas e inconvenientes del uso del meconio como matriz biológica	72
I.III.1.3. La sangre	72
I.III.1.3.1. Composición de la sangre	73
I.III.1.3.2. Almacenamiento y conservación de la sangre	73
I.III.1.3.3. Ventajas e inconvenientes del uso de la sangre como matriz biológica	73
Referencias bibliográficas	75



I.III.1. Tipos de muestras biológicas

I.III.1.1. El pelo

Los primeros análisis de pelo datan de los años 60 pero su uso en las aplicaciones forenses no vendría hasta más tarde, debido a la falta de sensibilidad de los métodos analíticos. No fue hasta 1979 cuando se empleó esta matriz para el estudio de morfina usando radioinmunoensayo (RIA) [Jenkins, 2008]. Hoy en día, a pesar de que el pelo está dentro de las llamadas matrices alternativas, su uso está totalmente integrado en los laboratorios de toxicología forense.

I.III.1.1.1. Composición del pelo

El pelo se forma en el folículo piloso, estrechamente asociado con las glándulas sebáceas y apocrinas. En su composición intervienen componentes morfológicos (cutícula, cortex, médula y membrana celular) y químicos (proteínas 65-95%; agua 15-35%; lípidos 1-9%; pigmentos 0.1-5% especialmente melanina; minerales <1%). La cutícula tiene un papel importante en la detección de sustancias en el pelo, ya que su función es proteger de la agresión del ambiente a las células de la corteza. Puede perderse total o parcialmente debido, por ejemplo, al uso de tratamientos cosméticos influyendo en la fijación y estabilidad de las drogas en el pelo [Jenkins, 2008]. La estructura del pelo se muestra en la Figura 8.

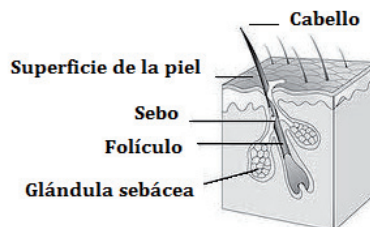


Figura 8. Diagrama simplificado del folículo piloso.

I.III.1.1.2. Crecimiento del pelo

Durante el crecimiento del pelo se alternan períodos de crecimiento activo y de reposo.

El ciclo en los seres humanos empieza con la fase anágena de crecimiento, durante la que se desarrolla el folículo y se forma el pelo. Su duración puede variar extremadamente, oscilando entre 7 y 94 semanas, aunque en algunos casos se puede prolongar durante varios años, dependiendo de la zona anatómica. Después de este período, el folículo entra en una fase de transición, conocida como fase catágena, que dura aproximadamente dos semanas, durante las cuales cesa la actividad folicular, la papila dérmica se retrae y el folículo empieza a degenerarse. De esta manera entra ya en la última fase llamada telógena. Ésta es una fase de reposo que dura unas 10 semanas en la que el crecimiento cesa completamente y el pelo se cae comenzando de esta manera un nuevo ciclo (Figura 9) [Kintz, 2007].

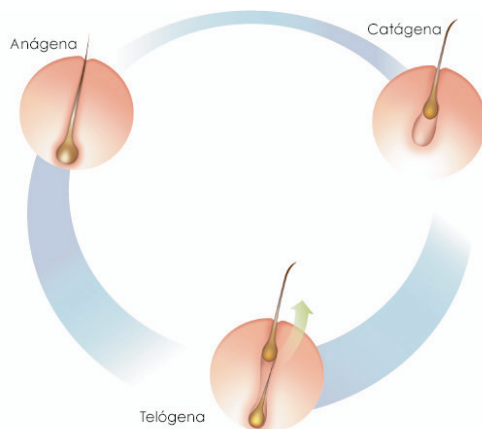


Figura 9. Fases del ciclo de crecimiento del pelo.

La velocidad de crecimiento del pelo del cuero cabelludo se fija aproximadamente en 0.35 mm al día tanto para hombres como para mujeres,

pero esto puede variar enormemente. De acuerdo con las recomendaciones de la SoHT del año 2003, se establece que el pelo crece 1 cm por mes.

La zona occipital del cuero cabelludo es la que presenta menos variabilidad en la velocidad de crecimiento y en la que el número de folículos en fase anágena es más constante, además de estar menos sujeta a variaciones derivadas de la edad o del sexo, motivo por el cual se recomienda tomar la muestra de cabello de esta zona [SoHT, 2003; Jenkins, 2008]. El pelo debe proceder del cuero cabelludo. Si esto no es posible, se procederá a la recogida de otras partes del cuerpo [SoHT, 2003].

I.III.1.1.3. Mecanismos de incorporación del alcohol al pelo

Se han realizado numerosos estudios para explicar los mecanismos de incorporación de las sustancias en el pelo, pero en general se acepta que existen al menos tres mecanismos:

- Difusión activa o pasiva desde la sangre que nutre la papila dérmica
- Difusión a través del sudor y otras secreciones que bañan el pelo
- Deposición de las drogas a través del ambiente

La principal ruta de incorporación de las drogas al pelo todavía resulta una incógnita. Se prefiere hablar de una combinación de las 3 como el modelo más próximo a la realidad. A pesar de esto, se le otorga a la primera ruta más importancia que al resto. Una vez incorporadas las drogas en el pelo, éstas quedan retenidas formando complejos estables y permanentes. La incorporación y la retención dependen principalmente de dos factores: (a) factores que dependen de las características del pelo (cortex, médula y melanina) y (b) factores que dependen de las drogas (pH, liposolubilidad, afinidad por la melanina, etc) [Kintz, 2007].

I.III.1.1.4. Recogida y pretratamiento de la muestra

Los requisitos para una recogida y documentación de la muestra adecuadas son los siguientes:

- Se debe recoger el cabello de la zona occipital del cuero cabelludo. La muestra de pelo se puede tomar de cualquier zona del cuerpo pero se debe tener especial cuidado en la interpretación de los resultados.
- Recoger suficiente cantidad de muestra (se recomienda un mechón del grosor de un lápiz).
- Evitar la contaminación recogiendo la muestra en un ambiente no contaminado.
- Identificar correctamente la muestra indicando sus extremos proximal y distal.
- Indicar la cadena de custodia de la muestra.

Antes de proceder al análisis de las muestras se debe realizar una etapa de pretratamiento:

- Lavado de la muestra: Su finalidad es eliminar la posible contaminación externa, para evitar un resultado falso positivo. En nuestro caso, el pelo se lava con agua y jabón Tween® 20 Molecular biology grade (AppliChem), se aclara y se mete en una estufa a 40°C. Se analiza el último agua de lavado para comprobar que se ha eliminado la posible contaminación externa [Kintz, 2007].
- Pulverización y pesada: Se recomienda cortar la muestra en trozos no superiores a 1 mm o su pulverización en un molino de bolas. El objetivo de este paso es exponer la mayor porción posible de cortex y médula a la acción del agente de extracción. Una vez pulverizadas las muestras hay que pesarlas para poder realizar el estudio cuantitativo [Kintz, 2007; Repetto, 2009].

I.III.1.1.5. Ventajas e inconvenientes del uso del pelo como matriz biológica

❖ Ventajas

El pelo forma parte de las llamadas muestras alternativas, aunque hoy en día su uso está totalmente estandarizado en cualquier laboratorio de análisis toxicológicos. Sus principales ventajas son:

- Amplia ventana de detección.
- Posibilidad de establecer un perfil cronológico del consumo de drogas.
- Posibilidad de establecer si el consumo ha sido elevado, moderado o bajo, a pesar de no poder establecer una correlación directa entre la cantidad de droga consumida y la concentración detectada en el pelo.
- Facilidad de recogida y conservación.

❖ Inconvenientes

- No permite saber si se trata de un consumo homogéneo, lo que implica el desconocimiento de la ingesta de alcohol un día en particular. Los análisis de sangre son los únicos que permiten extrapolar los valores correspondientes al momento en que se recogieron las muestras hasta el momento de los hechos. De esta manera se puede establecer una hipótesis sobre la concentración de la droga en sangre en el momento que nos interesa y deducir, como consecuencia, el posible grado de afectación del individuo en aquel momento.
- Posible influencia de los tratamientos cosméticos. En condiciones normales, la cutícula está intacta y supone una barrera para la pérdida de las drogas incorporadas. Sin embargo, existen algunos tratamientos cosméticos, especialmente los que emplean ácidos o bases fuertes como son la decoloración y la permanente, que pueden ocasionar alteraciones en el pelo: daños en la cutícula, cambios en la estructura molecular de los

pigmentos como la melanina o degradación de las drogas incorporadas, etc. Todo ello se traduce en una disminución de las concentraciones de los tóxicos presentes en el pelo.

- Posible contaminación externa (lavados rigurosos para eliminarla y análisis de los lavados para comprobarlo).
- Diferencias interindividuales en el metabolismo del alcohol, crecimiento del pelo, actividad de las glándulas sebáceas, color del pelo (concentración de melanina) y tratamientos cosméticos.
- Imposibilidad de establecer una correlación directa entre la concentración de la sustancia detectada en la muestra y la dosis consumida [Jurado, 2009].

I.III.1.2. El meconio

Los primeros informes sobre el uso del meconio en la determinación de la exposición fetal a tóxicos datan de 1989, por lo que se trata de una matriz biológica de uso muy reciente en el laboratorio. Hoy día su análisis se realiza en muchos laboratorios, debido a la información que ofrece y a la ventana de detección que muestra.

El meconio es la primera deposición del recién nacido, excretado normalmente entre el primer y quinto día después del nacimiento. Se trata de una materia viscosa de color oscuro formada por la mucosa epitelial, la bilis, el fluido amniótico y las células epiteliales ingeridas por el feto. Contiene alrededor del 60-80% de agua [Bakdash y col., 2010]. Comienza a formarse durante la 12-20 semana de gestación, por lo que puede informar acerca de la historia de consumo de alcohol a partir del segundo trimestre del embarazo [Jenkins, 2008].

I.III.1.2.1. Composición del meconio

El meconio representa el contenido intestinal del feto, proporcionando una historia de las sustancias a las que el feto ha estado expuesto. Es de color verde oscuro debido a la presencia de pigmento biliar. El meconio está formado fundamentalmente de agua, pero también hay otros componentes como:

- Mucopolisacáridos
- Células epiteliales
- Lípidos y proteínas
- Colesterol y precursores del esteroide
- Componentes de la sangre
- Células escamosas
- Enzimas
- Ácidos biliares y sales
- Residuos del fluido amniótico

En ocasiones, el meconio se puede liberar en el útero (disuelto con el líquido amniótico) indicando un signo de sufrimiento fetal. Entre el 12 y el 25% de estos casos se producen por causas desconocidas.

I.III.1.2.2. Mecanismos de incorporación del alcohol en el meconio

El flujo sanguíneo, la ionización de las sustancias y el grado de unión a las proteínas del plasma fetal o materno son factores que afectan a la transferencia de las sustancias a través de la placenta. Existen 2 rutas para la transferencia de las sustancias al feto:

- A. Difusión pasiva de pequeñas sustancias liposolubles a través de la barrera placentaria.
- B. Unión de las drogas y/o metabolitos a las proteínas del líquido amniótico.

I.III.1.2.3. Ventajas e inconvenientes del uso del meconio como matriz biológica

❖ Ventajas

- Amplia ventana de detección (alrededor de 20 semanas de detección) en comparación con la orina materna o fetal, que sólo indica la presencia de sustancias si fueron ingeridas en las 24 ó 48 horas previas a la recogida de las muestras.
- Fácil recogida de la muestra (muestra no invasiva).
- Las drogas son estables en el meconio a temperatura ambiente hasta aproximadamente 2 semanas.

❖ Inconvenientes

- Poca cantidad de muestra.
- Muestra no homogénea.
- Análisis más laboriosos y de mayor duración.
- Diferentes perfiles metabólicos comparado con la orina.
- No hay procedimientos estandarizados para asegurar la calidad del análisis [Jenkins, 2008].

I.III.1.3. La sangre

La sangre es una de las matrices tradicionales empleadas en la toxicología forense. El desarrollo de esta matriz biológica se abordará de manera superficial en esta tesis doctoral al tratarse de una muestra ampliamente estudiada.

El pH de la sangre oscila entre 7.38-7.44. Su densidad es ligeramente mayor a la del agua(1.05-1.06) y su viscosidad es bastante mayor que la de ésta

(3.5-5) debido a la presencia de elementos celulares y a los solutos macromoleculares [Stuart, 2008]. La distribución del alcohol a través de la sangre es función de su contenido en agua [Wigmore, 2011].

I.III.1.3.1. Composición de la sangre

La sangre está formada por una fracción celular, constituida por los elementos formes o celulares (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas), y por una fracción líquida, denominada plasma, que contiene diferentes tipos de proteínas y moléculas hidrosolubles (92% de agua y 8% de proteínas) [Stuart, 2008].

I.III.1.3.2. Almacenamiento y conservación de la sangre

La sangre se debe conservar añadiéndole un conservante y un anticoagulante. Normalmente se utiliza fluoruro sódico (NaF) como conservante (previene la glicolisis) y oxalato potásico como anticoagulante. Una cantidad del 1-2% suele ser suficiente para inhibir la actividad microbiana.

Las muestras deben ser refrigeradas o congeladas si se trata de un almacenaje a largo plazo [Siegel y col., 2000].

I.III.1.3.3. Ventajas e inconvenientes del uso de la sangre como matriz biológica

❖ Ventajas

- Proporcionan información sobre un consumo reciente de alcohol (24-48 horas).
- Amplio abanico de sustancias detectadas.
- Existe correlación entre la concentración del analito en sangre y la cantidad de alcohol consumida, así como con el estado clínico del sujeto.

❖ Inconvenientes

- Ventana de detección temporal pequeña.
- Problemas de falsos positivos o negativos en sangres postmortem.
- Recogida de muestra invasiva.
- Necesita de la adición de conservantes y anticoagulantes y un almacenamiento en frío para su adecuada conservación.

Referencias bibliográficas

Bakdash A.; Burger P.; Goecke T.W.; Quantification of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in meconium from newborns for detection of alcohol abuse in a maternal health evaluation study. *Anal Bioanal Chem* 396 (7):2469-2477 (2010).

Jenkins A. Drug testing in alternate biological specimens. Humana Press (2008).

Jurado C. Marcadores del consume de alcohol en muestras de pelo. *Cuadernos de Medicina Forense*. 15 (58):265-278 (2009).

Kintz P. Analytical and practical aspects of drug testing in hair. Taylor & Francis (2007).

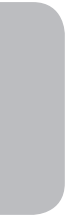
Recommendations for hair testing in Forensic Cases. Society of Hair Testing. (2003).

Repetto, M.; Repetto, G. *Toxicología Fundamental*. Diaz de Santos, 4ª Edición (2009).

Siegel J.; Knupfer G.; Saukko Pekka. *Encyclopedia of Forensic Science*. Three volumen set 1-3. Elsevier Ltd (2000).

Stuart F. *Fisiología humana*. Décima edición. McGraw Hill (2008).

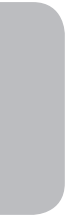
Wigmore J.G. *Wigmore on alcohol*. Courtroom alcohol toxicology for the medicolegal professional. Irwin Law (2011).



CAPÍTULO I.IV: MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

CHAPTER I.IV: Extraction methods

I.IV.1. Técnicas de extracción en muestras biológicas	79
I.IV.1.1. Técnicas tradicionales: extracción en fase sólida (SPE)	79
I.IV.1.1.1. Interacciones adsorbente-analito	80
I.IV.1.1.2. Tipos de fases	81
I.IV.1.2. Técnicas de microextracción	82
I.IV.1.2.1. Microextracción en fase sólida (SPME)	82
I.IV.1.2.1.1. Tipos de SPME	83
I.IV.1.2.1.2. Parámetros que afectan a la SPME	83
I.IV.1.2.2. Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)	86
I.IV.1.2.2.1. Principios de la DLLME	86
I.IV.1.2.2.2. Parámetros que afectan a la DLLME	87
I.IV.1.3. Otras técnicas alternativas: extracción asistida por microondas (MAE)	89
I.IV.1.3.1. Procedimiento de la técnica	89
I.IV.1.3.2. Componentes de la MAE	92
I.IV.1.3.3. Parámetros que afectan a la MAE	94
I.IV.1.3.4. Ventajas e inconvenientes de la MAE (sistema cerrado)	95
Referencias bibliográficas	97



I.IV.1. Técnicas de extracción en muestras biológicas

Antes de la determinación de las sustancias por medio de las técnicas cromatográficas elegidas, es preciso un paso previo de preparación y extracción de las muestras. De esta manera, se consigue eliminar las posibles interferencias de la matriz biológica así como concentrar los analitos de interés.

Existen diferentes técnicas de extracción, desde los métodos convencionales hasta métodos más novedosos.

I.IV.1.1. Técnicas tradicionales: extracción en fase sólida (SPE)

La SPE (solid phase extraction) consiste en un proceso físico en el que están implicados una fase sólida y un líquido. La fase sólida tiene mayor atracción por los analitos que el disolvente en el que se encuentran disueltos. Se pueden conseguir extracciones muy selectivas seleccionando adsorbentes que retengan a los analitos pero no a otros componentes de la muestra. La Figura 10 muestra el proceso de SPE.

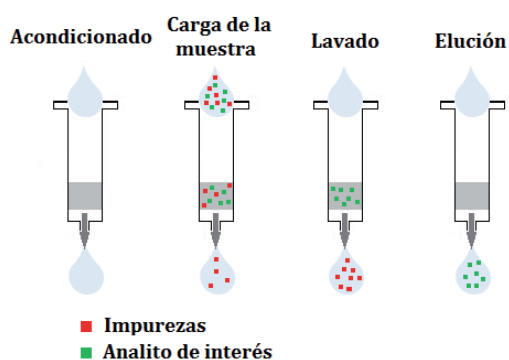


Figura 10. Etapas de la extracción en fase sólida (SPE).

Consiste en cuatro etapas:

- Etapa 1: *Acondicionado del cartucho*. Prepara la fase sólida para que pueda interactuar mejor con la muestra.
- Etapa 2: *Carga de la muestra*.
- Etapa 3: *Lavado*. El adsorbente se lava con un disolvente selectivo, adecuado para eluir las interferencias retenidas, mientras que los analitos permanecen en el lecho adsorbente.
- Etapa 4: *Elución de la muestra* [Simpson, 2000].

I.IV.1.1.1. Interacciones adsorbente-analito

Pueden ser interacciones en fase normal, fase reversa o intercambio iónico.

❖ Interacciones en fase reversa

Se utiliza este tipo de relleno para interacciones por fuerzas de van der Waals o fuerzas de dispersión entre enlaces C-H de los grupos funcionales del adsorbente y los enlaces C-H de los analitos. El adsorbente más utilizado en interacciones en fase reversa es el octadecilsilano, C18, enlazado a la sílice. Su principal problema es la retención de un gran número de moléculas, por lo que se trata de un adsorbente poco selectivo. Sin embargo, es muy efectivo para separar grupos de compuestos de estructuras distintas.

La retención de los analitos por interacciones apolares está favorecida por disolventes polares y la elución por disolventes o mezclas de disolventes con suficiente carácter apolar como para romper las interacciones entre el analito y el adsorbente.

❖ Interacciones en fase normal

Se basa en interacciones polares entre el adsorbente y los analitos por medio de enlaces por puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, interacciones dipolo-dipolo inducido, π - π y otras interacciones en las cuales la distribución de electrones entre los átomos individuales de los grupos funcionales es distinta, originando polaridad positiva y negativa. Estas interacciones están presentes en grupos hidroxilo, aminas, carbonilos, anillos aromáticos, sulfhidrilos, dobles enlaces y grupos que contienen heteroátomos como O, N, S y P.

❖ Intercambio iónico

Este último tipo de interacciones tiene lugar entre una molécula del analito con carga positiva o negativa y los grupos cambiadores del adsorbente con carga opuesta a la del analito. Puede darse en: (a) grupos catiónicos (aminas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias, cationes inorgánicos) y/o (b) grupos aniónicos (ácidos carboxílicos y sulfónicos, fosfatos y otros grupos similares). Estos grupos estarán cargados o no dependiendo del pH del disolvente en el que se encuentren. Por este motivo, tanto el adsorbente como el disolvente deben estar a un pH donde ambos estén cargados y no debe haber otras especies iónicas de la misma carga que el analito con concentraciones elevadas, ya que competirían con éste.

La fuerza iónica juega también un papel muy importante en este tipo de interacciones entre el analito y el adsorbente. Así, una fuerza iónica baja facilita la retención del analito y una alta la dificulta.

I.IV.1.1.2. Tipos de fases

Las fases sólidas más utilizadas en SPE son el carbón activo, la alúmina, la sílica gel, el silicato de magnesio (Florisil), las sílices enlazadas (fase reversa:

C18 es la fase más usada; o fase normal) y los polímeros como estireno-divinilbenceno. En nuestro caso, para el desarrollo de uno de los métodos que se expondrá más adelante, se han empleado las columnas Oasis® MAX de Waters®. Las fases de este tipo de columnas combinan las propiedades adsorbentes de la fase HLB con las características de un cambiador aniónico (con grupos amina cuaternaria). La fase HLB consiste en un polímero macroporoso. Éste proporciona un balance hidrofílico-lipofílico para la retención de compuestos orgánicos polares y no polares presentes en muestras acuosas [Simpson, 2000; Vas y col., 2004; Telepchak, 2004].

I.IV.1.2. Técnicas de microextracción

Uno de los objetivos de la Química Analítica moderna es la miniaturización, simplificación y automatización del procedimiento analítico completo, especialmente para acelerar la etapa de tratamiento de muestra presentando ventajas frente a las técnicas tradicionales.

I.IV.1.2.1. Microextracción en fase sólida (SPME)

La SPME (solid phase microextraction) fue desarrollada por Belardi y Pawliszyn en 1989 considerándola un proceso de equilibrio entre múltiples fases [Vas y col. 2004]. Consiste en una fibra de sílice fundida, químicamente inerte, estable a altas temperaturas y recubierta con una fase estacionaria de naturaleza polimérica.

La fibra se sitúa en el interior de una aguja de acero inoxidable, formando parte de una jeringa diseñada para portar la fibra cuyo esquema se muestra en la Figura 11.

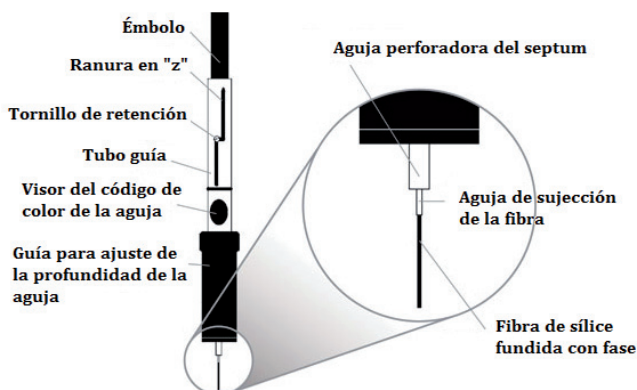


Figura 11. Partes de la jeringa usada en la microextracción en fase sólida (SPME).

I.VI.1.2.1.1. Tipos de SPME

Existen tres tipos de SPME: extracción directa, extracción por espacio de cabeza y extracción utilizando una membrana protectora. Se describe con detalle la extracción por espacio de cabeza, por ser la empleada en esta Tesis Doctoral. La fibra se expone al espacio de cabeza existente sobre la muestra. El transporte de los analitos se realiza en dos etapas:

A. Etapa de extracción o etapa de muestreo

La fibra se pone en contacto con el espacio de cabeza existente sobre la muestra hasta que se establece un equilibrio entre el analito de la muestra y la fibra. Los disolventes orgánicos de la muestra son absorbidos en la fibra, produciéndose el reparto de los analitos entre la muestra y el recubrimiento de la fibra. Después de un tiempo, la fibra se retrae y se introduce nuevamente en la aguja. La jeringuilla se retira del vial de muestreo.

B. Etapa de desorción térmica

Posteriormente, el analito es desorbido de la fibra a temperatura elevada en el inyector de un cromatógrafo de gases. Esta etapa no suele durar más de 5 minutos.

Este tipo de extracción es bastante selectiva, ya que se evita la absorción de compuestos de elevado peso molecular así como la absorción de compuestos no volátiles presentes en la matriz de la muestra. Además, este modo permite realizar modificaciones en la matriz de la muestra sin que se dañe la fibra (cambio de pH) [Kataoka y col., 2011].

I.IV.1.2.1.2. Parámetros que afectan a la SPME

- Recubrimiento polimérico de la fibra

El tipo de fase a utilizar en la extracción viene marcada por la naturaleza química de los analitos. Existen diferentes tipos de fases con diferentes espesores y polaridades para cubrir un amplio abanico de analitos. La utilizada en esta Tesis Doctoral ha sido la fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB). Se trata de una fase mixta que presenta propiedades complementarias a las de las fases de polidimetilsiloxano (PDMS; fase apolar) y poliacrilato (PA; fase polar). Las fibras PDMS/DVB son más polares que las fibras de PA, adecuadas para extraer compuestos como los alcoholes y los éteres.

- Temperatura y tiempo de extracción

La temperatura es un parámetro muy importante, ya que afecta a la sensibilidad y selectividad del proceso. Al aumentar la temperatura, aumenta la transferencia de los analitos al espacio de cabeza. Una vez alcanzado el equilibrio de distribución se extraerá la cantidad máxima de

analito en el correspondiente tiempo de equilibrio, el cual se define como el tiempo después del cual la cantidad de analito permanece constante.

- Efecto salino

La adición de sales a muestras acuosas provoca un aumento de la fuerza iónica de la disolución de la muestra. De esta manera, las moléculas de agua tienden a solvatar a los iones presentes en la muestra y no a las moléculas neutras de los analitos. Esto origina una menor solubilidad de los analitos en el agua, forzando su paso a otras fases del sistema, espacio de cabeza y fibra, provocando un aumento de la sensibilidad. Para que este proceso se lleve a cabo es necesario que los analitos se encuentren en forma no disociada.

- pH de la muestra

El pH afecta al equilibrio de disociación de los analitos en medio acuoso, resultando una mejor extracción cuando los analitos permanecen neutros. Para lograr la máxima sensibilidad se debe trabajar a un pH al menos dos unidades por debajo (especies ácidas) o por encima (especies básicas) del correspondiente pKa. Se recomienda tamponar las muestras en aquellas extracciones que se ven afectadas por la influencia del pH. Si se trabaja a pH extremos, se debe utilizar HS-SPME para evitar el deterioro de la fibra.

- Volumen de la muestra

Este parámetro está directamente relacionado con la sensibilidad del método en SPME. Suele ser mucho mayor que el volumen de la fibra.

- Volumen del espacio de cabeza

Cuanto más volátiles sean los compuestos, mayor será su concentración en el espacio de cabeza. Su volumen debe ser pequeño para que los analitos se concentren antes de su difusión hacia el recubrimiento de la fibra. Si el volumen es grande se producirá pérdida de sensibilidad.

Este parámetro también afecta a la cinética del proceso. Cuanto más pequeño sea éste con relación al volumen de muestra más rápido será el transporte de los analitos desde la muestra a la fibra.

- Agitación de la muestra

Mediante agitación de la muestra se consigue reducir el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio ya que de esta manera se favorece la difusión de los analitos hacia la fibra [Pawliszyn, 1997; Pawliszyn, 2000].

I.IV.1.2.2. Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)

La DLLME (dispersive liquid-liquid microextraction) ha sido introducida por Assadi y col. en 2006 [Rezaee y col., 2006].

Se trata de una técnica de microextracción que presenta varias ventajas con respecto a los métodos de extracción convencionales: método rápido y simple, bajo coste, uso de menor volumen de disolventes orgánicos, altas recuperaciones, alto factor de enriquecimiento, etc.

Esta técnica es muy empleada para análisis de muestras medioambientales pero todavía es poco frecuente su uso para muestras biológicas [Berijani y col., 2006; Rezaee y col., 2006; Wu y col., 2009].

I.IV.1.2.2.1. Principios de la DLLME

La DLLME está basada en un sistema de disolventes ternarios, donde se utiliza una mezcla de disolventes: el disolvente extractante (disolvente orgánico de alta densidad) y el disolvente dispersante (disolvente polar, miscible en agua y en el disolvente extractante).

Los disolventes extractantes más comunes son: clorobenceno, cloroformo, tetracloruro de carbono o tetracloroetileno. En cambio, los

disolventes dispersantes más usados son metanol, acetonitrilo, acetona o tetrahidrofurano. Una vez que la mezcla de ambos disolventes es inyectada en la muestra acuosa donde se encuentran los analitos, se produce una gran turbidez ocasionada por la formación de pequeñas gotas muy finas que se dispersan a través de la muestra acuosa. El área superficial entre el disolvente extractante y la muestra acuosa es muy grande, lo que origina que se alcance rápidamente el equilibrio permitiendo de esta manera menores tiempos de extracción. Esta es la principal ventaja de la DLLME. La siguiente etapa consiste en la centrifugación de la mezcla turbia, después de la cual se obtiene una fase sedimentada en el fondo del tubo cónico. El uso de la microjeringa facilita la recuperación de la gota (Figura 12) [Rezaee y col., 2010].

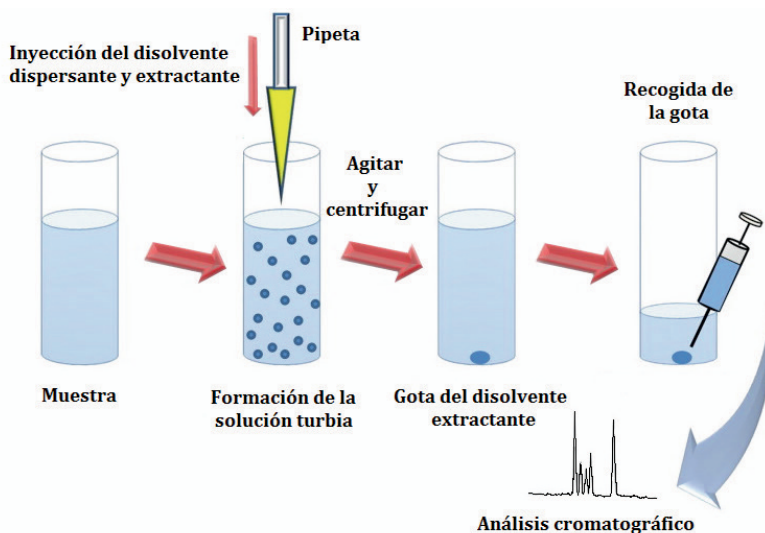


Figura 12. Fases de la extracción líquido-líquido dispersiva (DLLME).

I.IV.1.2.2.2. Parámetros que afectan a la DLLME

Los principales factores que afectan a la eficiencia de la extracción son principalmente el tipo y volumen de los disolventes extractante y dispersante.

Los disolventes extractantes deben ser disolventes orgánicos y se eligen en base a su alta densidad (mayor que el agua), capacidad de extracción de los compuestos de interés y buen comportamiento cromatográfico. Su volumen afecta al factor de preconcentración (PF; relación de la concentración del analito en la fase sedimentada, C_{sed} , y la concentración inicial del analito, C_0 ; $PF=C_{sed}/C_0$). Aumentando el volumen del disolvente, aumenta el volumen de la fase sedimentada dando lugar a una disminución del PF. Será necesario optimizar este parámetro para conseguir un PF alto junto con un volumen de la fase sedimentada también alto.

Los disolventes dispersantes deben ser miscibles en los disolventes extractantes y en la fase acuosa. Su volumen afectará directamente al grado de dispersión del disolvente de extracción en la fase acuosa, y por lo tanto, a la eficacia de la extracción.

La fase sedimentada también se ve afectada por cambios en el volumen del disolvente dispersante. Para conseguir un volumen constante de la fase sedimentada, es necesario realizar simultáneamente cambios en los volúmenes de dispersante y extractante.

El volumen de muestra y la solubilidad del disolvente de extracción también juegan un papel importante en el volumen de la fase sedimentada. Desde el punto de vista experimental, para obtener un volumen constante de fase sedimentada es necesario realizar algunos experimentos iniciales.

Existen también otros factores que conviene tener en cuenta como el tiempo y modo de extracción, el tiempo de centrifugación y la fuerza iónica.

El tiempo de extracción se define como el intervalo de tiempo entre la inyección de la mezcla en la fase acuosa y el comienzo de la etapa de centrifugación. Normalmente, el tiempo es un parámetro que no afecta en la

eficacia de la extracción. El área superficial entre el disolvente de extracción y la fase acuosa es infinitamente grande, por lo que la transferencia de los analitos desde la fase acuosa a la fase de extracción es muy rápida. Para favorecer el contacto entre las fases acuosa y orgánica se puede aplicar agitación justo después de la inyección de la mezcla.

En cuanto a la centrifugación, no se considera una etapa fundamental pero ayuda a la separación de las fases, por lo que afecta al volumen de la fase sedimentada.

La fuerza iónica se considera un factor importante a la hora de desarrollar un método de DLLME. La adición de sal disminuye la solubilidad de los analitos en la fase acuosa favoreciendo el paso de los mismos a la fase orgánica [Wu y col., 2009; Xiau-Huan y col., 2009; Rezaee y col., 2010].

I.IV.1.3. Otras técnicas alternativas: extracción asistida por microondas (MAE)

La MAE (microwave assisted extraction) es una técnica de extracción que utiliza la energía de microondas para conseguir que los compuestos de interés pasen de la muestra, generalmente sólida, a un disolvente.

Las microondas son ondas electromagnéticas no ionizantes entre 300 MHz y 300 GHz y se sitúa en el espectro electromagnético entre los rayos X y los infrarrojos [Tatke y col., 2011].

I.IV.1.3.1. Procedimiento de la técnica

El principio de calentamiento usando la energía de microondas se basa en el efecto directo de esta energía sobre las moléculas, por conducción iónica y rotación dipolar, que en la mayoría de los casos ocurren simultáneamente.

La conducción iónica se refiere a la migración de los iones cuando se aplica un campo electromagnético. La resistencia que ofrece la disolución a la migración de los iones genera fricción, la cual calienta la mezcla. En el mecanismo de rotación de los dipolos, éstos se alinean con el campo eléctrico que está oscilando continuamente. Al estar moviéndose los dipolos de las moléculas, se encuentran en continua fricción, lo que genera calor. Ninguno de estos dos fenómenos induce cambios en la estructura de las moléculas.

La capacidad de un disolvente para absorber energía de microondas y transmitirla en forma de calor a otras moléculas dependerá del factor de disipación ($\tan \delta$). El factor de disipación viene dado por la siguiente ecuación,

$$\tan \delta = \epsilon'' / \epsilon'$$

Ecuación 1. Ecuación del factor de disipación.

donde ϵ'' es la pérdida dieléctrica (medida de la eficiencia de la conversión de la energía de microondas en calor) y ϵ' es la constante dieléctrica (medida de la polarizabilidad de una molécula en un campo eléctrico).

Las moléculas polares y las disoluciones iónicas (normalmente ácidas) absorben energía de microondas fuertemente debido a su momento dipolar permanente. Sin embargo, las disoluciones no polares, como por ejemplo el hexano, no se calientan [Sparr y col., 2000].

La Tabla 1 muestra las constantes físicas y factores de disipación de algunos de los disolventes más empleados en MAE.

Tabla 1. Parámetros físicos de los disolventes empleados en la MAE.

Disolvente	ϵ'	Momento dipolar (25°C)	$\tan \delta$ ($\times 10^{-4}$)	Punto de ebullición, °C
Acetona	20.7	2.69	-	56
Acetonitrilo	37.5	-	-	82
Etanol	24.3	1.96	2500	78
Hexano	1.89	-	-	69
Metanol	32.6	2.87	6400	65
2-Propanol	19.9	1.66	6700	82
Agua	78.3	2.3	1570	100
Tolueno	2.4	0.36	-	-
Diclorometano	8.9	1.14	-	39.8
Ciclohexano	-	-	-	80.7

El calentamiento por acción de la radiación de microondas puede ocurrir mediante tres mecanismos. Éstos dependerán de los disolventes utilizados: (a) disolvente o mezcla de disolventes que presenten coeficientes de pérdida dieléctrica altos, (b) mezcla de disolventes con alta y baja pérdida dieléctrica o (c) muestra con pérdida dieléctrica alta en un disolvente con pérdida dieléctrica baja. El último mecanismo es el empleado en el sistema MAE descrito para esta Tesis Doctoral.

Los disolventes con pérdida dieléctrica baja se denominan disolventes transparentes a la energía de microondas y actúan como medio solubilizador de los analitos. Suelen emplearse en muestras biológicas o ambientales que se caracterizan por tener un alto contenido en agua libre dispersada en su

estructura. El agua provoca un sobrecalentamiento que da lugar a la ruptura de las membranas celulares. De esta manera, el disolvente difunde a través de la matriz extrayendo los analitos y solubilizándolos. Se consiguen extracciones muy eficaces a bajas temperaturas, evitando de esta forma posibles degradaciones de los analitos [Paré y col., 1994; Letellier y col., 1999; Eskilsson y col., 2000; Richter y col., 2001].

I.IV.1.3.2. Componentes de la MAE

En todos los sistemas de microondas existen dos componentes principales, el generador de microondas y el aplicador de microondas.

En este trabajo se ha utilizado un sistema ETHOS PLUS MPR-300/12 S de media presión de Milestone® (Agrigento, Italia). Este sistema ha sido diseñado para trabajar con disolventes orgánicos que permite irradiar con energía de microondas hasta 12 vasos de extracción simultáneamente. Se pueden alcanzar 1000 W de potencia. A continuación, se estudian los componentes de forma más detallada:

- Generador de microondas o magnetrón: tubo de vacío que convierte energía eléctrica continua en microondas.
- Guía de ondas: comunicación entre el magnetrón y el aplicador de microondas.
- Aplicador de microondas: instrumento diseñado para asegurar la transferencia de energía electromagnética desde la guía de ondas hasta el material a tratar. La radiación de microondas interacciona con todas las sustancias situadas en el interior de la cavidad pero se hace necesario un soporte giratorio, y a veces un agitador. De esta manera se consigue una

distribución homogénea de la energía en todas las áreas de la muestra además de conseguir alcanzar antes los valores máximos.

- Vasos de extracción: en nuestro caso, son vasos de teflón de 100 mL de capacidad. Se necesita que los recipientes sean transparentes a la energía de microondas. La temperatura máxima de trabajo es de 260°C y soportan una presión máxima de 35 bar. Para evitar su deformación, los vasos se introducen en unos soportes rígidos. Las tapas son también de teflón. Uno de los vasos actúa como vaso de referencia, controlando la presión y la temperatura interna mediante un sensor que se introduce dentro de una funda cerámica acoplada a la tapa del vaso.
- Sistemas de control de presión y temperatura: el equipo utilizado incorpora varios sistemas para garantizar la seguridad en todo el proceso y permitir condiciones de extracción reproducibles. Uno de ellos es el control de temperatura, mencionado anteriormente, que consiste en un sensor de fibra óptica situado en uno de los vasos de extracción. Está conectado a un sistema de control que permite variar la potencia del microondas para reproducir la temperatura programada de la extracción. Además posee un sensor químico llamado QP (Quality Pressure), que se encarga de detectar productos de reacción generados dentro de la cavidad del microondas, enviando una respuesta cuando la concentración de estos productos supera un límite predefinido.
- Software Easywave: permite definir el proceso de extracción pudiendo establecer diferentes etapas cada una con un tiempo, temperatura y potencia. El software muestra la gráfica, comparando continuamente el perfil definido por el usuario con lo medido por los sensores, ajustando dinámicamente la potencia aplicada.

En sistemas cerrados las disoluciones pueden calentarse por encima de su punto de ebullición. Esto puede dar lugar a un aumento de la eficacia y rapidez en el proceso de extracción. El proceso de extracción comienza con la carga de la muestra en los vasos de extracción, seguido de la adicción del disolvente/s adecuado/s y finalmente, del cierre de los vasos. A continuación, se aplica la radiación comenzando el proceso de extracción. Normalmente la fase de calentamiento de la disolución tarda menos de 2 minutos, seguido de la etapa de extracción que suele durar entre 10-30 minutos. Cuando esta etapa finaliza, es necesario esperar alrededor de 20 minutos para enfriar todo el sistema [Cases y col., 1988; Sparr y col., 2000; Cela y col., 2002; Mandal y col., 2007].

I.IV.1.3.3. Parámetros que afectan a la MAE

- Tipo de disolvente: se ha de tener en cuenta la capacidad de absorber la energía de microondas de los disolventes, la solubilidad del analito en los disolventes y las interacciones de los disolventes con la matriz.
- Volumen del disolvente: normalmente el volumen debe estar comprendido entre 10-30 mL. Éste debe ser suficiente para asegurar que la muestra está totalmente inmersa en él.
- Temperatura: se trata de uno de los parámetros más importantes que contribuye a aumentar las recuperaciones. Cuando la MAE se lleva a cabo en sistemas cerrados, se alcanzan temperaturas por encima del punto de ebullición de los disolventes fácilmente. Estas elevadas temperaturas resultan en una mejora de la eficacia de la extracción, ya que aumenta la desorción de los analitos desde los sitios activos de la matriz. Además, los disolventes tienen mayor capacidad para solubilizar los analitos a mayores temperaturas, mientras que la tensión superficial y la viscosidad de los

disolventes disminuye, lo cual favorecerá la humectación y penetrabilidad de la muestra.

- Humedad: este parámetro tiende a mejorar las recuperaciones, ya que la presencia de agua da lugar a un aumento de la temperatura.
- Tiempo de extracción: un aumento del tiempo de extracción puede conducir a un aumento en el rendimiento, pero también puede causar la degradación de los analitos de interés en compuestos termolábiles.
- Influencia de la matriz de la muestra y su contenido en agua: es importante tener en cuenta la naturaleza de la matriz, así como su contenido en agua, que se calienta por la radiación de microondas, lo cual puede influir en el proceso [Sparr y col., 2000].

I.IV.1.3.4. Ventajas e inconvenientes de la MAE (sistema cerrado)

❖ Ventajas

- Se consiguen temperaturas más altas debido a las presiones que se alcanzan en el interior de los vasos, lo que origina que los disolventes sobrepasen sus temperaturas de ebullición. Se consigue disminuir el tiempo de análisis.
- No existen pérdidas de sustancias volátiles.
- Se necesita menos volumen de disolventes. No es necesario añadir continuamente disolvente, ya que no hay riesgo de evaporación.
- Técnica menos contaminante, ya que genera menos cantidad de residuos.

❖ Inconvenientes

- Trabajar a presiones muy altas, lo que conlleva riesgo de explosión.
- Cantidad limitada de muestra.
- El material del que están formados los vasos no permite que los disolventes alcancen temperaturas muy elevadas.
- Al trabajar con compuestos volátiles, los vasos se deben abrir una vez que estén fríos para evitar la pérdida de sustancias volátiles que han sido extraídas [Mandal y col., 2007; Tatke y col., 2011].

Referencias bibliográficas

- Berijani S.; Assadi Y.; Anbia M.; Mohammad-Reza M.; Aghaee E. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection: very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. *J Chromatogr A* 1123:1-9 (2006).
- Cases Valcárcel M.; Hens Gómez A. Técnicas analíticas de separación. Editorial Reverté, S.A. (1988).
- Cela R.; Lorenzo R.A.; Casais M.C. Técnicas de separación en química analítica. Editorial Síntesis (2002).
- Eskilsson C.; Björklund E. Analytical scale microwave assisted extraction. *J Chromatogr A* 902:227-250 (2000).
- Kataoka H.; Saito K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. *J Pharmaceut Biomed Anal* 54:926-950 (2011).
- Letellier M.; Budzinski H. Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis* 27:259-271 (1999).
- Mandal V.; Mohan Y.; Hemalatha S. Microwave assisted extraction. An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews* 1 (1):7-18 (2007).
- Paré J.; Bélanger J. Microwave Assisted Process (MAP): a new tool for the analytical laboratory. *Trends Anal Chem* 13 (4):176-184 (1994).

Pawliszyn J. Solid phase microextraction: theory and practice. Wiley (1997).

Pawliszyn J. Theory of solid-phase microextraction. J Chromatogr Sci 38:270-278 (2000).

Rezaee M.; Assadi Y.; Hosseini M.; Aghae E.; Ahmadi F.; Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. J Chromatogr A 1116 (1-2):1-9 (2006).

Rezaee M.; Yamini Y.; Faraji M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. J Chromatogr A 1217:2342-2357 (2010).

Richter R.; Link D.; Kingston H. Microwave enhanced chemistry. Anal Chem 73:30-37 (2001).

Simpson Nigel J.K. Solid phase extraction. Principles, techniques and applications. Marcel Dekker (2000).

Sparr C.; Björklund E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. J Chromatogr A 902:227-250 (2000).

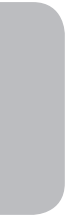
Tatke P.; Jaiswal Y. An overview of microwave assisted extraction and its applications in herbal drug research. Research Journal of Medicinal Plant 5 (1):21-31 (2011).

Telepchak M. Forensic and clinical applications of solid phase extraction. Humana Press (2004).

Vas G.; Vékey K. Solid phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. J Mass Spectrom 39:233-254 (2004).

Wu Q.; Zhou X.; Li Y.; Zang X.; Wang C.; Wang Z. Application of dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography to the determination of carbamate pesticides in water samples. *Anal Bioanal Chem* 393:1755-1761 (2009).

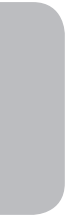
Xiao-Huan Z.; Qiu-Hua W.; Mei-Yue Z.; Guo-Hong X.; Zhi W. Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. *Chin J Anal Chem* 37 (2):161-168 (2009).



CAPÍTULO I.V: MÉTODOS DE DETECCIÓN

CHAPTER I.V: Detection methods

I.V.1. Métodos de detección empleados	103
I.V.1.1. Cromatografía de gases (GC)	103
I.V.1.1.1. Componentes de un cromatógrafo de gases	104
I.V.1.2. Espectrometría de masas (MS)	108
I.V.1.2.1. Componentes de un espectrómetro de masas	109
I.V.1.3. Cromatografía de líquidos (LC)	111
I.V.1.3.1. Componentes de un cromatógrafo de líquidos	111
I.V.1.4. Espectrometría de masas (MS)	114
I.V.1.4.1. Componentes de un espectrómetro de masas	115
Referencias bibliográficas	118



I.V.1. Métodos de detección empleados

La IUPAC define la cromatografía como “un método físico de separación en el cual los analitos de interés se distribuyen entre dos fases, una fase estacionaria y una fase móvil. La fase móvil se describe como un fluido que circula a través del lecho estacionario en una dirección definida. Puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico. Sin embargo, la fase estacionaria puede ser un sólido, un gel o un líquido”.

I.V.1.1. Cromatografía de gases (GC)

La cromatografía de gases es una técnica analítica de separación que ha experimentado un gran desarrollo desde sus inicios en los años cincuenta. Actualmente se emplea como técnica de rutina y control en una gran variedad de áreas.

Su principal limitación se encuentra en la labilidad térmica de los solutos, los cuales deben ser estables a la temperatura requerida para su volatilización. Por lo general, la utilización de la cromatografía de gases está restringida a la separación de compuestos con un peso molecular menor de 1000 a una temperatura máxima de trabajo de aproximadamente 400°C. Dentro de estos límites, como ya se ha mencionado, la única limitación existente será la estabilidad térmica de la muestra.

En este trabajo se ha empleado un cromatógrafo de gases modelo 6890 de Hewlett-Packard.

I.V.1.1.1. Componentes de un cromatógrafo de gases

Los componentes básicos de un cromatógrafo de gases se representan en la figura siguiente:

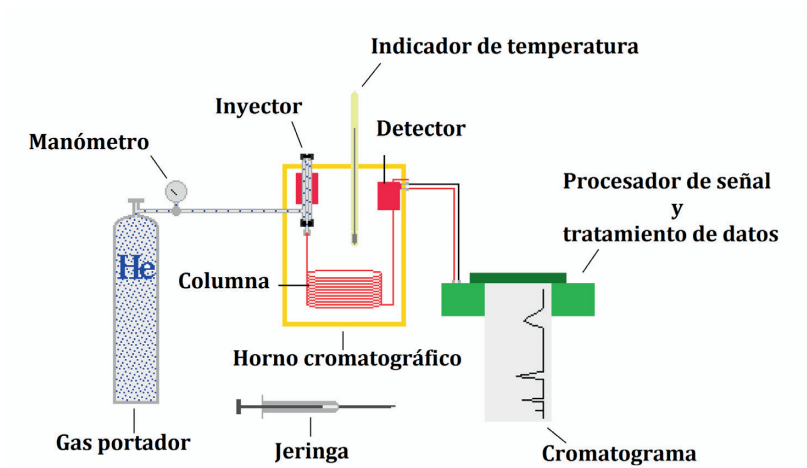


Figura 13. Diagrama esquemático de los componentes instrumentales de un cromatógrafo de gases.

❖ Gas portador

El gas portador es la fase móvil. Su función consiste en llevar la mezcla de los solutos desde que se introduce en el sistema cromatográfico hasta la salida del detector, pasando a través de la columna donde se produce la separación. Entre los gases portadores, que deben de ser químicamente inertes y no interaccionar ni con la columna ni con los componentes de la mezcla, se encuentran el helio, el nitrógeno, el hidrógeno y el argón. Su elección dependerá de: (a) la naturaleza de la muestra, (b) la fase estacionaria y (c) el tipo de detector que se utilice. El gas portador empleado en los trabajos desarrollados con GC-MS ha sido el helio. Este gas presenta una alta conductividad térmica y baja viscosidad lo que origina que la caída de presión en la columna sea peque-

ña. Sin embargo, presenta como inconveniente su elevado precio [Cases y col., 1988].

❖ Inyector

El método más común de inyección de muestra implica el uso de una microjeringa. Se inyecta una muestra líquida o gaseosa, a través de un septum de goma, en una cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de la columna. El volumen de muestra que se suele emplear en las columnas analíticas varía entre uno y 20 microlitros. El uso de un sistema divisor de la muestra permite pasar a la cabeza de la columna solamente una pequeña fracción de la muestra, desechándose el resto. Además de las microjeringas, se emplean válvulas rotatorias que introducen tamaños de muestra más reproducibles. En la siguiente figura se muestra un modelo de inyector.

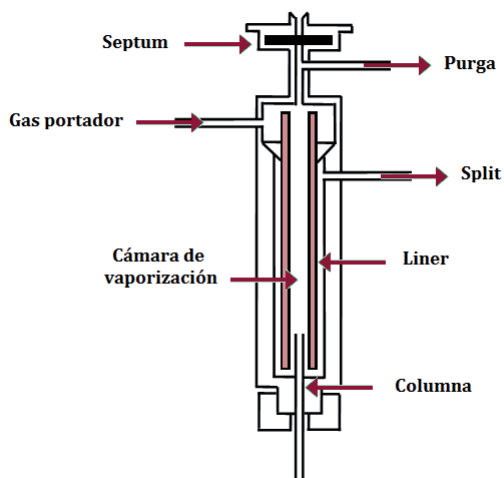


Figura 14. Inyector de muestra de un cromatógrafo de gases.

Una de las misiones fundamentales de la técnica de inyección es la de producir una banda estrecha en la cabeza de la columna. El ensanchamiento se puede producir por dos factores: (a) la velocidad de entrada de la muestra en el sistema (ensanchamiento en el tiempo) y/o (b) la dispersión de la muestra en la columna (ensanchamiento en el espacio) [Cela y col., 2002; Skoog y col., 2008].

❖ Columna cromatográfica

La columna es el elemento esencial del cromatógrafo de gases, ya que en ella tiene lugar los procesos físico-químicos en los que se fundamenta la separación cromatográfica. Existen dos tipos de columnas: empaquetadas o rellenas y capilares o abiertas. Debido al gran desarrollo que las columnas capilares han tenido en los últimos años, el interés por las columnas empaquetadas ha disminuido notablemente [Skoog y col., 2008]. En este trabajo se ha empleado una columna capilar HP5-MS (30 m x 0.25 mm x 0.5 μm; Hewlett-Packard).

❖ Horno cromatográfico

El horno cromatográfico es normalmente un sistema de calefacción por circulación forzada de aire. Está diseñado de manera que pueda alojar convenientemente dos o más columnas, y que permite el acceso necesario para su instalación e intercambio. Se intenta reducir al mínimo los espacios innecesarios y garantizar la inexistencia de zonas de diferente temperatura, puntos fríos o calientes próximos a la columna, etc. El rango de trabajo de un horno cromatográfico suele encontrarse entre la temperatura ambiente y los 400-450°C. En la práctica, el rango de temperaturas de trabajo está controlado por el punto de fusión y la presión de vapor de la fase estacionaria utilizada [Cela y col., 2002].

❖ Detector

El cromatógrafo de gases posee un sistema continuo de detección por el que pasa el gas portador con los solutos separados procedentes de la columna. Su misión es la de poner de manifiesto el paso de los analitos originando una señal eléctrica que, debidamente amplificada, es registrada o enviada al microprocesador. Realiza dos funciones primordiales: (a) indicar el momento exacto en que pasa un soluto definiendo los tiempos de retención para el análisis cualitativo y (b) originar una señal proporcional a la cantidad de soluto que pasa a su través, para fines cuantitativos.

El detector ideal para cromatografía de gases debe tener las siguientes características:

- Adecuada sensibilidad
- Buena estabilidad y reproducibilidad
- Respuesta lineal para los solutos
- Intervalo de temperaturas de trabajo comprendido desde la temperatura ambiente hasta al menos 400°C
- Tiempo de respuesta corto que sea independiente del caudal
- Alta fiabilidad y manejo sencillo
- Respuesta semejante para todos los solutos
- No destructivo de la muestra

No existe todavía un detector que reúna todas las características necesarias para dar lugar a un detector ideal. Los principales detectores que se suelen acoplar a un cromatógrafo de gases son: detector de ionización de llama (FID, Flame Ionization Detector); detector de conductividad térmica (TCD, Thermal Conductivity Detector); detector de quimioluminiscencia del azufre (SCD, Sulfur Chemiluminescence Detector); detector de captura electrónica (ECD, Electron Capture Detector); detector de emisión atómica (AED, Atomic Emission Detector); detectores termoiónicos (TID, Thermoionic detector);

detector fotométrico de llama (FPD, Flame Photometric Detector); detector de fotoionización (PID, Photo Ionization Detector); detector de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR, Fourier Transform Infrared) o detector selectivo de masas (MSD, Mass Selective Detector) [Cases y col., 1988; Skoog y col., 2008]. Éste último detector ha sido el empleado en el acoplamiento con GC (Detector selectivo de masas modelo 5973; Agilent Technologies).

❖ Interfase

El mayor problema de conexión (interfase) entre un cromatógrafo de gases y un espectrómetro de masas (MS) se centra en las diferentes condiciones de flujo entre los dos instrumentos. Otro problema importante es la dilución de los analitos en el gas portador, no alcanzando los mínimos requeridos en MS; por ello es imprescindible una preconcentración. Por tanto, la interfase del acoplamiento GC-MS debe realizar dos funciones principales: (a) reducción drástica de la presión y (b) enriquecimiento de los analitos en el flujo gaseoso. El uso de las columnas capilares en GC-MS permite solucionar fácilmente el salto de presión mediante una interfase directa (introduciendo directamente el extremo de la columna en la fuente de ionización). De esta manera se garantiza que entre la totalidad de la muestra para su ionización. Sin embargo, su principal inconveniente consiste en romper el vacío cuando se necesita un cambio de columna [Cases y col., 1988].

I.V.1.2. Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas (MS) es una técnica instrumental en la cual las moléculas gaseosas son ionizadas, aceleradas en un campo eléctrico y por último separadas en función de la masa.

I.V.1.2.1. Componentes de un espectrómetro de masas

El espectrómetro de masas está constituido por una serie de elementos principales: (a) fuente de ionización, (b) analizador de masas, (c) detector de iones y (d) fuente de vacío.

❖ Fuente de ionización

La fuente de ionización es la encargada de provocar la ionización de la molécula, bien por impacto electrónico (EI, Electron Impact) o por ionización química (CI, Chemistry Ionization). La ionización por impacto electrónico, empleada en esta Tesis Doctoral, es el tipo de ionización más utilizado. Se produce en una cámara a presión muy baja (10^{-8} torr). La muestra en fase gaseosa se introduce en la cámara de ionización, donde las moléculas son bombardeadas con electrones procedentes de un filamento caliente (frecuentemente de renio) con una energía de 70 eV. Se forman fragmentos moleculares positivos, negativos y neutros. Los fragmentos, normalmente positivos, se introducen a continuación en el cuadrupolo para seleccionarlos en función de sus masas. Otro factor a tener en cuenta es la temperatura de la fuente de ionización, ya que afecta al proceso de fragmentación y al mantenimiento de las moléculas en estado gas.

❖ Analizador de masas

Una vez generados los iones, estos deben ser separados en función de su relación masa/carga. Los analizadores más empleados en equipos acoplados a cromatógrafos de gases son los siguientes: (a) magnético, (b) tiempo de vuelo, (c) cuadrupolar, y (d) trampa iónica.

El analizador cuadrupolar o cuadrupolo ha sido el usado en este trabajo (Figura 15).

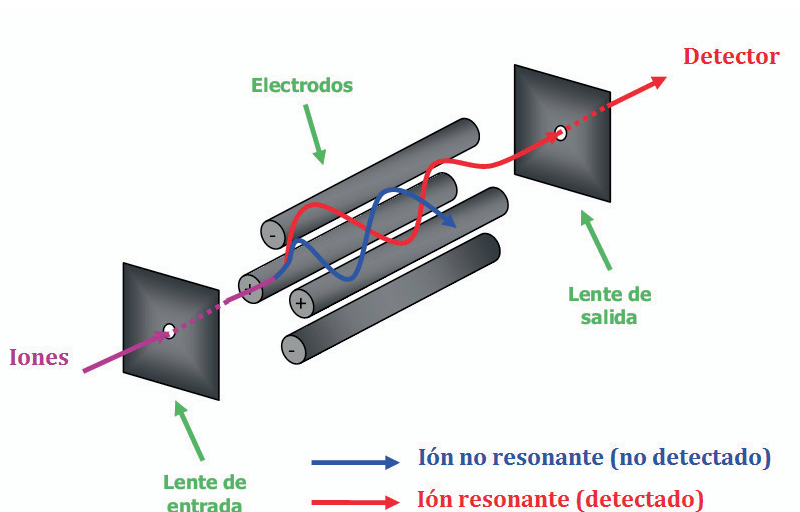


Figura 15. Diagrama de un analizador de masas cuadrupolar.

Estos analizadores constan de cuatro varillas metálicas paralelas de sección hiperbólica que trabajan dos a dos. A cada una de estas parejas de varillas se les aplica una combinación de potenciales de radiofrecuencia (RF) y de corriente continua (DC), que van variando de forma que solo los iones de cierta relación m/z son capaces de atravesar completamente el filtro de masas (eje z). Los potenciales aplicados a las dos parejas de varillas son iguales pero de signo opuesto.

Los analizadores cuadrupolares pueden operar entre 10 y 2000 m/z , aunque el rango de trabajo típico es de 10-800 m/z . Son analizadores veloces y, por lo tanto, adecuados para su trabajo en el acoplamiento con GC. La velocidad es mayor cuanto más estrecho es el rango de barrido.

Otra de las ventajas de estos analizadores es la posibilidad de trabajar en varias modalidades de medida:

- Full Scan (modo de barrido de iones): se realiza un barrido completo de la muestra obteniendo un registro total de todos los iones.
- SIM (monitorización de los iones seleccionados): se registra de forma continua la presencia de uno o varios iones previamente seleccionados. Éste es el modo de trabajo más adecuado cuando el objetivo principal del análisis es maximizar la sensibilidad.

I.V.1.3. Cromatografía líquida (LC)

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general.

Se han empleado dos equipos de LC para la puesta a punto de dos métodos analíticos: (a) LC-MS/MS ; serie 1200 (Agilent) y (b) ThermoFinnigan LCQ Deca XP.

I.V.1.3.1. Componentes de un cromatógrafo de líquidos

Un sistema moderno de cromatografía líquida está compuesto por cuatro elementos básicos: (a) un sistema capaz de gestionar e impulsar la fase móvil, (b) la columna cromatográfica, (c) un sistema que permita la inserción de las muestras y (d) un sistema capaz de informar del resultado de la separación.

❖ Bomba

La presencia de una bomba es característica en todos los sistemas de HPLC. La bomba debe:

- Ser capaz de gestionar presiones del orden de las 400 atm (6000 psi).
- Mantener un flujo de fase móvil de manera constante en el tiempo y reproducible día a día.
- Permitir la variación de dicho flujo en un intervalo práctico de trabajo.
- Limitar los volúmenes muertos al máximo, especialmente cuando el sistema deba ser utilizado para eluciones programadas.
- Limitar las oscilaciones (pulsaciones) de presión inherentes al propio funcionamiento o amortiguarlas de manera eficaz.
- Ser químicamente inerte.
- Permitir cambios de disolvente y operaciones de mantenimiento de modo simple y rápido.
- Ser robusta mecánicamente, operar sin excesivo ruido o vibración y disponer de los elementos de seguridad necesarios para el trabajo con disolventes inflamables, tóxicos, etc.

Existen tres tipos de bombas, cada una con sus propias ventajas y desventajas: bombas recíprocas, bombas de jeringa o de desplazamiento y bombas neumáticas o de presión constante. Actualmente las más usadas son las denominadas recíprocas [Cela y col., 2002].

❖ Inyector

A menudo, el factor limitante en la precisión de las medidas en LC es la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra en la columna. El medio más simple y antiguo para la introducción de las muestras implicaba la inyección con una jeringa a través de un septum que cierra herméticamente. La

ventaja de esta técnica es su sencillez pero el inconveniente es precisamente la escasa reproducibilidad que muestra en la inyección. Actualmente, el uso de válvulas de inyección (loop injector) se ha convertido en la opción habitual en la inmensa mayoría de los casos [Skoog y col., 2008].

❖ Columnas

La columna en cromatografía líquida se construye normalmente de acero aunque también existen columnas construidas en vidrio, material polimérico y, en el caso de microcolumnas, sílica fundida. Obviamente, puesto que el sistema debe trabajar a elevadas presiones, el material elegido para la construcción de la columna debe soportar tales presiones. En cualquier caso, una condición importante es lograr una superficie perfectamente homogénea en el interior de la columna para evitar el denominado efecto pared, que puede provocar pérdidas considerables de eficacia y resolución.

La longitud de las columnas para la LC oscila entre 10 y 30 cm. Su diámetro interno varía entre 4 y 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 5 o 10 μm . Sin embargo, existen otro tipo de columnas, más eficaces, rápidas, con menores consumos de disolventes y con menores dimensiones que las descritas hasta el momento. Estas columnas pueden tener diámetros internos que oscilan entre 1 y 4.6 mm, con longitudes entre 3 y 7.5 cm rellenas con partículas de tamaño de 3 o 5 μm . En muchas ocasiones, para aumentar la vida de la columna analítica, se coloca delante una precolumna que elimina no sólo la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes sino también componentes de la muestra que se unen irreversiblemente a la fase estacionaria. Además, las precolumnas también sirven para saturar la fase móvil con la fase estacionaria y así minimizar las pérdidas de ésta en la columna analítica. La composición del relleno de la precolumna debería ser semejante al relleno de la columna analítica, sin

embargo, el tamaño de partícula es por lo general mayor para minimizar la caída de presión.

En el desarrollo de dos métodos analíticos de esta Tesis Doctoral se han empleado las siguientes columnas: (a) Zorbax Eclipse XDB-C8 (50 x 2.1 mm; 3.5 μm ; Agilent) y (b) Inertsil ODS-3 (100 x 3 mm i.d.; 3 μm tamaño de partícula) con una precolumna (10 x 1.5 mm i.d., 3 μm tamaño de partícula).

I.V.1.4. Espectrometría de masas (MS)

Un detector ideal para LC debería poseer las mismas propiedades que los detectores para cromatografía de gases, con la excepción de que un detector para líquidos no es necesario que sea sensible en un intervalo tan grande de temperaturas. Además, un detector de HPLC debe tener un volumen interno mínimo a fin de reducir el ensanchamiento de banda.

Los detectores más comunes empleados en HPLC son: (a) detector de absorbancia, (b) detector de fluorescencia, (c) detector electroquímico, (d) detector de índice de refracción, (e) detector de conductividad, (f) detector de espectrometría de masas, (g) detector FTIR, (h) detector de dispersión de la luz, (i) detector de actividad óptica, (j) detector selectivo de elementos y (k) detector de fotoionización.

Los detectores usados en esta tesis doctoral han sido: (a) espectrometría de masas y (b) espectrometría de masas en tandem.

La espectrometría de masas es una técnica analítica que proporciona información tanto cualitativa como cuantitativa de las moléculas analizadas previamente convertidas en iones. Las moléculas de interés forman parte de una mezcla heterogénea. Se somete en primer lugar a una fuente de ionización donde se ionizan adquiriendo carga negativa o positiva. Los iones atraviesan el

analizador de masas hasta que alcanzan las diferentes partes del detector de acuerdo con su relación masa/carga (m/z). Una vez en contacto con el detector, se generan señales que son registradas en el sistema informático y representadas en un espectro de masas que muestra la abundancia relativa de las señales en función de su relación m/z . Así pues, para el análisis de las muestras por MS se producen tres procesos básicamente:

- Ionización de la muestra
- Análisis de la muestra ionizada
- Detección de los compuestos formados

I.V.1.4.1. Componentes de un espectrómetro de masas

❖ Fuente de ionización

La ionización de la muestra puede llevarse a cabo de diferentes formas, según la naturaleza de la propia muestra y lo que se pretenda detectar en el propio análisis. Puede efectuarse en condiciones de alto vacío por EI o a presión atmosférica (API). En este último caso, si se trata de un análisis en fase líquida, se realizará una ionización por electrospray (ESI), mientras que si es en fase gaseosa se efectuará una ionización química (APCI) o bien una fotoionización (APPI). Las técnicas de ionización más empleadas en el laboratorio clínico son la ESI y la APCI, siendo la primera la empleada en esta Tesis Doctoral.

El analito, una vez introducido en la fuente, pasa a través de un tubo capilar de acero inoxidable o de cuarzo al cual se le aplica una diferencia de potencial en presencia de un flujo de gas (nitrógeno). Se origina la nebulización de las gotas cargadas en el capilar dando lugar a la formación de los iones (Figura 16).

La transferencia de las especies iónicas desde una disolución a la fase gaseosa por medio de ESI implica tres etapas:

- Dispersión de un spray fino de gotas cargadas (nebulización).
- Evaporación del disolvente.
- Liberación de los iones de las gotas altamente cargadas (explosión Coulombiana).

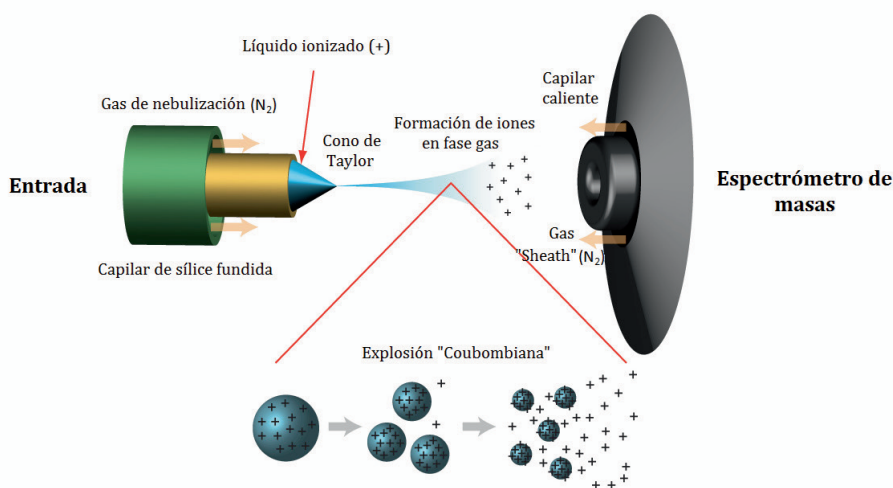


Figura 16. Diagrama de la fuente de ionización por electrospray (ESI).

❖ Analizador de masas: triple cuadrupolo

El analizador triple cuadrupolo es probablemente el más empleado. Consta de tres cuadrupolos: dos analizadores de masas (Q 1 y Q 3) separados por una celda de colisión (Q 2) colocados en línea recta. En el primer cuadrupolo se selecciona el ión analito de interés por su masa (habitualmente denominado ión precursor o "parent ion"). En un segundo cuadrupolo se le pone en contacto con un gas de colisión, generalmente Argón, sometido únicamente a RF que se usa como celda de colisión para producir la fragmentación del ión precursor. Este proceso recibe el nombre de disociación inducida por colisión (CID). Los iones hijos o "daughter ion" resultantes de la CID están relacionados con la estructura molecular del ión precursor y se

escanean en el tercer cuadrupolo, que será el que proporciona la información estructural de los iones moleculares (Figura 17).

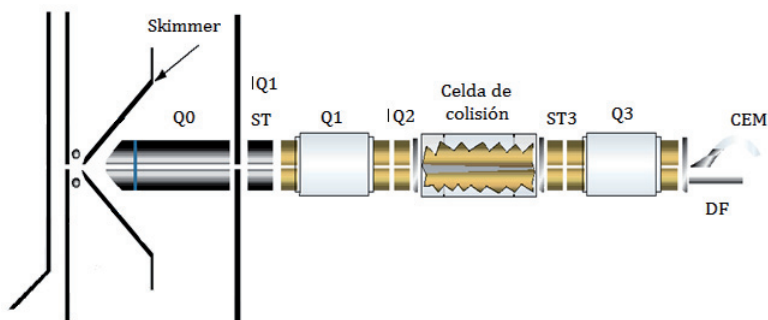


Figura 17. Diagrama del analizador de masas triple cuadrupolo.

Se pueden utilizar 5 modos de escaneo en el analizador de masas de triple cuadrupolo, siendo los más usados el SRM (single reaction monitoring) para detectar un fragmento producido por el ión precursor, y el MRM (multiple reaction monitoring) para detectar múltiples fragmentos producidos por el ión precursor.

Referencias bibliográficas

Cela R.; Lorenzo R.A.; Casais M.C. Técnicas de separación en química analítica. Editorial Síntesis (2002).

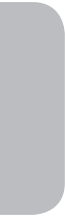
Cases Valcárcel M.; Hens Gómez A. Técnicas analíticas de separación. Editorial Reverté, S.A. (1988).

Skoog D.; Stanley R. Crouch; Holler F. James. Principios de análisis instrumental. Sexta edición. CENGAGE Learning (2008).

CAPÍTULO I.VI: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CHAPTER I.VI: State of art

Tabla 2. Revisión bibliográfica de los ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs) en muestras de pelo	122
Tabla 3. Revisión bibliográfica del etil glucurónido (EtG) en muestras de pelo	126
Tabla 4. Revisión bibliográfica de los ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs) en muestras de meconio	132
Tabla 5. Revisión bibliográfica del fosfatidiletanol (PEth) en muestras de sangre	137
Tabla 6. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación de los FAEEs en muestras de pelo	140
Tabla 7. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación del EtG en muestras de pelo	145
Tabla 8. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación de los FAEEs en muestras de meconio	150
Tabla 9. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación del PEth en muestras de sangre	154
Referencias bibliográficas	157



Se ha realizado una exhaustiva revisión bibliográfica desde finales de los años 90 hasta la actualidad recogiendo los datos más característicos de los 3 biomarcadores analizados en esta Tesis Doctoral.

Las tres primeras tablas corresponden al estudio de los FAEEs, EtG y PEth, centrando su búsqueda en las muestras donde han sido analizados: pelo, meconio y sangre. Muestran los metabolitos estudiados, las técnicas de extracción y las técnicas de detección empleadas por orden cronológico. Igualmente, en las Tablas 6-9 se seleccionan sólo aquellas publicaciones cuya técnica de detección coincida con la empleada en el desarrollo de los métodos analíticos de este trabajo, describiendo la metodología empleada y los resultados de la validación más relevantes.

El objetivo de esta revisión ha sido comparar los métodos publicados hasta la actualidad con los desarrollados en el Instituto de Ciencias Forenses de la Universidad de Santiago de Compostela, valorando en la discusión final de la memoria las ventajas que presentan los nuevos métodos frente a alguno de los existentes.

Tabla 2. Revisión bibliográfica de los ésteres efílicos de los ácidos grasos (FAEEs) en muestras de pelo.

FAEEs en pelo				
Referencias	FAEEs	Matriz biológica	Técnicas de extracción	
			Técnicas de detección	
Bernhardt, T. J Chromatogr B 675:189-196 (1996)	Etil oleato	Plasma	SPE (aminopropil)	GC-MS
Pragst F. Forensic Sci Int 121:76-88 (2001)	Etil miristato, palmitato, oleato, estearato	Pelo (50 mg)	HS-SPME (Fibra: PDMS/DVB; 65 µm)	GC-MS
Auwärter V. Clim Chem 47 (12):2114-2123 (2001)	Etil miristato, palmitato, oleato, estearato	Pelo (20-50 mg)	HS-SPME	GC-MS
Musshoff F. J Chromatogr B 781:457-480 (2002)			Revisión *Otros marcadores: EtG, Cocaetileno	
Hartwig S. Forensic Sci Int 131:90-97 (2003A)	Etil miristato, palmitato, oleato, estearato	Pelo (20-50 mg)	HS-SPME	GC-MS
Hartwig S. Alcohol Alcohol 38 (2):163-167 (2003B)	Etil miristato, palmitato, oleato, estearato	Pelo (20-50 mg)	HS-SPME	GC-MS
Yegles M. Forensic Sci Int 145 (2-3):167-173 (2004)	Etil miristato, palmitato, oleato, estearato *Otros marcadores: EtG	Pelo (30 mg)	HS-SPME (Fibra: PDMS/DVB; 65 µm)	GC-MS
Chan D. Clin Biochem 37:429-438 (2004A)			Revisión *Matrices analizadas: pelo y meconio	
Wurst F. Alcohol Alcohol 39 (1):33-38 (2004A)			Revisión	
Auwärter V. Forensic Sci Int 145:149-159 (2004)	Etil miristato, palmitato, oleato, estearato	Pelo (30 mg) *Determinación de FAEEs en escualeno	HS-SPME (Fibra: PDMS/DVB; 65 µm)	GC-MS

Tabla 2. Revisión bibliográfica de los ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs) en muestras de pelo.

Referencias	FAEEs	Matriz biológica	Técnicas de extracción	Técnicas de detección
Salem R. Biochim Biophys Acta 1738:99-104 (2005)	-	Plaquetas	SPE (aminopropil)	GC-MS
Caprara D. Ther Drug Monit 27 (6):811-815 (2005A)	Etil miristato, palmitato, oleato, estearato, palmitoleato, laurato	Pelo (20 mg)	SPE (aminopropil)	GC-Cl-MS
Caprara D. Pediatr Res 58 (6): 1158-1163 (2005B)	Etil miristato, palmitato, oleato, estearato, laurato, palmitoleato	Pelo (20 mg)	Extracción liquid-liquido SPE (aminopropil)	GC-Cl-MS
Peterson K. Alcohol Res Health 28 (1): 30-37 (2005)	-	Revisión	-	-
Best C. Alcohol Alcohol 41 (3): 240-246 (2006)	-	Plasma	SPE (aminopropil)	Electroforesis
Caprara D. Ann Ist Super Sanita 42 (1): 39-45 (2006)	Etil miristato, palmitato, oleato, estearato, laurato, palmitoleato, heptadecanoato	Pelo (10-20 mg) <i>*Otras matrices: meconio</i>	SPE	GC-Cl-MS
Kulaga V. Alcohol Alcohol 41 (5):534-539 (2006)	Etil miristato, palmitato, oleato, estearato	Pelo (50 mg) <i>*Pelo de cobaya (20 mg) y pelo humano</i>	SPE (aminopropil)	GC-MS
Salem R. Alcohol Alcohol 41 (6):598-603 (2006)	Etil palmitato, estearato, oleato, linoleato, araquidonato, heptadecanoato, docosahexanoato, eicosapentaenoato	Hígado, corazón, músculo esquelético	SPE (aminopropil)	GC-MS
Pragst F. Clin Chim Acta 370:17-49 (2006)	-	Revisión	-	-
Borucki K. Alcohol Clin Exp Res 31 (3):423-427 (2007)	Etil palmitato, estearato	Sangre	-	GC-MS

**Otras marcadores: EtG*

Tabla 2. Revisión bibliográfica de los ésteres efílicos de los ácidos grasos (FAEEs) en muestras de pelo.

Referencias	FAEEs	Matriz biológica	Técnicas de extracción	Técnicas de detección
Giovanni N. J Anal Toxicol 31:93-97 (2007)	Etil miristato, palmitato, estearato, oleato	Pelo (30 mg)	Extracción líquido-líquido HS-SPME (Fibra: PDMS/DVB; 65 µm)	GC-EI-MS
Caprara D. Neurosci Biobehav Rev 31:254- 260 (2007)			Revisión	
Giovanni N. J Anal Toxicol 32:156-159 (2008)	Etil miristato, palmitato, estearato	Pelo (30 mg)	Extracción líquido-líquido HS-SPME (Fibra: PDMS/DVB; 65 µm)	GC-EI-MS
Kulaga V. Alcohol Alcohol 44 (3):287-292 (2009A)	Etil miristato, palmitato, estearato, oleato	Pelo (20-25 mg) *Otras matrices: sangre	HS-SPME	GC-MS
Kulaga V. Ann Toxicol Anal 21 (2):61-65 (2009B)			Revisión	
Kulaga V. Alcohol 44:615-621 (2010)	Etil miristato, palmitato, estearato, oleato *Otras sustancias: <i>anfetaminas, barbitúricos, benzodiazepinas, cocaína, opiáceos, cannabinoides, metadona, oxycodona</i>	Pelo (50 mg)	Extracción líquido-líquido HS-SPME (Fibra: PDMS/DVB; 65 µm)	GC-MS
Sibe S. Forensic Sci Int 196:111-117 (2010)	Etil miristato, palmitato, estearato, oleato	Pelo	Extracción líquido-líquido HS-SPME (Fibra: PDMS/DVB; 65 µm)	GC-MS
Pragst F. Forensic Sci Int 196:101-110 (2010)	Etil miristato, palmitato, estearato, oleato *Otras marcadores: <i>EtG</i>	Pelo (30 mg)	Extracción líquido-líquido HS-SPME	GC-MS
Politi L. J Pharmaceut Biomed Anal 54:1192-1195 (2011)	Etil miristato, palmitato, estearato, oleato	Pelo	Extracción líquido-líquido SPE (aminopropil)	GC-MS

Tabla 2. Revisión bibliográfica de los ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs) en muestras de pelo.

Referencias	FAEEs	Matriz biológica	Técnicas de extracción	Técnicas de detección
Albermann M. Anal Bioanal Chem 400 (1):175-181 (2011)	Etil miristato, palmitato, estearato, oleato <i>*Otros marcadores: EtG</i>	Pelo (30 mg)	Extracción líquido-líquido HS-SPME (Fibra: PDMS/DVB; 65 µm)	GC-MS
Gareri J. Anal Bioanal Chem 400:183-188 (2011)	Etil miristato, palmitato, estearato, oleato <i>*Otros marcadores: EtG</i>	Pelo (30 mg)	Extracción líquido-líquido HS-SPME (Fibra: PDMS/DVB; 65 µm)	GC-MS
Suesse S. Forensic Sci Int 218 (1-3):82-91 (2012)	Etil miristato, palmitato, estearato, oleato <i>*Otros marcadores: EtG</i>	Pelo (30 mg)	Extracción líquido-líquido HS-SPME (Fibra: PDMS/DVB; 65 µm)	GC-MS
Pragst F. Forensic Sci Int 217:e4-e7 (2012)			"Case Report" <i>*Otros marcadores: EtG</i>	
Joya X. J Pharmaceut Biomed Anal 69:209- 222 (2012)			Revisión <i>*Otros marcadores: EtG, PEth, biomarcadores indirectos del consumo de alcohol etílico</i>	
Hastedt M.2013 (DOI:10.1007/s12024-013-9416-8)		Pelo	-	-
Hastedt M. Forensic Sci Med Pathol 9 (2):184- 193 (2013)	-	Pelo	-	-

Tabla 3. Revisión bibliográfica del etil glucurónido (EtG) en muestras de pelo.

EtG en pelo			
Referencias	Matriz biológica	Técnicas de extracción	Técnicas de detección
Wurst F. Alcohol Alcohol 34 (1):71-77 (1999)	Orina y plasma	-	GC-MS LC-MS/MS
Skopp G. Alcohol Alcohol 35 (3):283-285 (2000)	Pelo (50 mg) <i>*Otras matrices: piel, estrato córneo</i>	Extracción por ultrasónicos (3 h)	GC-MS
Alt A. Alcohol Alcohol 35 (3):313-314 (2000)	Pelo (100 mg)	Extracción por ultrasónicos (2 h 30 min)	GC-MS
Wurst F. Alcohol 20:111-116 (2000)	Orina y plasma	-	LC-MS/MS GC-MS
Pragst F. Forensic Sci Int 107:201-223 (2000)		Revisión <i>*Otras marcadores: FAEEs, PEth</i>	
Seidl S. Addict Biol 6:205-212 (2001)		Revisión	
Janda I. Forensic Sci Int 128:59-65 (2002)	Pelo (100 mg)	Extracción por ultrasónicos (3 h) SPE (Aminopropil)	LC-MS/MS
Wurst F. Alcohol Clin Exp Res 26 (7):1114-1119 (2002)	Orina	-	LC-ESI-MS/MS
Weinmann W. J Am Soc Mass Spectrom 15:188-193 (2004)	Orina	-	LC-MS/MS
Jurado C. Forensic Sci Int 145:161-166 (2004)	Pelo (100 mg)	Extracción por ultrasónicos (2 h)	GC-MS
Yegles M. Forensic Sci Int 145:167-173 (2004)	Pelo (30 mg) <i>*Otras marcadores: FAEEs</i>	Extracción por ultrasónicos (2 h) SPE (Aminopropil)	GC-MS

Tabla 3. Revisión bibliográfica del etil glucurónido (EtG) en muestras de pelo.

Referencias	Matriz biológica	Técnicas de extracción	Técnicas de detección
Skipper G. Alcohol Alcohol 39 (5):445-449 (2004)	Orina	-	LC-MS/MS
Wurst F. Alcohol Clin Exp Res 28 (8):1220-1228 (2004B)	Orina	-	LC-MS/MS
Klys M. Legal Medicine 7:319-325 (2005)	Pelo <i>*Otras matrices: orina</i>	SPE Test Tox/See Multi-Drug Screen Panel (Bio-Rad); Rapid Test TCA (Syva)	LC-APCI-MS
Politi L. Addiction 101:1408-1412 (2006)	Pelo (50 mg)	Extracción por ultrasonidos (2 h)	LC-ESI-MS/MS
Morini L. J Mass Spectrom 41:34-42 (2006)	Pelo (100 mg)	Extracción por ultrasonidos (2 h)	LC-ESI-MS/MS
Høiseith G. Forensic Sci Int 172:119-124 (2007)	Sangre y orina	-	LC-MS
Kugelberg F. Forensic Sci Int 165:10-29 (2007)		Revisión	
Wojcik M. Alcohol Alcohol 42 (4):317-320 (2007)	Orina	Kit comercial	LC-MS/MS
Appenzeller B. Forensic Sci Int 173:87-92 (2007)	Pelo (10-30 mg)	Extracción por ultrasonidos (2 h) SPE (Aminipropil)	GC-MS
Politi L. Forensic Sci Int 172:23-27 (2007A)	Pelo (50 mg) <i>*Otras marcadores: cocaetileno</i>	Extracción por ultrasonidos (2h)	LC-ESI-MS/MS
Appenzeller B. Alcohol Alcohol 42 (4):326-327 (2007)	Pelo	-	GC-MS
Jurado C. Trastornos Adictivos 9 (3):172-183 (2007)		Revisión	
Niemelä O. Clin Chim Acta 377:39-49 (2007)		Revisión	
Baranowski S. Int J Legal Med 122 (5):389-393 (2008)		<i>*Otros marcadores: Peth</i> Estudio de la degradación bacteriana de EtG	

Tabla 3. Revisión bibliográfica del etil glucuronido (EtG) en muestras de pelo.

Referencias	Matriz biológica	Técnicas de extracción	Técnicas de detección
Álvarez I. J Appl Toxicol 28:773-778 (2008)	Orina	MAE	GC-MS
Kintz P. Forensic Sci Int 176:87-90 (2008)	Pelo (50 mg)	Extracción por ultrasonidos (2 h) SPE (OASIS® MAX)	LC-ESI-MS/MS
Paul R. Forensic Sci Int 176:82-86 (2008)	Pelo (10 mg)	Extracción por ultrasonidos SPE (OASIS® MAX)	GC-MS/MS
Klys M. Forensic Sci Int 179:1-4 (2008)	Pelo (50 mg)	Extracción por ultrasonidos (1 h) SPE (Aminopropil)	LC-MS
Bendroth P. Forensic Sci Int 176:76-81 (2008)	Pelo (100 mg) <i>*Otras matrices: sangre, orina</i>	Extracción por ultrasonidos (2 h)	UPLC-ESI-MS/MS
Rainio J. Legal Medicine 10:229-235 (2008)		Revisión <i>*Otros marcadores: FAEs, PEth</i>	
Pollt L. Int J Legal Med 122:507-509 (2008)	Pelo <i>*Otras matrices: hígado, riñón, sangre</i>	Extracción por ultrasonidos (2 h) SPE (Aminopropil)	LC-MS/MS
Bean P. Am Biotech Lab 26 (7):20-21 (2008)	Pelo	Extracción por ultrasonidos (2 h) SPE (Clean Screen®)	LC-MS/MS
Helander A. Alcohol Alcohol 44 (1):55-61 (2009A)	Orina	-	LC-MS Inmunoensayo: DRI-EtG EIA <i>*Resultados confirmados por LC-MS/MS</i>
Lamoureux F. Anal Bioanal Chem 394:1895-1901 (2009)	Pelo (30 mg)	Extracción por ultrasonidos (2 h) SPE (Clean Screen®)	LC-ESI-MS/MS
Álvarez I. Anal Bioanal Chem 393:1345-1350 (2009)	Pelo (100 mg)	MAE	GC-MS
Keteri A. Forensic Sci Int 193 (1-3):101-105 (2009)	Humor vítreo	-	LC-MS
Kharbouché H. J Chromatogr B 877:2337-2343 (2009)	Pelo	Extracción por ultrasonidos (2 h) SPE (OASIS® MAX)	GC-NCI-MS/MS

Tabla 3. Revisión bibliográfica del etil glucuronido (EtG) en muestras de pelo.

Referencias	Matriz biológica	Técnicas de extracción	Técnicas de detección
Morini L. Forensic Sci Int 188:140-143 (2009A)	Pelo (100 mg) *Otros marcadores: CDT	Extracción por ultrasónicos (2 h)	LC-MS/MS
Høiseth G. Alcohol Clin Exp Res 33 (5):812-816 (2009)	Pelo (100 mg) *Otros marcadores: CDT, AST, ALT, GGT (plasma)	Extracción por ultrasónicos (2 h)	LC-MS/MS
Kerekes I. Alcohol Alcohol 44 (1):62-66 (2009)	Pelo (20-30 mg)	Extracción por ultrasónicos (2 h) SPE (OASIS® MAX)	GC-MS
Morini L. Addiction 104:915-920 (2009B)	Pelo (100 mg)	Extracción por ultrasónicos (2 h)	LC-MS/MS
Pichini S. Can J Clin Pharmacol 16 (2):370-375 (2009)	Meconio *Otros marcadores: FAEES	-	-
Concheiro M. J Anal Toxicol 33 (3):155-161 (2009)	Pelo (100 mg) *Otras matrices: orina	Extracción por ultrasónicos (2h)	LC-ESI-MS/MS
Kharbouché H. Alcohol 44 (6):507-514 (2010)	Pelo	SPE	GC-NCI-MS/MS
Albermann M. Anal Bioanal Chem 396:2441-2447 (2010)	Pelo (100 mg)	Extracción por ultrasónicos (2h)	LC-MS/MS
Morini L. Forensic Sci Int 198:23-27 (2010A)	Pelo (100 mg)	Extracción por ultrasónicos (2h)	LC-MS/MS
Tarcomnicu I. Forensic Sci Int 196:121-127 (2010)	Pelo (25 mg) *Otras matrices: meconio	Extracción por ultrasónicos (90 min)	LC-MS/MS
Morini L. Forensic Sci Int 196:74-77 (2010B)	Meconio	Extracción por ultrasónicos (2 h)	LC-MS/MS
Agius R. Forensic Sci Int 196:3-9 (2010)	Pelo (10-50 mg)	SPE (Clean Screen®) HS-SPME	GC-MS/MS
Pragst F. Forensic Sci Int 196:101-110 (2010)	Pelo (30 mg) *Otros marcadores: FAEES	Extracción por ultrasónicos (30 min) SPE (OASIS® MAX)	LC/ESI-MS/MS
Liniger B. Traffic Injury Prevention 11 (2):123-126 (2010)	Pelo	-	GC-NCI-MS
Albermann M. Anal Bioanal Chem 400:175-181 (2011)	*Otros marcadores: CDT Pelo (100 mg) *Otros marcadores: FAEES	Extracción por ultrasónicos (12 h)	LC-MS/MS

Tabla 3. Revisión bibliográfica del etil glucuronido (EtG) en muestras de pelo.

Referencias	Matriz biológica	Técnicas de extracción	Técnicas de detección
Tavakoli H. Anal Biochem 418:30-36 (2011)	Placenta *Otras matrices: Tejidos fetales	-	LC-MS/MS
Hamid R. Innovations in Clinical Neuroscience 8 (3):26-33 (2011)		Revisión	
Hastedt M. Alcohol Alcohol 47 (2):127-132 (2012)	Pelo *Otras matrices: FAEs	-	LC-ESI-MS/MS
Agus R. Forensic Sci Int 218:10-14 (2012)	Pelo (10-50 mg) *Otras matrices: FAEs	HS-SPME	GC-MS/MS
Lees R. Alcohol Alcohol 47 (3):267-272 (2012)	Pelo	Extracción por ultrasonidos (12 h) SPE	GC-MS/MS
Malkowska A. Pharmacol Rep 64:586-593 (2012)	Pelo	Ciclos de congelación y descongelación	GC-MS
Kharbouche H. Int J Legal Med 126:243-250 (2012)	Pelo	-	GC-MS/MS
Schröder J. Int J Legal Med 126:791-799 (2012)	Pelo	Extracción por ultrasonidos (30 min)	LC-ESI-MS/MS
Agus R. Forensic Sci Int 218:3-9 (2012)	Pelo *Otras matrices: orina	SPE	GC-MS/MS
Pragst F. Forensic Sci Int 217:4-7 (2012)	Pelo *Otras matrices: FAEs	HS-SPME	LC-MS/MS
Kronstrand R. Forensic Sci Int 215:51-55 (2012)	Pelo	SPE (Clean Screen®)	LC-ESI-MS/MS
Albermann M. Anal Bioanal Chem 403:769-776 (2012)	Pelo	Extracción por ultrasonidos (2 h)	LC-ESI-MS/MS
Sporkert F. Forensic Sci Int 218:97-100 (2012)	Pelo (30 mg) *Otras matrices: sangre, orina	-	GC-NCI-MS/MS
Ferreira L. Forensic Sci Int 218:123-125 (2012)	Pelo	Extracción por ultrasonidos SPE (OASIS® MAX)	GC-MS
Joya X. J Pharmaceut Biomed Anal 69:209-222 (2012)		Revisión *Otras matrices: EtG, PEth, biomarcadores indirectos del consumo de alcohol	

Tabla 3. Revisión bibliográfica del etil glucuronido (EtG) en muestras de pelo.

Referencias	Matriz biológica	Técnicas de extracción	Técnicas de detección
Maenhout T. Clin Chim Acta 415:322-329 (2013)		Revisión *Otros marcadores: <i>FAEs, PEth</i>	
Pianta A. Alcohol Alcohol 1-8 (2013)	Pelo	SPE (OASIS® MAX)	GC-MS/MS
Stewart S. Alcohol Alcohol 48 (1):83-87 (2013)	Pelo (100 mg) *Otras matrices: <i>sangre, orina</i>	-	LC-MS/MS
Høiseeth G. Alcohol Clin Exp Res 37 (1):14-16 (2013)	Pelo (100 mg)	Extracción por ultrasonidos (2 h)	LC-MS/MS

Tabla 4. Revisión bibliográfica de los ésteres efílicos de los ácidos grasos (FAEEs) en muestras de meconio.

FAEEs en meconio				
Referencias	FAEEs	Matriz biológica	Técnicas de extracción	Técnicas de detección
Bearer C. Alcohol Clin Exp Res 23:3 (1999)	Etil laurato, miristato, palmitato, estearato, oleato, linoleato, linolenato, araquidonato	Meconio (1 g)	Extracción líquido-líquido Cromatografía en columna sílica gel	GC-FID GC-MS
Klein J. Ther Drug Monit 21 (6):644 (1999)	-	Meconio (0.5-1 g)	SPE	GC-FID
Moore C. Clin Chim Acta 312:235-237 (2001)	Etil palmitato, oleato, estearato, linoleato, araquidonato	Meconio (0.5-1 g)	Extracción líquido-líquido SPE	GC-MS
Laposata M. PLEFA 67 (2-3):193-196 (2002)	-	Sangre (0.5 mL)	-	-
Chan D. Ther Drug Monit 25:271-278 (2003)	Etil laurato, miristato, palmitato, heptadecanoato, estearato, oleato, linoleato	Meconio (0.5 g)	Extracción líquido-líquido SPE (aminopropil)	GC-FID
Moore C. Clin Chem 49 (1):133-136 (2003)	Etil palmitoleato, palmitato, linoleato, oleato, estearato, araquidonato	Meconio (0.5-1 g)	Extracción líquido-líquido SPE	GC-Cl-MS
Bearer C. J Pediatr 143:463-469 (2003)	Etil palmitato, oleato, linoleato	Meconio	-	GC-FID Confirmado por GC-MS/MS
Derauf C. Am J Epidemiol 158 (7):705-709 (2003)	-	Meconio (1 g)	-	GC-Cl-MS
Chan D. J Pharmacol Exp Ther 310 (1):75-82 (2004B)	Etil palmitato, estearato, oleato, linoleato	Placenta	Extracción líquido-líquido	GC-FID
Kaphalia B. Alcohol 34:151-158 (2004)	Etil palmitato, estearato, oleato, linoleato, linolenato, araquidonato	Plasma	Extracción líquido-líquido	TLC GC-FID

Tabla 4. Revisión bibliográfica de los ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs) en muestras de meconio.

Referencias	FAEEs	Matriz biológica	Técnicas de extracción	Técnicas de detección
Baricelli J. Salus 8 (1) (2004)	Etil palmitato, estearato, oleato	Sangre cordonal	-	TLC
Chan D. Clin Biochem 37:429-438 (2004A)	-	-	Revisión	-
Bearer C. J Pediatr 146:824-830 (2005)	Etil miristato, palmitato, palmitoleato, oleato, linoleato, linolenato, araquidonato	Meconio (1 g)	Extracción líquido-líquido Cromatografía en columna sílica gel	GC-FID Confirmado por GC-MS
Caprara D. Ann Ist Super Sanità 42 (1):39-45 (2006)	Etil palmitato, oleato, estearato, linoleato	Meconio *Otras matrices: pelo	-	-
Hutson J. JFAS Int 4:15 (2006)	-	Meconio	-	-
Kulig C. J Lab Clin Med 147 (3):133-138 (2006)	Etil palmitato, estearato, oleato, palmitoleato, linoleato, araquidonato	Plasma	-	GC-FID GC-MS
Ostrea E. Alcohol Clin Exp Res 30 (7):1152-1159 (2006)	Etil miristato, palmitato, estearato, laurato, linoleato, oleato, α -linolenato	Meconio (0.5 g)	Extracción líquido-líquido SPE (cartuchos CUNAX® 153)	GC-Cl-MS
Gareri J. Clin Chim Acta 366:101-111 (2006)	-	-	Revisión	-
Hamukseila M. Clin Chem Lab Med 45 (8):953-961 (2007)	-	-	Revisión	-
Politi L. Anal Biochem 368:1-16 (2007B)	-	-	Revisión	-
Littner Y. Neurosci Biobehav Rev 31:261-269 (2007)	-	-	Revisión	-
Burd L. Birth Defects Res (Part A) 82:487-493 (2008)	-	-	Revisión	-

*Otras sustancias: cocaína, opiáceos, cannabinoides, anfetaminas, etanol

*Otros marcadores: PEth, EtG, marcadores indirectos del consumo de alcohol etílico

Tabla 4. Revisión bibliográfica de los ésteres efílicos de los ácidos grasos (FAEEs) en muestras de meconio.

Referencias	FAEEs	Matriz biológica	Técnicas de extracción	Técnicas de detección
Pichini S. J Pharm Biomed Anal 48:927-933 (2008)	Etil miristato, palmitato, estearato, oleato, laurato, palmitoleato, linoleato, linolenato, araquidonato	Meconio (1 g)	Extracción líquido-líquido SPE (aminopropil)	LC-ESI-MS/MS
Algar O. Ther Drug Monit 30 (2):249-254 (2008)	Etil miristato, palmitato, estearato, oleato, laurato, palmitoleato, linoleato, linolenato, araquidonato	Meconio (1 g)	Extracción líquido-líquido SPE (aminopropil)	LC-ESI-MS/MS
Peterson J. J Pediatr 152 (6):788-792 (2008)	Etil miristato, palmitato, oleato, linoleato, linolenato, araquidonato	Meconio	-	-
Gareri J. Ther Drug Monit 30 (2):239-245 (2008)	Etil palmitato, palmitoleato, heptadecanoato, estearato, oleato, linoleato, linolenato, araquidonato	Meconio (0.5-1 g)	Extracción líquido-líquido SPE (aminopropil)	GC-FID GC-MS
Hutson J. J Chromatogr B 877:8-12 (2009)	Etil palmitato, oleato, estearato, linoleato	Meconio (0.05 g)	HS-SPME (Fibra: PDMS/DVB; 65 µm)	GC-MS
Kwak H. J Chromatogr B 878:1871-1874 (2010)	Etil miristato, laurato, palmitato, palmitoleato, estearato, oleato, linoleato, linolenato, araquidonato	Meconio (0.5 g)	Extracción líquido-líquido SPE (aminopropil)	LC-MS/MS
Hutson J. Ther Drug Monit 32 (3):311-317 (2010)	-	Meconio	Extracción líquido-líquido SPE	GC-FID
Zelner I. Ther Drug Monit 32 (3):305-310 (2010)	-	Meconio	HS-SPME	GC-MS
Shor S. Alcohol 44:623-627 (2010)	*Otras sustancias analizadas: anfetaminas, barbitúricos, benzodiazepinas, cannabinoideas, fenciclidina, anti depresivos, meperidina, metadona	Meconio *Otras matrices: pelo	HS-SPME	GC-MS
Bakdash A. Anal Bioanal Chem 396:2469-2477 (2010)	Etil miristato, palmitato, linoleato, oleato, estearato *Otros marcadores: EtG	Meconio (0.05 g)	HS-SPME (Fibra: PDMS/DVB; 65 µm)	GC-MS

Tabla 4. Revisión bibliográfica de los ésteres efílicos de los ácidos grasos (FAEEs) en muestras de meconio.

Referencias	FAEEs	Matriz biológica	Técnicas de extracción	Técnicas de detección
Goh Y. Alcohol 44:629-634 (2010)	Etil palmitato, oleato, linoleato, estearato	Meconio (0.05 g)	HS-SPME (Fibra: PDMS/DVB; 65 µm)	GC-EI-MS
Roehsig M. J Sep Sci 33:2115-2122 (2010)	Etil laurato, miristato, palmitato, palmitoleato, estearato, oleato, linoleato, araquidonato	Meconio (0.1 g)	HS-SPME (PDMS; 100 µm)	GC-CI-MS
Illán F. J Anal Toxicol 35:232-237 (2011)	Etil miristato, palmitato, oleato, estearato	Piel	HS-SPME MAE	GC-MS
Hutson J. Alcohol 45:193-199 (2011)	Etil palmitato, linoleato, oleato, estearato	Meconio (0.5 g)	Extracción líquido-líquido HS-SPME (Fibra: PDMS/DVB; 65 µm)	GC-MS
Pichini S. Alcohol Clin Exp Res 36 (3):417-424 (2012)	Etil palmitato, palmitoleato, estearato, oleato, linoleato, linolenato, araquidonato <i>*Otras marcadores: EtG, EtS</i>	Meconio	-	LC-MS/MS
Manich A. An Pediatr 76 (6):324-328 (2012)	Etil palmitato, palmitoleato, estearato, oleato, linoleato, linolenato, araquidonato	Meconio	-	LC-MS-MS
Joyá X. J Pharmaceut Bioamed Anal 69:209-222 (2012)			Revisión	
Zelner I. J Popul Ther Clin Pharmacol 19 (1):26-31 (2012A)	Etil palmitato, linoleato, oleato, estearato	Meconio	HS-SPME	GC-MS
Zelner I. Alcohol Clin Exp Res 36 (9):1497-1506 (2012B)	Etil palmitato, linoleato, oleato, estearato	Meconio	HS-SPME	GC-MS
Hastedt M. Forensic Sci Med Pathol 9 (3):287-295 (2013)	Etil miristato, palmitato, oleato, estearato, linoleato, linolenato	Meconio (0.05 g)	Extracción líquido-líquido HS-SPME (Fibra: PDMS/DVB; 65 µm)	GC-MS

**Otras sustancias: EtG, PEth, biomarcadores indirectos del consumo de alcohol*

Tabla 4. Revisión bibliográfica de los ésteres efílicos de los ácidos grasos (FAEEs) en muestras de meconio.

REFERENCIAS	FAEEs	Matriz biológica	Técnicas de extracción	Técnicas de detección
Zelner I. Alcohol 46:269-276 (2012C)	Etil palmitato, linoleato, oleato, estearato	Meconio	HS-SPME	GC-MS
Zelner I. PLOS ONE 8 (3):1-10 (2013)	Etil palmitato, linoleato, oleato, estearato	Meconio (0.5 g)	Extracción líquido-líquido HS-SPME (Fibra: PDMS/DVB; 65 µm)	GC-MS

Tabla 5. Revisión bibliográfica del fosfatietilanol (PEth) en muestras de sangre.

PEth en sangre				
Referencias	Especies PEth	Volumen sangre, mL	Técnicas de extracción	Técnicas de detección
Gunmarson T. J Chromatogr B 705:243-249 (1998)	PEth 18:0/18:2 y 18:1/16:0	4	ELL	HPLC-ELSD HPLC-ESI-MS *TLC
Changsek Y. Exp Mol Med 32 (4):243-245 (2000)	Etil bis-(trimetilsilil) fosfato Tris-(trimetilsilil) fosfato	-	-	GC-MS *Derivatización con BSTFA/TMCS
Hansson P. Int J Legal Med 115:158-161 (2001) Varga A.	-	0.3	ELL	HPLC-ELSD
J Lab Clin Med 140 (2):79-83 (2002)	-	-	ELL	HPLC-ELSD
Aradóttir S. Alcohol Alcohol 39 (1):8-13 (2004)	-	1-0.3	ELL	HPLC-ELSD
Tolonen A. Anal Biochem 341:83-88 (2005)	PEth 18:1/18:1	-	ELL	HPLC-TOF-MS
Aradóttir S. BMC Biochemistry 6 (18):1-8 (2005)	-	-	ELL	HPLC-ELSD
Aradóttir S. Alcohol Alcohol 41 (4):431-437 (2006)	-	0.3	ELL	HPLC-ELSD
Hartmann S. Addict Biol 12:81-84 (2006)	-	-	-	HPLC-ELSD
	*Otros marcadores: GGT, MCV			
Nissinen A. Alcohol Clin Exp Res 32 (6):921-928 (2008)	-	-	-	Inmunoensayo (anticuerpos monoclonales)
Kip M. Alcohol Clin Exp Res 32 (7):1284-1991 (2008)	-	-	-	HPLC-ELSD
Bendroth P. Forensic Sci Int 176:76-81 (2008)	-	-	-	HPLC-ELSD
	*Otros marcadores: EtG			

Tabla 5. Revisión bibliográfica del fosfatidiletanol (PEth) en muestras de sangre.

Referencias	Especies PEth	Volumen sangre, mL	Técnicas de extracción	Técnicas de detección
Varga A. Electrophoresis 29:1667-1671 (2008)	-	0.3	ELL	NACE-UV
Raimio J. Legal Medicine 10 (5):229-235 (2008)	Revisión			
Gnann H. J Mass Spectrom 44:1293-1299 (2009)	PEth 18:1/18:1, 16:0/16:0 y 18:1/16:0 (o su isómero 16:0/18:1)	0.3	ELL	LC-ESI-MS/MS
Helander A. Clin Chem 55 (7):1395-1405 (2009B)	PEth 16:0/16:0; 16:0/18:2; 16:0/18:1; 16:0/20:4; 16:0/20:3; 18:1/18:2; 18:1/18:1; 18:0/18:2 y 18:0/18:1	0.1	ELL	LC-ESI-MS
Comasco E. J Stud Alcohol Drugs 70 (5):797-804 (2009)	*Otros marcadores: <i>FAEs</i>	-	-	HPLC-ELSD
Wurst F. Addiction Biology 15:88-95 (2010)	-	-	-	HPLC-ELSD
Stewart S. Alcohol Clin Exp Res 34 (3):488-492 (2010)	-	1	-	LC-MS/MS
Gnann H. Anal Bioanal Chem 396:2415-2423 (2010)	Determinación de 48 especies de PEth. PEth 16:0/18:1 y 16:0/18:2 especies más abundantes	0.3	ELL	LC-ESI-MS/MS
Nalesso A. Electrophoresis 31:1227-1233 (2010)	PEth 16:0/16:0; 16:0/18:1 y 18:1/18:1 PEth 14:0/16:0; 16:0/20:4; 18:4/18:0; 14:0/18:1; 16:1/16:0; 16:0/18:2; 16:0/20:3; 18:1/18:2; 16:0/16:0; 18:0/20:4; 16:0/18:1; 18:1/18:1; 18:0/18:2; 18:0/20:3; 16:0/18:0; 18:0/18:1 y 16:0/20:2	0.3	ELL	NACE-ESI-MS
Nalesso A. J Chromatogr A 1218:8423-8431 (2011)	Especies predominantes: 16:0/18:1; 16:0/18:2 Determinación de 9 especies de PEth Principales: PEth 16:0/18:1 y 16:0/18:2	0.3	ELL	LC-ESI-MS/MS
Zheng Y. Clim Chim Acta 412:1428-1435 (2011)		0.1	ELL	LC-ESI-MS/MS

Tabla 5. Revisión bibliográfica del fosfatidiletanol (PEth) en muestras de sangre.

Referencias	Especies PEth	Volumen sangre, mL	Técnicas de extracción	Técnicas de detección
Faller A. Anal Bional Chem 401:1163-1166 (2011)	PEth 18:1/18:1 y 16:0/18:1 <i>*Impregnación en papel</i>	0.1	ELL	LC-MS/MS
Isaksson A. Drug Test Analysis 3:195-200 (2011)	PEth 16:0/18:1 y 16:0/18:2 ^a	-	ELL	HPLC-ELSD LC-MS/MS ^a
Gnann H. Alcohol Clin Exp Res 36 (9):1507-1510 (2012)	PEth 16:0/18:1	0.3	ELL	LC-MS/MS
Joya X. J Pharmaceut Biomed Anal 69:209-222 (2012)	Revisión			
Winkler M. Int J Legal Med 127 (4):761-768 (2013)	<i>*Otros marcadores: EtG, PEth, biomarcadores indirectos del consumo de alcohol etílico</i> PEth 16:0/18:1 ^a <i>*Otros marcadores: EtG</i>	-	-	HPLC-ELSD LC-MS/MS ^a
Faller A. Int J Legal Med 127 (3):603-610 (2012)	PEth 16:0/18:1 y 18:1/18:1 <i>*Impregnación en papel</i>	0.1	ELL	LC-MS/MS
Kwak H. Clin Toxicol 50:886-891 (2012)	PEth 16:0/18:1 y 18:1/18:1	0.2	ELL	LC-MS/MS

Tabla 6. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación de los FAEEs en muestras de pelo.

FAEEs en pelo			
Referencias	Técnicas de detección	Condiciones de las técnicas de detección	Resultados de validación
Pragst F. Forensic Sci Int 121:76-88 (2001)	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna capilar: HP5-MS (28 m X 0.25 mm X 0.25 µm) ▪ Gas portador: He; Flujo: 1 mL/min ▪ Modo inyección: Splitless ▪ Modo ionización: SIM ▪ Programa de Tª: 2 min-100°C; 20°C/min-300°C-5 min ▪ Iones: Etil miristato: 88, 101, 157, 213, 256; Etil palmitato: 88, 101, 157, 241, 284; Etil Estearato: 88, 101, 157, 269, 312 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta de calibrado: 0-2.5 ng/mg ▪ LOD Etil miristato: 0.015 ng/mg; Etil palmitato: 0.02 ng/mg; Etil estearato: 0.01 ng/mg ▪ LLOQ Etil miristato: 0.05 ng/mg; Etil palmitato: 0.07 ng/mg; Etil estearato: 0.04 ng/mg ▪ Concentración CR: Etil miristato: 0.045-2.4 ng/mg; Etil palmitato: 0.35-13.5 ng/mg; Etil estearato: 0.05-3.85 ng/mg
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna capilar: HP5-MS(28 m X 0.25 mm X 0.25 µm) ▪ Gas portador: He; Flujo: 1 mL/min ▪ Modo inyección: Splitless ▪ Modo ionización: SIM ▪ Programa de Tª: 2 min-100°C; 20°C/min-300°C-5 min 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Concentración FAEEs en abstemios: negativo o trazas ▪ Concentración FAEEs en bebedores sociales < 0.8 ng/mg ▪ Concentración FAEEs en alcohólicos: 1-29 ng/mg
Hartwig S. Forensic Sci Int 131:90-97 (2003A)	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna capilar: HP5-MS (28 m X 0.25 mm X 0.25 µm) ▪ Gas portador: He; Flujo: 1 mL/min ▪ Modo inyección: Splitless ▪ Modo ionización: SIM ▪ Programa de Tª: 2 min-100°C; 20°C/min-300°C-5 min 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LOD Etil miristato: 0.015 ng/mg; Etil palmitato: 0.02 ng/mg; Etil estearato: 0.01 ng/mg ▪ LLOQ Etil miristato: 0.05 ng/mg; Etil palmitato: 0.07 ng/mg; Etil estearato: 0.04 ng/mg ▪ Reproducibilidad: 3-15% ▪ Concentración de FAEEs en abstemios y bebedores sociales < 0.8 ng/mg; en cadáveres: 1-16.3 ng/mg
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna capilar: HP5-MS (28 m X 0.25 mm X 0.25 µm) ▪ Gas portador: He; Flujo: 1 mL/min ▪ Modo inyección: Splitless ▪ Modo ionización: SIM ▪ Programa de Tª: 2 min-100°C; 20°C/min-300°C-5 min 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LOD Etil miristato: 0.015 ng/mg; Etil palmitato: 0.02 ng/mg; Etil estearato: 0.01 ng/mg ▪ LLOQ Etil miristato: 0.05 ng/mg; Etil palmitato: 0.07 ng/mg; Etil estearato: 0.04 ng/mg ▪ Reproducibilidad: 3-15% ▪ Concentración de FAEEs en abstemios y bebedores sociales < 0.8 ng/mg; en cadáveres: 1-16.3 ng/mg
Hartwig S. Alcohol Alcohol 38 (2):163-167 (2003B)	GC-MS		

Tabla 6. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación de los FAEIs en muestras de pelo.

Referencias	Técnicas de detección	Condiciones de las técnicas de detección	Resultados de validación
Yegles M. Forensic Sci Int 145 (2-3):167-173 (2004)	GC-MS	-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cut-off: 1 ng/mg ▪ Concentración pelo abstemios: 0.05-0.37 ng/mg; bebedores sociales: 0.26-0.5 ng/mg; alcohólicos: 0.65-20.5 ng/mg; muertes por alcoholemia: 1.30-30.60 ng/mg
Caprara D. Ther Drug Monit 27 (6):811-815 (2005A)	GC-Cl-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna capilar de sílice fundida CPSil-8 (Chrompack; 30 m X 0.25 mm X 0.25 µm) ▪ Gas portador: He; Flujo: 1 mL/min ▪ Programa Tª: 2 min-100°C; 20 °C/min-300 °C-18 min 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LOD: 0.008-0.02 pmol/mg ▪ LLOQ: 0.008-0.22 pmol/mg
Caprara D. Pediatr Res 58 (6): 1158-1163 (2005B)	GC-Cl-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna capilar de sílice fundida CPSil-8 (Chrompack; 30 m X 0.25 mm X 0.25 µm) ▪ Programa Tª: 2 min-100°C; 20 °C/min-300 °C-18 min ▪ Iones Etil miristato: 257, 255; Etil palmitato: 285, 286; Etil estearato: 313, 314 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ r²: 0.950-0.998 ▪ LOD: 0.008-0.022 pmol/mg ▪ LLOQ: 0.008-0.22 pmol/mg ▪ Concentración CR: 0-1.776 pmol/mg
Kulaga V. Alcohol Alcohol 41 (5):534-539 (2006)	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna capilar HP5-MS (28 m X 0.25 mm X 0.25 µm) ▪ Gas portador: He; Flujo: 1 mL/min ▪ Programa de Tª: 2 min-100 °C; 20 °C/min-300 °C 	-
Caprara D. Ann Ist Super Sanità 42 (1): 39-45 (2006)	GC-Cl-MS	-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LOD Etil miristato: <0.010 pmol/mg; Etil Palmitato: <0.009 pmol/mg; Etil Estearato: <0.008 pmol/mg ▪ LLOQ Etil miristato: 0.010-0.049 pmol/mg; Etil Palmitato: 0.009-0.044 pmol/mg; Etil Estearato: 0.008-0.04 pmol/mg ▪ Recta de calibrado: 0-2 ng/mg ▪ r² etil miristato: 0.9944; r² etil palmitato: 0.9818 ▪ LOD: 0.02 ng/mg ▪ LLOQ: 0.05 ng/mg
Giovanni N. J Anal Toxicol 31:93-97 (2007)	GC-EI-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna capilar Equity-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25 µm) ▪ Programa Tª: 1 min-70 °C; 25 °C/min-290 °C 	-

Tabla 6. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación de los FAEEs en muestras de pelo.

Referencias	Técnicas de detección	Condiciones de las técnicas de detección	Resultados de validación
Giovanni N. J Anal Toxicol 32:156-159 (2008)	GC-EL-MS	<ul style="list-style-type: none"> Columna capilar Equity-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25 µm) Programa Tª: 1 min-70 °C; 25 °C/min-290 °C-5 min iones Etil miristato: 88, 101, 256; Etil palmitato: 88, 101, 284; Etil estearato: 88, 101, 312 	<ul style="list-style-type: none"> Recta de calibrado: 0.05-2 ng/mg
Kulaga V. Alcohol Alcohol 44 (3):287-292 (2009A)	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> Columna capilar VF-Xms(30 m X 0.25 mm X 0.25 µm) Programa Tª: 2 min-70 °C; 20 °C/min-300 °C-0.5 min 	-
Kulaga V. Alcohol 44:615-621 (2010)	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> Columna capilar: HP5-MS (28 m X 0.25 mm X 0.25 µm) Gas portador: He; Flujo: 1 mL/min Modo inyección: Splitless Modo ionización: SIM Programa de Tª: 2 min-100 °C; 20°C/min-300°C-5 min 	<ul style="list-style-type: none"> Cut-off: 0.5 ng/mg Precisión intradía < 3% Precisión interdía < 5% LOD Etil miristato: 0.015 ng/mg; Etil palmitato: 0.02 ng/mg;; Etil estearato: 0.01 ng/mg LLOQ Etil miristato: 0.05 ng/mg; Etil palmitato: 0.07 ng/mg; Etil estearato: 0.04 ng/mg
Pragst F. Forensic Sci Int 196:101-110 (2010)	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> Columna capilar: HP5-MS(28 m X 0.25 mm X 0.25 µm) Gas portador: He; Flujo: 1 mL/min Modo inyección: Splitless Modo ionización: SIM Programa de Tª: 2 min-100°C; 20°C/min-300°C-5 min 	<ul style="list-style-type: none"> LOD: 0.01-0.04 ng/mg
Sübe S. Forensic Sci Int 196:111-117 (2010)	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> Columna capilar HP5-MS(28 m X 0.25 mm X 0.25 µm) Gas portador: He; Flujo: 1 mL/min Modo inyección: Splitless Modo ionización: SIM Programa de Tª: 3 min-90°C; 20°C/min-300°C-5 min iones Etil miristato: 101, 157, 256; Etil palmitato: 101, 157, 284; Etil estearato: 101, 157, 312 	<ul style="list-style-type: none"> Recta de calibrado: Etil miristato y etil estearato: 0.04-0.20 ng/mg; Etil palmitato: 0.16-0.8 ng/mg r² ≥ 0.999 LOD Etil miristato: 0.008 ng/mg; Etil palmitato: 0.022 ng/mg; Etil estearato: 0.01 ng/mg LLOQ Etil miristato: 0.027 ng/mg; Etil palmitato: 0.074 ng/mg; Etil estearato: 0.032 ng/mg Cut-off: 0.5-1 ng/mg

Tabla 6. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación de los FAEs en muestras de pelo.

Referencias	Técnicas de detección	Condiciones de las técnicas de detección	Resultados de validación
Albermann M. Anal Bioanal Chem 400 (1):175-181 (2011)	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna capilar HP5-MS(30 m X 0.25 mm X 0.25 µm) ▪ Gas portador: He; Flujo: 1 mL/min ▪ Programa de T^a: 2 min-100 °C; 20 °C/min-300 °C-5 min ▪ Modo inyección: Splitless ▪ Modo ionización: SIM ▪ Iones Etil miristato: 101, 157, 256; Etil palmitato: 101, 157, 284; Etil Estearato: 101, 157, 312 ▪ Columna capilar HP5-MS (5% fenilmetilsilicona) (30 m X 0.25 mm X 0.25 µm) ▪ Programa de T^a: 0.5 min-100 °C; 12 °C/min-200 °C; 8 °C/min-300 °C-3 min ▪ Iones Etil miristato: 88, 213, 256; Etil Palmitato: 101, 241, 284; Etil Estearato: 157, 269, 312; Etil Oleato: 101, 265, 310 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta de calibrado: 0.02-2.4 ng/mg ▪ r²> 0.99 ▪ LOD: 0.008-0.02 ng/mg ▪ LLOQ: 0.02-0.04 ng/mg
Politi L. J Pharmaceut Biomed Anal 54:1192-1195 (2011)	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta de calibrado: 0.01-0.5 ng/mg ▪ LLOQ: 0.01 ng/mg ▪ Recuperación > 76.5% ▪ Concentración CR: 0.02-17.67 ng/mg ▪ Cut-off: 0.5 ng/mg 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Concentración CR: 0.496-4.984 ng/mg
Gareri J. Anal Bioanal Chem 400:183-188 (2011)	GC-MS	-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Concentración CR: 0.496-4.984 ng/mg
Suesse S. Forensic Sci Int 218 (1-3):82-91 (2012)	GC-MS	-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LOD Etil miristato: 0.008 ng/mg; Etil palmitato: 0.022 ng/mg; Etil estearato: 0.01 ng/mg ▪ LLOQ Etil miristato: 0.027 ng/mg; Etil palmitato: 0.074 ng/mg; Etil estearato: 0.032 ng/mg
Hastedt M. 2013 (DOI 10.1007/s12024-013-9416-8)	-	-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cut-off: 0.675 ng/mg

Tabla 6. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación de los FAEs en muestras de pelo.

Referencias	Técnicas de detección	Condiciones de las técnicas de detección	Resultados de validación
Hastedt M. Forensic Sci Med Pathol 9 (2):184-193 (2013)	-	-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Concentraciones bebedores sociales: 0.008-14.3 ng/mg ▪ Concentraciones bebedores abusivos: 0.010-83.7 ng/mg ▪ Cut-off: 1.08 ng/mg

Tabla 7. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación del EtG en muestras de pelo.

EtG en pelo			
Referencias	Técnicas de detección	Condiciones de las técnicas de detección	Resultados de validación
Janda I. Forensic Sci Int 128:59-65 (2002)	LC-ESI-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna fase reversa Synergy Polar-RP (150 mm X 2mm; 4µm) ▪ Precolumna (4 mm X 2 mm) ▪ Tª columna: 40°C ▪ Fase móvil: Acetonitrilo + 0.1% Ácido fórmico (v/v) ▪ Flujo: 0.2 mL/min ▪ Transiciones EtG: 221-75; EtG-d5: 226-75 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta de calibrado: 25-2000 pg/mg ▪ r² = 0.997 ▪ LOD = 51 pg/mg ▪ LLOQ = 102 pg/mg ▪ Precisión intradía (200 pg/mg) = 11.7% ▪ Precisión intradía (2000 pg/mg) = 5.3% ▪ Precisión interdía (200 pg/mg) = 9.3% ▪ Precisión interdía (2000 pg/mg) = 4.3% ▪ Concentración CR = <LLOQ-13157 pg/mg
Politi L. Addiction 101:1408-1412 (2006)	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna Chrompack Inertsil ODS-3 (100 X 3mm; 3µm) ▪ Precolumna Chrompack (fase reversa; 10 X 2 mm) ▪ Tª columna: 25°C ▪ Modo gradiente: (A) 0.1% Ácido fórmico; (B) Acetonitrilo ▪ Transiciones EtG: 221-75; EtG-d5:226-75 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LOD: 2 pg/mg ▪ LLOQ: 3 pg/mg ▪ Concentración CR = <LOD-434.7 pg/mg ▪ Cut-off = 4-5 pg/mg
Morini L. J Mass Spectrom 41:34-42 (2006)	LC-ESI-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna Chrompack Inertsil ODS-3 (100 X 3mm; 3µm) ▪ Precolumna Chrompack (fase reversa; 10 X 2 mm) ▪ Tª columna: 25°C ▪ Modo gradiente: (A) 0.1% Ácido fórmico; (B) Acetonitrilo ▪ Transiciones EtG: 221-75; EtG-d5: 226-75 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta calibrado: 3-2000 pg/mg ▪ r² = 0.9998 ▪ LOD = 2 pg/mg ▪ LLOQ = 3 pg/mg ▪ Precisión y exactitud inter e intradía < 7% ▪ Efecto matriz ≤ 20% ▪ Concentración CR ≤2-4180 pg/mg ▪ Tiempo de análisis: 21 min
Politi L. Forensic Sci Int 172:23-27 (2007A)	LC-ESI-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna Chrompack Inertsil ODS-3 (100 X 3mm; 3µm) ▪ Precolumna Chrompack (fase reversa; 10 X 2 mm) ▪ Tª columna: 25°C ▪ Modo gradiente: (A) 0.1% Ácido fórmico; (B) Acetonitrilo ▪ Transiciones EtG: 221-75; EtG-d5: 226-75 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LLOQ = 3 pg/mg ▪ Concentración CR <LLOQ-184.3 pg/mg

Tabla 7. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación del EtG en muestras de pelo.

Referencias	Técnicas de detección	Condiciones de las técnicas de detección	Resultados de validación
Kintz P. Forensic Sci Int 176:87-90 (2008)	LC-ESI-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> Columna Acquity BEH HILIC (100 X 2.1 mm; 1.7 μm) Elución en gradiente: (A) Acetonitrilo/Tampón formato (95/5; pH 3); (B) Ácido fórmico 0.1% Modo negativo Flujo: 0.4 mL/min Transiciones EtG: 221-85; EtG-d5: 226-85 	<ul style="list-style-type: none"> Recta de calibrado: 20-2000 pg/mg r^2: 0.9991 LOD: 2 pg/mg LLOQ: 10 pg/mg Recuperación: 80% Efecto matriz: 20-50%
Klys M. Forensic Sci Int 179:1-4 (2008)	LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> Columna LiChroCART Purospher RP 18 (125 X 3 mm; 5 μm) Precolumna LiChroCART (4 X 4 mm; 5 μm) Elución en gradiente: (A) Ácido fórmico en agua 0.1%; (B) Acetonitrilo/A (95/5) Flujo: 0.4 mL/min 	<ul style="list-style-type: none"> Tiempo de análisis: 20 min
Politi L. Int J Legal Med 122:507-509 (2008)	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> Columna Chrompack Inertsil ODS-3 (100 X 3 mm; 3 μm) Precolumna Chrompack (fase reversa; 10 X 2 mm) Tª columna: 25°C Modo gradiente: (A) 0.1% Ácido fórmico; (B) Acetonitrilo 	
Bean P. American Biotechnology Laboratory 26 (7):20-21 (2008)	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> Elución en isocrático: 0.1% Ácido fórmico Transiciones EtG: 221-75; 221-85; EtG-d5: 226-75 	<ul style="list-style-type: none"> Recta de calibrado: 2.5-200 pg/mg LOD: 0.86 pg/mg LLOQ: 1.88 pg/mg
Lamoureux F. Anal Bioanal Chem 394:1895-1901 (2009)	LC-ESI-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> Columna Uptisphere-3SI (100 X 2 mm; 3 μm) Elución isocrática: (A) Acetonitrilo, 95%; (B) Acetato amónico pH 6.8, 5% Modo negativo Flujo: 0.2 mL/min Transiciones EtG: 221-75; EtG-d5: 226-75 	<ul style="list-style-type: none"> Recta calibrado: 10-3000 pg/mg r^2: 0.999 LOD: 4 pg/mg LLOQ: 10 pg/mg
Morini L. Forensic Sci Int 188:140-143 (2009A)	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> Transiciones EtG: 221-75; EtG-d5: 226-75 	<ul style="list-style-type: none"> Recta calibrado: 3-2000 pg/mg LOD: 2 pg/mg LLOQ: 3 pg/mg Concentración CR < LOD-890.5 pg/mg Cut-off: 27 pg/mg

Tabla 7. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación del EtG en muestras de pelo.

Referencias	Técnicas de detección	Condiciones de las técnicas de detección	Resultados de validación
Høiseth G. Alcohol Clin Exp Res 33 (5):812-816 (2009)	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Transiciones EtG: 221-75; EtG-d5: 226-75 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta calibrado: 3-2000 pg/mg ▪ LLOQ: 3 pg/mg ▪ Cut-off: 30 pg/mg
Morini L. Addiction 104:915-920 (2009B)	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna Chrompack Inertsil ODS-3 (100 X 3mm; 3µm) ▪ Precolumna Chrompack (fase reversa; 10 X 2 mm) ▪ Tª columna: 25°C ▪ Modo gradiente: (A) 0.1% Ácido fórmico; (B) Acetonitrilo 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LOD: 2 pg/mg ▪ LLOQ: 3 pg/mg ▪ Cut-off: 27 pg/mg
Concheiro M. J Anal Toxicol 33 (3):155-161 (2009)	LC-ESI-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna Hypercarb (100 x 2.1-mm, 5 µm) ▪ Flujo: 0.2 mL/min ▪ Elución en gradiente: Acetonitrilo/0.1% Ácido fórmico ▪ Modo negativo ▪ Transiciones EtG: 221-221; EtG-d5: 226-226 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta de calibrado: 50-5000 pg/mg ▪ r²: 0.9958 ▪ LOD: 25 pg/mg ▪ LLOQ: 50 pg/mg ▪ Concentración CR: 90-640 ng/mg ▪ Tiempo de análisis: 15 min
Albermann M. Anal Bioanal Chem 396:2441-2447 (2010)	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna fenil propil (Synergy Polar RP 250 X 2 mm; 4 µm) ▪ Precolumna ODS octadecil (4 X 2 mm) ▪ Modo negativo ▪ Modo gradiente: (A) 0.1% Ácido fórmico; (B) Acetonitrilo ▪ Flujo: 0.2 mL/min ▪ Transiciones EtG: 221-75; EtG-d5: 226-85 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta calibración: 2-400 pg/mg ▪ r²= 0.9989 ▪ LOD: 1 pg/mg ▪ LLOQ: 4 pg/mg ▪ Precisión intra e inter día < 6% ▪ Recuperación: 97-98% ▪ Efecto matriz < 15% ▪ Concentración CR < LOD-385 pg/mg ▪ Tiempo de análisis: 14 min
Morini L. Forensic Sci Int 198:23-27 (2010A)	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna C18 ▪ Flujo: 0.2 mL/min ▪ Elución isocrática ▪ Transiciones EtG: 221-75; EtG-d5: 226-75 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta calibrado: 3-2000 pg/mg ▪ LOD: 2 pg/mg ▪ LLOQ: 3 pg/mg

Tabla 7. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación del EtG en muestras de pelo.

Referencias	Técnicas de detección	Condiciones de las técnicas de detección	Resultados de validación
Tarcomnicu I. Forensic Sci Int 196:121-127 (2010)	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna Luna HILIC (150 X 3 mm; 5 µm) ▪ Elución en gradiente: (A) Acetato amónico 2 mM; (B) Acetonitrilo ▪ Flujo: 0.4 mL/min ▪ Modo negativo ▪ Transiciones EtG: 221-85; EtG-d5: 226-85 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta calibrado: 0-10000 pg/mg ▪ r²: 0.99 ▪ LLOQ: 20 pg/mg ▪ Cut-off: 30 pg/mg ▪ Tiempo de análisis: 18 min
Pragst F. Forensic Sci Int 196:101-110 (2010)	LC-ESI-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna Thermo Hypercarb (100 X 2.1 mm; 5µm) ▪ Elución isocrática: Acetonitrilo-0.1% Ácido fórmico ▪ Flujo: 0.3 mL/min ▪ Transiciones EtG: 221-85; EtG-d5: 226-85 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta calibración: 4-8000 pg/mg ▪ r²: 0.998 ▪ LOD: 2 pg/mg ▪ LLOQ: 6 pg/mg ▪ Recuperación: 91% ▪ Tiempo de análisis: 5 min
Albermann M. Anal Bioanal Chem 400:175-181 (2011)	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna Synergi Polar-RP ▪ Modo gradiente: (A) 0.1% Ácido fórmico; (B) Acetonitrilo ▪ Transiciones EtG: 221-75; EtG-d5: 226-85 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LOD: 1 pg/mg ▪ LLOQ: 4 pg/mg
Hastedt M. Alcohol 47 (2):127-132 (2012)	LC-ESI-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna Thermo Hypercarb (100 mm x 2.1 mm x 5 µm) ▪ Transiciones EtG: 221-85; EtG-d5: 226-85 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LOD: 2 pg/mg ▪ LLOQ: 5 pg/mg ▪ Tiempo de análisis: 5 min
Schröder J. Int J Legal Med 126:791-799 (2012)	LC-ESI-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna Thermo Hypercarb (100×2.1 mm, 5µm) ▪ Elución isocrática: Acetonitrilo/0.1% Ácido fórmico ▪ Flujo: 0.3 mL/min ▪ Transiciones EtG: 221-75; EtG-d5: 226-75 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tiempo de análisis: 6 min
Kronstrand R. Forensic Sci Int 215:51-55 (2012)	LC-ESI-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna Acquity UPLC High Strength Silica (HSS) T3 (100 X 2.1 mm; 1.8 µm) ▪ Elución en gradiente: Acetonitrilo/0.1% Ácido fórmico ▪ Modo negativo ▪ Flujo: 0.4 mL/min ▪ Transiciones EtG: 221-85; 221-75; EtG-d5: 226-85 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta de calibrado: 60-10000 pg/mg ▪ LLOQ: 2 pg/mg ▪ Tiempo de análisis: 8 min

Tabla 7. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación del EtG en muestras de pelo.

Referencias	Técnicas de detección	Condiciones de las técnicas de detección	Resultados de validación
Pragst F. Forensic Sci Int 217:4-7 (2012)	LC-MS/MS	-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LLOQ: 2.4 pg/mg
Albermann M. Anal Bioanal Chem 403:769-776 (2012)	LC-ESI-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna Hypercarb (10×2.5 mm, 5 µm) ▪ Precolumna ODS Octadecil (4×2 mm) ▪ Elución en gradiente: (A) Acetonitrilo; (B) 0.1% Ácido fórmico ▪ Modo negativo ▪ Transiciones EtG: 221-75; EtG-d5: 226-85 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta de calibración: 4- 400 pg/mg ▪ $r^2 > 0.999$ ▪ LOD: 1.7 pg/mg ▪ LLOQ: 2.3 pg/mg ▪ Precisión intra e inter día < 5% ▪ Recuperación: 98-102% ▪ Efecto matriz: 0.6-5% ▪ Tiempo de análisis: 18 min
Stewart S. Alcohol Alcohol 48 (1):83-87 (2013)	LC-MS/MS	-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LOD: 2 pg/mg ▪ LLOQ: 8 pg/mg
Høiseith G. Alcohol Clin Exp Res 37 (1):14-16 (2013)	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Elución en isocrático: Acetonitrilo/0.1% Ácido fórmico 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta de calibrado: 3- 200 pg/mg ▪ LOD: 2 pg/mg ▪ LLOQ: 3 pg/mg

Tabla 8. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación de los FAEs en muestras de meconio.

FAEs en meconio		
Referencias	Técnicas de detección	Resultados de validación
	Condiciones de las técnicas de detección	
Moore C. Clin Chim Acta 312:235-237 (2001)	GC-Cl-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta de calibrado: 25-5000 ng/g ▪ LLOQ: 50 ng/g ▪ Cut-off: 50 ng/g
Moore C. Clin Chem 49 (1):133-136 (2003)	GC-Cl-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna de sílice fundida (30 m X 0.25 mm X 0.25 µm) ▪ Tª horno: 50 °C-1 min; 20 °C/min-310 °C ▪ Modo splitless ▪ Ionización química positiva ▪ Modo ionización: SCAN ▪ Iones Etil Palmitato: 285, 286, 284; Etil Estearato: 313, 312, 314
Derauf C. Am J Epidemiol 158 (7):705-709 (2003)	GC-Cl-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cut-off: 50 ng/g
Ostrea E. Alcohol Clin Exp Res 30 (7):1152-1159 (2006)	GC-Cl-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna HP5-MS (30 m X 0.25 mm X 0.25 µm) ▪ Gas portador: He; Flujo: 1 mL/min ▪ Modo ionización: SIM ▪ Modo inyección: Splitless ▪ Programa Tª: 100 °C; 25 °C/min-200 °C; 5 °C/min-300 °C-5 min ▪ r²: 0.96-0.98 ▪ LOD Etil miristato: 0.05 µg/g; Etil palmitato: 0.05 µg/g; Etil estearato: 0.10 µg/g ▪ Recuperación: 101% ▪ Precisión inter día e intradía: 12.1; 4.6%
Gareri J. Ther Drug Monit 30 (2):239-245 (2008)	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LOD: 100 ng/g ▪ Cut-off ≥ 2 nmol/g

Tabla 8. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación de los FAEEs en muestras de meconio.

Referencias	Técnicas de detección	Condiciones de las técnicas de detección	Resultados de validación
Hutson J. J Chromatogr B 877:8-12 (2009)	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna capilar Factor Four (30 m X 0.25 mm X 0.25 µm) ▪ Gas portador: He; Flujo: 1 mL/min ▪ Modo inyección: splitless ▪ Modo ionización: SIM ▪ Programa Tª: 70 °C-2 min; 20 °C/min-300 °C-1min ▪ Iones Etil palmitato: 284; Etil estearato: 312 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LOD Etil palmitato: 0.05 nmol/g; Etil estearato: 0.05 nmol/g ▪ LOQ Etil palmitato: 0.14 nmol/g; Etil estearato: 0.13 nmol/g ▪ Recuperación Etil palmitato: 11.7%; Etil estearato: 3.3% ▪ Concentración CR: < LLOQ-89,6 nmol/g
Zelner I. Ther Drug Monit 32 (3):305-310 (2010)	GC-MS	-	-
Shor S. Alcohol 44:623-627 (2010)	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna capilar Factor Four (30 m X 0.25 mm X 0.25 µm) ▪ Gas portador: He; Flujo: 1 mL/min ▪ Modo inyección: splitless ▪ Modo ionización: SIM ▪ Programa Tª: 70 °C-2 min; 20 °C/min-300 °C-1min ▪ Iones Etil palmitato: 284; Etil estearato: 312 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LOD Etil palmitato: 0.05 nmol/g; Etil estearato: 0.05 nmol/g ▪ LOQ Etil palmitato: 0.14 nmol/g; Etil estearato: 0.13 nmol/g ▪ Recuperación Etil palmitato: 11.7%; Etil estearato: 3.3% ▪ Concentración CR: < LLOQ-89,6 nmol/g
Bakdash A. Anal Bioanal Chem 396:2469- 2477 (2010)	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna capilar: HP5-MS(28 m X 0.25 mm X 0.25 µm) ▪ Gas portador: He; Flujo: 1 mL/min ▪ Modo inyección: Splitless ▪ Modo ionización: SIM ▪ Programa de Tª: 2 min-100°C; 20°C/min-300°C-5 min 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta de calibrado: 100-200000 ng/g ▪ r²: 0.997-0.999 ▪ LOD Etil miristato, palmitato y estearato: 15 ng/g ▪ LLOQ Etil miristato, palmitato y estearato: 50 ng/g
Goh Y. Alcohol 44:629-634 (2010)	GC-ESI-MS	-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LOD Etil palmitato y estearato: 15 ng/g ▪ Cut-off ≥ 2nmol/g

Tabla 8. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación de los FAEs en muestras de meconio.

Referencias	Técnicas de detección	Condiciones de las técnicas de detección	Resultados de validación
Roehsig M. J Sep Sci 33:2115-2122 (2010)	GC-CL-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna capilar de sílice fundida HP5-MS (30 m X 0.25 mm X 0.1 µm) ▪ Gas portador: He; Flujo: 1 mL/min ▪ Programa T^{ra}: 1 min-80 °C; 10 °C/min-200 °C-5 min; 15 °C/min-280 °C-3 min ▪ Iones Etil laurato: 229; Etil miristato: 257; E 16:1: 283; Etil palmitato: 285; E 18:2: 307; Etil oleato: 311; Etil estearato: 313; Etil araquidonato: 333 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Curva calibración: LOQ-2000 ng/g ▪ LOD: 5-100 ng/g ▪ LLOQ: 10-150 ng/g ▪ Cut-off: 2 nmol/g
Hutson J. Alcohol 45:193-199 (2011)	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna capilar Factor Four (30 m X 0.25 mm X 0.25 µm) ▪ Gas portador: He; Flujo: 1 mL/min ▪ Modo inyección: splitless ▪ Modo ionización: SIM ▪ Programa T^{ra}: 70 °C-2 min; 20 °C/min-300 °C-1min ▪ Iones Etil palmitato: 284; Etil estearato: 312 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LOD Etil palmitato: 11.8 ng/g; Etil estearato: 6.3 ng/g ▪ LLOQ Etil palmitato: 35.41 ng/g; Etil estearato: 18.8 ng/g ▪ Cut-off ≥ 2 nmol/g ▪ Recuperación: 302-19,5% ▪ Concentración CR Etil palmitato: <LLOQ-6.67 nmol/g; Etil estearato: <LLOQ-0.67 nmol/g
Zelner I. J Popul Ther Clin Pharmacol 19 (1):26-31 (2012A)	GC-MS	-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cut-off ≥ 2 nmol/g
Zelner I. Alcohol Clin Exp Res 36 (9):1497-1506 (2012B)	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna capilar Factor Four (30 m X 0.25 mm X 0.25 µm) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cut-off ≥ 2 nmol/g

Tabla 8. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación de los FAEEs en muestras de meconio.

Referencias	Técnicas de detección	Condiciones de las técnicas de detección	Resultados de validación
Zelner I. Alcohol 46:269-276 (2012C)	GC-MS	-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cut-off ≥ 2 nmol/g
Hastedt M. Forensic Sci Med Pathol 9 (3):287-295 (2013)	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna capilar de sílice fundida HP5-MS (30 m X 0.25 mm X 0.25 μm) ▪ Gas portador: He; Flujo: 1 mL/min ▪ Programa T$^{\circ}$: 70 $^{\circ}$C-2 min; 10 $^{\circ}$C/min-300 $^{\circ}$C ▪ Modo ionización: SIM ▪ Iones Etil miristato: 101, 157, 256; Etil palmitato: 101, 241, 284; Etil estearato: 101, 157, 312 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta calibrado: 0.05-10 ng/mg ▪ r2: 0.9846-0.9999
Zelner I. PLOS ONE 8 (3):1-10 (2013)	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna capilar Factor Four 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ r2: 0.98-1 ▪ LOD: 3.682-4.941 ng/g ▪ LLOQ: 12.274-16.470 ng/g

Tabla 9. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación del PEth en muestras de sangre.

PEth en sangre			
Referencias	Técnicas de detección	Condiciones de las técnicas de detección	Resultados de validación
Gunnarson T. J Chromatogr B 705:243-249 (1998)	HPLC-ESI-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Modo negativo ▪ Columna fase reversa Luna C8 (50 mm X 2 mm; 3 µm) ▪ Precolumna (4 mm X 2 mm) ▪ Elución en gradiente: A (Acetato amónico 2mM); B (Metanol:Acetona, 95:5, v/v) ▪ Modo negativo ▪ Transiciones PEth (16:0/18:1): 701.5-281.2, 255.2, 181.0 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ C.V. < 13 % ▪ Tiempo de análisis: 65 min ▪ r²: 0.995-0.992 ▪ LOD: 14-45 ng/mL ▪ LOQ: 17-54 ng/mL ▪ Precisión y exactitud <9% ▪ Recuperación: 33.3-33.7% ▪ Efecto matriz: 80-120% ▪ Tiempo de análisis: 15 min
Gnann H. J Mass Spectrom 44:1293-1299 (2009)	LC-ESI-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna HyPurity C4 (50 X 3 mm; 5 µm) ▪ T^a columna: 25°C ▪ Elución en gradient: A (20% Acetato amónico 2 mM + 80% ACN); B (isopropanol) ▪ Flujo: 0.2 mL/min ▪ Transiciones PEth: 701.7-255.5, 281.5 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta de calibrado: 0.2-7 µmol/L ▪ LOD<0.02 µmol/L ▪ LOQ<0.1 µmol/L ▪ Precisión intradía <9%; Precisión interdía <11% ▪ Efecto matriz: 10% ▪ Concentración CR: 0.1-21.7 µmol/L ▪ Tiempo de análisis: 8 min
Helander A. Clin Chem 55 (7):1395-1405 (2009B)	LC-ESI-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna Luna Phenyl Hexyl (50 mm X 2 mm X 3 µm) ▪ Elución en gradiente: A (Acetato amónico 2 mM); B (Metanol:Acetona; 95:5, v/v) ▪ Flujo: 0.4 mL/min ▪ Modo negativo ▪ Transiciones PEth: 701.6-255.3, 281.3 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LOD: 19.8 ng/mL ▪ Precisión intradía: 3.1 %; Precisión interdía: 6.3% ▪ Cutoff ≥ 20 ng/mL ▪ LOD: 0.04 µmol/L ▪ Tiempo de análisis: 15 min
Stewart S. Alcohol Clin Exp Res 34 (3):488-492 (2010)	LC-MS/MS		
Gnann H. Anal Bioanal Chem 396:2415-2423 (2010)	LC-ESI-MS/MS		

Tabla 9. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación del PETH en muestras de sangre.

Referencias	Técnicas de detección	Condiciones de las técnicas de detección	Resultados de validación
Isaksson A. Drug Test Analysis 3:195-200 (2011)	HPLC-ELSD LC-MS/MS	-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LLOQ: 0.7 µmol/L
Nalesso A. J Chromatogr A 1218:8423-8431 (2011)	LC-ESI-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna Zorbax XDB C18 (50 mm X 4.6 mm; 1.8 µm) ▪ Tª: 350°C ▪ Modo negativo ▪ Elución en gradiente: A (ACN); B (Acetato amónico 10 mM); C (2-propanol) ▪ Flujo: 0.2 mL/min ▪ Transiciones PETH: 701.5-255.2, 281.2 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Especies validación: 16:0/16:0; 18:1/18:1 ▪ Recta de calibrado: 0.001-2.0 µM ▪ r²>0.999 ▪ LOD: 0.0005 µM ▪ LLOQ: 0.001 µM ▪ Precisión intra e inter día < 10% ▪ Exactitud < 15% ▪ Recuperación 80% ▪ Tiempo de análisis: 22 min
Zheng Y. Clin Chim Acta 412:1428-1435 (2011)	LC-ESI-MS(/MS)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna HyPurity C4 (5 µm) ▪ Tª Columna: 25°C ▪ Modo negativo ▪ Elución en gradiente: A (20% Acetato amónico 2 mM + 80% ACN); B (100% Isopropanol) ▪ Flujo: 0.2 mL/min ▪ Transiciones PETH: 701.7-255.5, 281.5 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta de calibrado: 0-7 µmol/L ▪ LOD: 0.009 µmol/L ▪ LLOQ: 0.03 µmol/L ▪ Tiempo de análisis: 8 min
Faller A. Anal Bional Chem 401:1163-1166 (2011)	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna HyPurity C4 (50 X 3mm; 5 µm) ▪ Modo negativo ▪ Elución en gradiente: A (Acetato amónico 2 mM); B (Isopropanol) ▪ Flujo: 0.2 mL/min ▪ Transiciones PETH: 701.5-281.2, 255.3 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PETH 18:1/18:1a; 16:0/18:1b ▪ Recta de calibrado: 50-5000 ng/mL ▪ LOD: 8.86 ng/mL; 24.4 ng/mLb ▪ LLOQ: 22.7 ng/mL; 87.3 ng/mLb ▪ Concentración CR: 46.1-3360 ng/mL; 922-213000 ng/mLb ▪ Tiempo de análisis: 10 min

Tabla 9. Revisión bibliográfica de las técnicas de detección usadas para la determinación del PEth en muestras de sangre.

Referencias	Técnicas de detección	Condiciones de las técnicas de detección	Resultados de validación
Gnann H. Alcohol Clin Exp Res 36 (9):1507-1510 (2012)	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna Luna Phenyl Hexyl (50 mm X2 mm X3 µm) ▪ Elución en gradiente: A (Acetato amónico 2 mM); B (Metanol:Acetona; 95:5, v/v) ▪ Flujo: 0.4 mL/min ▪ Modo negativo ▪ Transiciones PEth: 701.5-281.2, 255.2 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta de calibrado: 30-300 ng/mL ▪ LLOQ: 30 ng/mL ▪ Tiempo de análisis: 15 min
Winkler M. Int J Legal Med 127 (4):761-768 (2013)	HPLC-ELSD LC-MS/MS	-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recta de calibrado: 20-2000 ng/mL
Faller A. Int J Legal Med 127 (3):603-610 (2012)	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Columna HyPurity C4 (50 X 3 mm; 5 µm) ▪ Modo negativo ▪ Elución en gradiente: A (Acetato amónico, 2 mM); B (Isopropanol) ▪ Flujo: 0.2 mL/min ▪ Transiciones PEth: 701.5-281.2, 255.3 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Precisión inter día < 7% ▪ Tiempo de análisis: 8 min

Referencias bibliográficas

- Agius R.; Ferreira L.; Yegles M. Can ethyl glucuronide in hair be determined only in 3 cm hair strands? *Forensic Sci Int* 218:3–9 (2012).
- Agius R.; Nadulski T.; Kahl H.; Schröder J.; Dufaux B.; Yegles M.; Pragst F. Validation of a headspace solid-phase microextraction-GC-MS/MS for the determination of ethyl glucuronide in hair according to forensic guidelines. *Forensic Sci Int* 196:3-9 (2010).
- Agius R.; Nadulski T.; Kahl H.G.; Dufaux B. Ethyl glucuronide in hair. A highly effective test for the monitoring of alcohol consumption. *Forensic Sci Int* 218:10–14 (2012).
- Albermann M.; Musshoff F.; Madea B. A fully validated high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair for the proof of strict alcohol abstinence. *Anal Bioanal Chem* 396:2441-2447 (2010).
- Albermann M.; Musshoff F.; Madea B. Comparison of ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEEs) concentrations in hair for testing abstinence. *Anal Bioanal Chem* 400 (1):175-181 (2011).
- Albermann M.E.; Musshoff F.; Aengenheister L.; Madea B. Investigations on the influence of different grinding procedures on measured ethyl glucuronide concentrations in hair determined with an optimized and validated LC-MS/MS method. *Anal Bioanal Chem* 403:769–776 (2012).
- Alt A.; Janda I.; Seidl S.; Wurst F. Determination of ethyl glucuronide in hair samples. *Alcohol Alcohol* 35 (3):313-314 (2000).

Álvarez I.; Bermejo A.M.; Cid P.; Tabernero M.J.; Fernández P.; López P. Microwave assisted extraction for the determination of ethyl glucuronide in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Appl Toxicol* 28:773-778 (2008).

Álvarez I.; Bermejo A.M.; Tabernero M.J.; Fernández P.; Cabarcos P.; López P. Microwave-assisted extraction: a simpler and faster method for the determination of ethyl glucuronide in hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 393:1345-1350 (2009).

Appenzeller B.; Agirman R.; Neuberg P.; Yegles M.; Wennig R. Segmental determination of ethyl glucuronide in hair: a pilot study. *Forensic Sci Int* 173:87-92 (2007).

Appenzeller B.; Schuman M.; Yegles M.; Wennig R. Ethyl glucuronide concentration in hair is not influence by pigmentation. *Alcohol Alcohol* 42 (4):326-327 (2007).

Aradottir S.; Asanovska G.; Gjerss S.; Hansson P.; Alling C. Phosphatidylethanol concentrations in blood are correlated to reported alcohol intake in alcohol-dependent patients. *Alcohol Alcohol* 41 (4):431-437 (2006).

Aradottir S.; Moller K.; Alling C. Phosphatidylethanol formation and degradation in human and rat blood. *Alcohol Alcohol* 39 (1):8-13 (2004).

Aradottir S.; Olsson B. Methodological modifications on quantification of phosphatidylethanol in blood from humans abusing alcohol, using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. *BMC Biochemistry* 6 (18):1-8 (2005).

- Auwärter V.; Kiebling B.; Pragst F. Squalene in hair-a natural reference substance for the improved interpretation of fatty acid ethyl ester concentrations with respect to alcohol misuse. *Forensic Sci Int* 145:149-159 (2004).
- Auwärter V.; Sporkert F.; Hartwig S.; Pragst F.; Vater H.; Diefenbacher A. Fatty acid ethyl esters in hair as markers of alcohol consumption. Segmental hair analysis of alcoholics, social drinkers and teetotalers. *Clin Chem* 47 (12):2114-2123 (2001).
- Bakdash A.; Burger P.; Goecke T.; Fasching P.; Reulbach U.; Bleich S.; Hastedt M.; Rothe M.; Beckmann M.; Pragst F.; Kornhuber J. Quantification of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in meconium from newborns for detection of alcohol abuse in a maternal health evaluation study. *Anal Bioanal Chem* 396:2469-2477 (2010).
- Baricelli J.; Barrera G.; González J.; Leal M.; González D. Niveles de ésteres etil de ácidos grasos (FAEE) y perfil enzimático hepático en sangre cordonal de recién nacidos de madres consumidoras de alcohol. *Salus* 8 (1) (2004).
- Bean P. New findings with ethyl glucuronide testing in hair samples. *American Biotechnology Laboratory* 26 (7):20-21 (2008).
- Bearer C.; Jacobson J.; Jacobson S.; Barr D.; Croxford J.; Molteno C. Validation of a new biomarker of fetal exposure to alcohol. *J Pediatr* 143:463-469 (2003).
- Bearer C.; Lee S.; Salvator A.; Minnes S.; Swick A.; Yamashita T.; Singer L. Ethyl linoleato in meconium. A biomarker for prenatal ethanol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 23 (3):487-493 (1999).

- Bearer C.; Santiago L.M.; O'Riordan M.; Buck K.; Lee S.; Singer L. Fatty acid ethyl esters: Quantitative biomarkers for maternal alcohol consumption. *J Pediatr* 146:824-830 (2005).
- Bendroth P.; Kronstrand R.; Helander A.; Greby J.; Stephanson N.; Krantz P. Comparison of ethyl glucuronide in hair with phosphatidylethanol in whole blood as post-mortem markers of alcohol abuse. *Forensic Sci Int* 176:76-81 (2008).
- Bernhardt T.; Cannistraro P.; Bird D.; Doyle K.; Laposata M. Purification of fatty acid ethyl esters by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 675:189-196 (1996).
- Best C.; Laposata M.; Proios V.; Szczepiorkowski Z. Method to assess fatty acid ethyl ester binding to albumin. *Alcohol Alcohol* 41 (3):240-246 (2006).
- Borucki K.; Dierkes J.; Wartberg J.; Westphal S.; Genz A.; Luley C. In heavy drinkers, fatty acid ethyl esters remain elevated for up to 99 hours. *Alcohol Clin Exp Res* 31 (3):423-427 (2007).
- Branowski S.; Serr A.; Thierauf A.; Weinmann W.; Grobe M.; Wurst F.; Halter C. In vitro study of bacterial degradation of ethyl glucuronide and ethyl sulphate. *Int J Legal Med* 122 (5):389-393 (2008).
- Burd L.; Hofer R. Biomarkers for detection of prenatal alcohol exposure. A critical review of fatty acid ethyl esters in meconium. *Birth Defects Res (Part A)* 82:487-493 (2008).

Caprara D.; Brien J.F.; Iqbal U.; Reynolds J.N.; Klein J.; A Guinea pig model for the identification of in utero alcohol exposure using fatty acid ethyl esters in neonatal hair. *Pediatr Res* 58 (6):1158-1163 (2005B).

Caprara D.; Klein J.; Koren G. Baseline measures of fatty acid ethyl esters in hair of neonates born to abstaining or mild social drinking mothers. *Ther Drug Monit* 27 (6):811-815 (2005A).

Caprara D.; Klein J.; Koren G. Diagnosis of fetal alcohol spectrum disorder (FASD): fatty acid ethyl esters and neonatal hair analysis. *Ann Ist Super Sanità* 42 (1):39-45 (2006).

Caprara D.; Nash K.; Greenbaum R.; Rovet J.; Koren G. Novel approaches to the diagnosis of fetal alcohol spectrum disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 31:254-260 (2007).

Chan D.; Bar-Oz B.; Pellerin B.; Paciorek C.; Klein J.; Kapur B.; Farine D.; Koren G. Population baseline of meconium fatty acid ethyl esters among infants of nondrinking women in Jerusalem and Toronto. *Ther Drug Monit* 25:271-278 (2003).

Chan D.; Caprara D.; Blanchette P.; Klein J.; Koren G. Recent developments in meconium and hair testing methods for the confirmation of gestational exposures to alcohol and tobacco smoke. *Clin Biochem* 37:429-438 (2004A).

Chan D.; Knie B.; Boskovic R.; Koren G. Placental handling of fatty acid ethyl esters. Perfusion and subcellular studies. *JPET* 310 (1):75-82 (2004B).

- Changsuek Y.; Han J. Analysis of trimethylsilyl derivatization products of phosphatidylethanol by gas chromatography-mass spectrometry. *Exp Mol Med* 32 (4):243-245 (2000).
- Comasco E.; Nordquist N.; Leppert J.; Orelund L.; Kronstrand R.; Alling C.; Nilsson K. Adolescent alcohol consumption: Biomarkers PEth and FAEE in relation to interview and questionnaire data. *J Stud Alcohol Drugs* 70 (5):797-804 (2009).
- Concheiro M.; Cruz A.; Mon M.; de Castro A.; Quintela O.; Lorenzo A.; López-Rivadulla M. Ethyl glucuronide determination in urine and hair from alcohol withdrawal patients. *J Anal Toxicol* 33 (3):155-161 (2009).
- Derauf C.; Katz A.; Easa D. Agreement between maternal self-reported ethanol intake and tobacco use during pregnancy and meconium assays for fatty acid ethyl esters and cotinine. *Am J Epidemiol* 158 (7):705-709 (2003).
- Faller A.; Richter B.; Kluge M.; Koenig P.; Seitz H.; Skopp G. Stability of phosphatidylethanol species in spiked and authentic whole blood and matching dried blood spots. *Int J Legal Med* 127 (3):603-610 (2012).
- Faller A.; Richter B.; Kluge M.; Koenig P.; Seitz H.; Thierauf A.; Gnann H.; Winkler M.; Mattern R.; Skopp G. LC-MS/MS analysis of phosphatidylethanol in dried blood spots versus conventional blood specimens. *Anal Bioanal Chem* 401:1163-1166 (2011).
- Ferreira L.; Binz T.; Yegles M. The influence of ethanol containing cosmetics on ethyl glucuronide concentration in hair. *Forensic Sci Int* 218:123-125 (2012).

García-Algar O.; Kulaga V.; Gareri J.; Koren G.; Vall O.; Zuccaro P.; Pacifici R.; Pichini S. Alarming prevalence of fetal alcohol exposure in a mediterranean city. *Ther Drug Monit* 30 (2):249-254 (2008).

Gareri J.; Appenzeller B.; Walasek P. Impact of hair care products on FAEE hair concentrations in substance abuse monitoring. *Anal Bioanal Chem* 400:183-188 (2011).

Gareri J.; Klein J.; Koren G. Drugs of abuse testing in meconium. *Clin Chim Acta* 366:101-111 (2006).

Gareri J.; Lynn H.; Handley M.; Rao C.; Koren G. Prevalence of fetal ethanol exposure in a regional population based sample by meconium analysis of fatty acid ethyl esters. *Ther Drug Monit* 30 (2):239-245 (2008).

Giovanni N.; Donadio G.; Chiarotti M. Ethanol contamination leads to fatty acid ethyl esters in hair samples. *J Anal Toxicol* 32:156-159 (2008).

Giovanni N.; Donadio G.; Chiarotti M. The reliability of fatty acid ethyl esters (FAEE) as biological markers for the diagnosis of alcohol abuse. *J Anal Toxicol* 31:93-97 (2007).

Gnann H.; Enfelmann C.; Skopp G.; Winkler M.; Auwärter V.; Dresen S.; Ferreirós N.; Wurst F.; Weinmann W. Identification of 48 homologues of phosphatidylethanol in blood by LC-ESI-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 396:2415-2423 (2010).

Gnann H.; Weinmann W.; Engelmann C.; Wurst F.; Skopp G.; Winkler M.; Thierauf A.; Auwärter V.; Dresen S.; Bourzas N. Selective detection of

phosphatidylethanol homologues in blood as biomarkers for alcohol consumption by LC-ESI-MS/MS. *J Mass Spectrom* 44:1293-1299 (2009).

Gnann H.; Weinmann W.; Thierauf A. Formation of phosphatidylethanol and its subsequent elimination during an extensive drinking experiment over 5 days. *Alcohol Clin Exp Res* 36 (9):1507-1510 (2012).

Goh Y.; Hutson J.; Lum L.; Roukema H.; Gareri J.; Lynn H.; Koren G. Rates of fetal alcohol exposure among newborns in a high-risk obstetric unit. *Alcohol* 44:629-634 (2010).

Gunnarsson T.; Karlsson A.; Hansson P.; Johnson G.; Alling C.; Odham G. Determination of phosphatidylethanol in blood from alcoholic males using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering or electrospray mass spectrometric detection. *J Chromatogr B* 705:243-249 (1998).

Hannuksela M.; Liisanantti M.; Nissinen A.; Savolainen M. *Clin Chem Lab Med* 45 (8):953-961 (2007).

Hansson P.; Varga A.; Krantz P.; Alling C. Phosphatidylethanol in post-mortem blood as a marker of previous heavy drinking. *Int J Legal Med* 115:158-161 (2001).

Hartmann S.; Aradottir S.; Graf M.; Wiesbeck G.; Lesch O.; Ramskogler K.; Wolfersdorf M.; Alling C.; Wurst F. Phosphatidylethanol as a sensitive and specific biomarker-comparison with gamma-glutamyltranspeptidase, mean corpuscular volume and carbohydrate-deficient transferrin. *Addict Biol* 12:81-84 (2006).

Hartwig S.; Auwärter V.; Pragst F. Effect of hair care and hair cosmetics on the concentrations of fatty acid ethyl esters in hair as markers of chronically elevated alcohol consumption. *Forensic Sci Int* 131:90-97 (2003A).

Hartwig S.; Auwärter V.; Pragst F. Fatty acid ethyl esters in scalp, pubic, axillary, beard and body hair as markers for alcohol misuse. *Alcohol Alcohol* 38 (2):163-167 (2003B).

Hastedt M.; Bossers L.; Krumbiegel F.; Herre S.; Hartwig S. *Forensic Sci Med Pathol* 9(2):184-193 (2013).

Hastedt M.; Büchner M.; Rothe M.; Gapert R.; Herre S.; Krumbiegel F.; Tsokos M.; Kienast T. Detecting alcohol abuse: traditional blood alcohol markers compared to ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEEs) measurement in hair. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, DOI 10.1007/s12024-013-9416-8.

Hastedt M.; Herre S.; Pragst F.; Rothe M.; Hartwig S. Workplace alcohol testing program by combined use of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters in hair. *Alcohol Alcohol* 47 (2):127-132 (2012).

Hastedt M.; Krumbiegel F.; Gapert R.; Tsokos M.; Hartwig S. *Forensic Sci Med Pathol* DOI 10.1007/s12024-012-9385-3.

Helander A.; Böttcher M.; Fehr C.; Dahmen N.; Beck O. Detection times for urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate in heavy drinkers during alcohol detoxification. *Alcohol Alcohol* 44 (1):55-61 (2009A).

- Helander A.; Zheng Y. Molecular species of the alcohol biomarker phosphatidylethanol in human blood measured by LC-MS. *Clin Chem* 55 (7):1395-1405 (2009B).
- Høiseth G.; Bernard J.; Karinen R.; Johnsen L.; Helander A.; Christophersen A.; Morland J. A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: application to forensic toxicology. *Forensic Sci Int* 172:119-124 (2007).
- Høiseth G.; Morini L.; Ganss R.; Nordal K.; Mørland J. Higher levels of hair ethyl glucuronide in patients with decreased kidney function. *Alcohol Clin Exp Res* 37 (1): 14-16 (2013).
- Høiseth G.; Morini L.; Poletini A.; Christophersen A.; Mørland J. Ethyl glucuronide in hair compared with traditional alcohol biomarkers. A pilot study of heavy drinkers referred to an alcohol detoxification unit. *Alcohol Clin Exp Res* 33 (5):812-816 (2009).
- Hutson J. Meconium fatty acid ethyl esters and prediction of fetal alcohol effects. *JFAS Int* 4:15 (2006).
- Hutson J.; Aleksa K.; Pragst F.; Koren G. Detection and quantification of fatty acid ethyl esters in meconium by headspace-solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 877:8-12 (2009).
- Hutson J.; Magri R.; Gareri J.; Koren G. The incidence of prenatal alcohol exposure in Montevideo Uruguay as determined by meconium analysis. *Ther Drug Monit* 32 (3):311-317 (2010).

Hutson J.; Rao C.; Fulga N.; Aleksa K.; Koren G. An improved method for rapidly quantifying fatty acid ethyl esters in meconium suitable for prenatal alcohol screening. *Alcohol* 45:193-199 (2011).

Illán F.; Ojeda-Torres G.; Díaz-Vázquez L.; Rosario O. Detection of fatty acid ethyl esters in skin surface lipids as biomarkers of ethanol consumption in alcoholics, social drinkers, light drinkers and teetotalers using a methodology based on microwave-assisted extraction followed by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 35:232-237 (2011).

Isaksson A.; Walther L.; Hansson T.; Andersson A.; Alling C. Phosphatidylethanol in blood (B-PEth): a marker for alcohol use and abuse. *Drug Test Analysis* 3:195-200 (2011).

Janda I.; Weinmann W.; Kuehnle T. Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC-MS/MS. *Forensic Sci Int* 128:59-65 (2002).

Joya X.; Friguls B.; Ortigosa S.; Papaseit E.; Martínez S.; Manich A.; García-Algar O.; Pacifici R.; Vall O.; Pichini S. Determination of maternal-fetal biomarkers of prenatal exposure to ethanol: a review. *J Pharmaceut Biomed Anal* 69:209-222 (2012).

Joya X.; Friguls B.; Ortigosa S.; Papaseit E.; Martínez S.E.; Manich A.; García-Algar O.; Pacifici R.; Vall O.; Pichini S. Determination of maternal-fetal biomarkers of prenatal exposure to ethanol: a review. *J Pharmaceut Biomed Anal* 69:209-222 (2012).

- Jurado C.; Soriano T.; Giménez M.P.; Menéndez M. Diagnosis of chronic alcohol consumption hair analysis for ethyl glucuronide. *Forensic Sci Int* 145:161-166 (2004).
- Jurado Montoro C. Análisis de drogas de abuse en muestras de pelo. Diagnóstico del consumo crónico. *Trastornos Adictivos* 9(3):172-83 (2007).
- Kaphalia B.; Cai P.; Khan F.; Okorodudu A.; Ansari G. Fatty acid ethyl esters: markers of alcohol abuse and alcoholism. *Alcohol* 34:151-158 (2004).
- Kerekes I.; Yegles M.; Grimm U.; Wennig R. Ethyl glucuronide determination. Head hair versus non-head hair. *Alcohol Alcohol* 44 (1):62-66 (2009).
- Keten A.; Tumer A.R.; Balseven-Odabasi A. Measurement of ethyl glucuronide in vitreous humor with liquid chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 193 (1-3):101-105 (2009).
- Kharbouche H.; Faouzi M.; Sanchez N.; Daeppen J.B.; Augsburger M.; Mangin P.; Staub C.; Sporkert F. Diagnostic performance of ethyl glucuronide in hair for the investigation of alcohol drinking behavior: a comparison with traditional biomarkers. *Int J Legal Med* 126:243-250 (2012).
- Kharbouche H.; Sporkert F.; Troxler S.; Augsburger M.; Mangin P.; Christian C. Development and validation of a gas chromatography-negative chemical ionization tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair and its application to forensic toxicology. *J Chromatogr B* 877:2337-2343 (2009).
- Kharbouche H.; Steiner N.; Morelato M.; Staub C.; Boutrel B.; Mangin P.; Sporkert F.; Augsburger M. Influence of ethanol dose and pigmentation on

the incorporation of ethyl glucuronide into rat hair. *Alcohol* 44 (6):507-514 (2010).

Kintz P.; Villain M.; Vallet E.; Etter M.; Salquebre G.; Cirimele V. Ethyl glucuronide: unusual distribution between head hair and pubic hair. *Forensic Sci Int* 176:87-90 (2008).

Kip M.; Spies C.; Neumann T.; Nachbar Y.; Alling C.; Aradottir S.; Weinmann W.; Wurst F. The usefulness of direct ethanol metabolites in assessing alcohol intake in nonintoxicated male patients in an emergency room setting. *Alcohol Clin Exp Res* 32 (7):1284-1291 (2008).

Klein J.; Karaskov T.; Gideon K. Fatty acid ethyl esters. A novel biologic marker for heavy in utero ethanol exposure. A case report. *Ther Drug Monit* 21 (6):644 (1999).

Klys M.; Scislowski M.; Rojek S.; Kolodziej J. A fatal clomipramine intoxication case of a chronic alcoholic patient: Application of postmortem hair analysis method of clomipramine and ethyl glucuronide using LC-APCI/MS. *Legal Medicine* 7:319-325 (2005).

Klys M.; Wozniak K.; Rojek S.; Rzepecka-Wozniak E.; Kowalski P. Ethanol related death of a child: an unusual case report. *Forensic Sci Int* 179:1-4 (2008).

Kronstrand R.; Brinkhagen L.; Nyström F. Ethyl glucuronide in human hair after daily consumption of 16 or 32 g of ethanol for 3 months. *Forensic Sci Int* 215:51-55 (2012).

- Kugelberg F.; Wayne Jones A. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: a review of the literature. *Forensic Sci Int* 165:10-29 (2007).
- Kulaga V.; Caprara D.; Iqbal U.; Kapur B.; Klein J.; Reynolds J.; Brien J.; Koren G. Fatty acid ethyl esters (FAEE): comparative accumulation in human and guinea pig hair as a biomarker for prenatal alcohol exposure. *Alcohol Alcohol* 41 (5):534-539 (2006).
- Kulaga V.; Pragst F.; Koren G. The fatty acid ethyl esters (FAEE) hair test: emerging technology for the diagnosis of fetal alcohol spectrum disorders (FASD). *Ann Toxicol Anal* 21(2):61-65 (2009B).
- Kulaga V.; Shor S.; Koren G. Correlation between drugs of abuse and alcohol by hair analysis: parents at risk for having children with fetal alcohol spectrum disorder. *Alcohol* 44:615-621 (2010).
- Kulaga V.; Velazquez-Armenta Y.; Aleksa K.; Vergee Z.; Koren G. The effect of hair pigment on the incorporation of fatty acid ethyl esters (FAEE). *Alcohol Alcohol* 44 (3):287-292 (2009A).
- Kulig C.; Beresford T.; Everson G. Rapid, accurate and sensitive fatty acid ethyl ester determination by gas chromatography-mass spectrometry. *J Lab Clin Med* 147 (3):133-138 (2006).
- Kwak H.; Han J.; Ahn H.; Kim M.; Ryu H.; Kim M-Y.; Chung D.; Shin C.; Velazquez-Armenta E.; Nava-Ocampo A. Blood levels of phosphatidylethanol in pregnant women reporting positive alcohol ingestion, measured by an improved LC-MS/MS analytical method. *Clin Toxicol* 50:886-891 (2012).

- Kwak H.; Kang Y.; Han K.; Moon J.; Chung Y.; Choi J.; Han J.; Kim M.; Velázquez-Armenta Y.; Nava-Ocampo A. Quantitation of fatty acid ethyl esters in human meconium by an improved liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 878:1871-1874 (2010).
- Lamoureux F.; Gaulier J.M.; Sauvage F.L.; Mercerolle M.; Vallejo C. Determination of ethyl glucuronide in hair for heavy drinking detection using liquid-chromatography-tandem mass spectrometry following solid phase extraction. *Anal Bioanal Chem* 394:1895-1901 (2009).
- Laposata M.; Hasaba A.; Best C.; Yoerger D.; McQuillan B.; Salem R.; Refaai M.; Soderberg B. Fatty acid ethyl esters. Recent observations. *PLEFA* 67 (2-3):193-196 (2002).
- Lees R.; Kingston R.; Williams T.; Henderson G.; Hughes A.; Hickman M. Comparison of ethyl glucuronide in hair with self-reported alcohol consumption. *Alcohol Alcohol* 47 (3):267-272 (2012).
- Liniger B.; Nguyen A.; Friedrich-Koch A.; Yegles M. Abstinence monitoring of suspected drinking drivers: ethyl glucuronide in hair versus CDT. *Traffic Injury Prevention* 11:123-126 (2010).
- Littner Y.; Bearer C. Detection of alcohol consumption during pregnancy. Current and future biomarkers. *Neurosci and Biobehav Rev* 31:261-269 (2007).
- Maenhout T.; Buyzere M.; Delanghe J. Non-oxidative ethanol metabolites as a measure of alcohol intake. *Clin Chim Acta* 415:322-329 (2013).

- Malkowska A.; Szutowski M.; Dyr W. Deposition of ethyl glucuronide in WHP rat hair after chronic ethanol intake. *Pharmacol Rep* 64: 586-593 (2012).
- Manich A.; Velasco M.; Joya X.; García-Lara N.; Pichini S.; Vall O.; García-Algar O. Validez del cuestionario de consumo materno de alcohol para detectar la exposición prenatal. *An Pediatr* 76 (6):324-328 (2012).
- Moore C. Fatty acid ethyl esters in meconium. Biomarkers for the detection of alcohol exposure in neonates. *Clin Chim Acta* 312:235-237 (2001).
- Moore C.; Jones J.; Lewis D.; Buchi K. Prevalence of fatty acid ethyl esters in meconium specimens. *Clin Chem* 49 (1):133-136 (2003).
- Morini L.; Falcón M.; Pichini S.; García-Algar O.; Danesino P.; Groppi A.; Luna Aurelio. Ethyl-glucuronide and ethyl-sulfate in placental and fetal tissues by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 418:30-36 (2011).
- Morini L.; Marchei E.; Vagnarelli F.; García-Algar O.; Groppi A.; Mastrobattista L.; Pichini S. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium and hair potential biomarkers of intrauterine exposure to ethanol. *Forensic Sci Int* 196:74-77 (2010B).
- Morini L.; Politi L.; Acito S.; Groppi A.; Poletini A. Comparison of ethyl glucuronide in hair with carbohydrate-deficient transferrin in serum as markers of chronic high levels of alcohol consumption. *Forensic Sci Int* 188:140-143 (2009A).
- Morini L.; Politi L.; Groppi A.; Stramesi C.; Poletini A. Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 41:34-42 (2006).

- Morini L.; Politi L.; Poletini A. Ethyl glucuronide in hair. A sensitive and specific marker of chronic heavy drinking. *Addiction* 104:915-920 (2009B).
- Morini L.; Zucchella A.; Poletini A.; Politi L.; Groppi A. Effect of bleaching on ethyl glucuronide in hair. An in vitro experiment. *Forensic Sci Int* 198:23-27 (2010A).
- Musshoft F. Chromatographic methods for the determination of markers of chronic and acute alcohol consumption. *J Chromatogr B* 781:457-480 (2002).
- Nalesso A.; Viel G.; Cecchetto G.; Frison G.; Ferrara S. Analysis of the alcohol biomarker phosphatidylethanol by NACE with on-line ESI-MS. *Electrophoresis* 31:1227-1233 (2010).
- Nalesso A.; Viel G.; Cecchetto G.; Mioni D.; Pessa G.; Favretto D.; Ferrara S. Quantitative profiling of phosphatidylethanol molecular species in human blood by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1218:8423-8431 (2011).
- Niemelä O. Biomarkers in alcoholism. *Clin Chim Acta* 377:39-49 (2007).
- Nissinen A.; Mäkelä S.; Vuoristo J.; Liisanantti M.; Hannuksela M.; Hörkkö S.; Savolainen M. Immunological detection of in vitro formed phosphatidylethanol- An alcohol biomarker- with monoclonal antibodies. *Alcohol Clin Exp Res* 32 (6):921-928 (2008).

Ostrea E.; Hernandez J.; Bielawski D.; Kan J.; Leonardo G.; Abela M.; Church M.; Hannigan J.; Janisse J.; Ager J.; Sokol R. Fatty acid ethyl esters in meconium. Are they biomarkers of fetal alcohol exposure and effect? *Alcohol Clin Exp Res* 30 (7):1152-1159 (2006).

Paul R.; Kingston R.; Tsanaclis L.; Berry A.; Guwy A. Do drug users use less alcohol than non-drug users? A comparison of ethyl glucuronide concentrations in hair between the two groups in medico-legal cases. *Forensic Sci Int* 176:82-86 (2008).

Peterson J.; Kirchner L.; Minnes S.; Singer L.; Bearer C. Fatty acid ethyl esters in meconium are associated with poorer neurodevelopmental outcomes to two years of age. *J Pediatr* 152 (6):788-792 (2008).

Peterson K.; Biomarkers for alcohol use and abuse. *Alcohol Res Health* 28 (1):30-37 (2005).

Pianta A.; Liniger B.; Baumgartner M.R. Ethyl glucuronide in scalp and non-head hair: an intra-individual comparison. *Alcohol Alcohol* 1-8 (2013).

Pichini S.; Marchei E.; Vagnarelli F.; Tarani L.; Raimondi F.; Maffucci R.; Sacher B.; Bisceglia M.; Rapisardi G.; Elicio M.; Biban P.; Zuccaro P.; Pacifici R.; Pierantozzi A.; Morini L. Assessment of prenatal exposure to ethanol by meconium analysis. Results of an Italian multicenter study. *Alcohol Clin Exp Res* 36 (3): 417-424 (2012).

Pichini S.; Morini L.; Marchei E.; Palmi I.; Concetta Rotolo M.; Vagnarelli F.; García-Algar O.; Vall O.; Zuccaro P. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium to assess gestational ethanol exposure. Preliminary results in two Mediterranean cohorts. *Can J Clin Pharmacol* 16 (2):370-375 (2009).

- Pichini S.; Pellegrini M.; Gareri J.; Koren G.; García-Algar O.; Vall O.; Vagnarelli F.; Zuccaro P.; Marchei E. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for fatty acid ethyl esters in meconium. Assessment of prenatal exposure to alcohol in two European cohorts. *J Pharmaceut Biomed Anal* 48:927-933 (2008).
- Politi L.; Leone F.; Morini L.; Poletti A. Bioanalytical procedures for determination of conjugates or fatty acid esters of ethanol as markers of ethanol consumption: a review. *Anal Biochem* 368:1-16 (2007B).
- Politi L.; Mari F.; Furlanetto S.; Del Bravo E.; Bertol E. Determination of fatty acid ethyl esters in hair by GC-MS and application in a population of cocaine users. *J Pharmaceut Biomed Anal* 54:1192-1195 (2011).
- Politi L.; Morini L.; Leone F.; Poletti A. Ethyl glucuronide in hair: is it a reliable marker of chronic high levels of alcohol consumption? *Addiction* 101:1408-1412 (2006).
- Politi L.; Morini L.; Mari F.; Groppi A.; Bertol E. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in autopsy samples 27 years after death. *Int J Legal Med* 122:507-509 (2008).
- Politi L.; Zucchella A.; Morini L.; Stramesi C.; Poletti A. Markers of chronic alcohol use in hair: comparison of ethyl glucuronide and cocaethylene in cocaine users. *Forensic Sci Int* 172:23-27 (2007A).
- Pragst F. Interpretation problems in a forensic case of abstinence determination using alcohol markers in hair. *Forensic Sci Int* 217:4-7 (2012).

Pragst F.; Auwärter V.; Sporkert F.; Spiegel K. Analysis of fatty acid ethyl esters in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Forensic Sci Int* 121:76-88 (2001).

Pragst F.; Balikova M.A. State of the art in hair analysis for detection of drugs and alcohol abuse. *Clin Chim Acta* 370:17-49 (2006).

Pragst F.; Rothe M.; Moench B.; Hastedt M.; Herre S.; Simmert D. Combined use of fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide in hair for diagnosis of alcohol abuse: Interpretation and advantages. *Forensic Sci Int* 196:101-110 (2010).

Pragst F.; Spiegel K.; Sporkert F.; Bohnenkamp. Are there possibilities for the detection of chronically elevated alcohol consumption by hair analysis? A report about the state of investigation. *Forensic Sci Int* 107:201-223 (2000).

Rainio J.; Giorgio F.; Bortolotti F.; Tagliaro F. Objective post-mortem diagnosis of chronic alcohol abuse. A review of studies on new markers. *Legal Medicine* 10 (5):229-235 (2008).

Roehsig M.; Louzada de Paula D.; Moura S.; Albuquerque D.; Yonamine M. Determination of eight fatty acid ethyl esters in meconium samples by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Sep Sci* 33:2115-2122 (2010).

Salem R.; Cluette-Brown J.E.; Laposata M. Fatty acid ethyl esters, non oxidative ethanol metabolites, synthesis, uptake and hydrolysis by human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1738 (1-3):99-140 (2005).

- Salem R.; Laposata M.; Rajendram R.; Cluette-Brown J.; Preedy V. The total body mass of fatty acid ethyl esters in skeletal muscles following ethanol exposure greatly exceeds that found in the liver and the heart. *Alcohol* 41 (6):598-603 (2006).
- Schräder J.; Rothe M.; Pragst F. Ethyl glucuronide concentrations in beard hair after a single alcohol dose: evidence for incorporation in hair root. *Int J Legal Med* 126:791-799 (2012).
- Seidl S.; Wurst F.; Alt A. Ethyl glucuronide, a biological marker for recent alcohol consumption. *Addict Biol* 6:205-212 (2001).
- Shor S.; Nulman I.; Kulaga V.; Koren G. Heavy in utero ethanol exposure is associated with the use of other drugs of abuse in a high-risk population. *Alcohol* 44:623-627 (2010).
- Skipper G.; Weinmann W.; Thierauf A.; Schaefer P.; Wiesbeck G.; Allen J.; Miller M.; Wurst F. Ethyl glucuronide: a biomarker to identify alcohol use by health professional recovering from substance use disorders. *Alcohol* 39 (5):445-449 (2004).
- Skopp G.; Schmitt G.; Pötsch L.; Drönner P.; Aderjan R.; Mattern R. Ethyl glucuronide in human hair. *Alcohol* 35 (3):283-285 (2000).
- Sporkert F.; Kharbouche H.; Augsburger M.; Klemm C.; Baumgartner M. Positive EtG findings in hair as a result of a cosmetic treatment. *Forensic Sci Int* 218:97-100 (2012).

- Stewart S.; Koch D.; Willner I.; Randall P.; Reuben A. Hair ethyl glucuronide is highly sensitive and specific for detecting moderate-to-heavy drinking in patients with liver disease. *Alcohol Alcohol* 48 (1): 83–87 (2013).
- Stewart S.; Law T.; Randall P.; Newman R. Phosphatidylethanol and alcohol consumption in reproductive age women. *Alcohol Clin Exp Res* 34 (3):488-492 (2010).
- Suesse S.; Pragst F.; Mieczkowski T.; Selavka C.M.; Elian A.; Sachs H.; Hastedt M.; Rothe M.; Campbell J. Practical experiences in application of hair fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide for detection of chronic alcohol abuse in forensic cases. *Forensic Sci Int* 218 (1-3):82-91 (2012).
- Sübe S.; Selavka C.; Mieczkowski T.; Pragst F. Fatty acid ethyl ester concentrations in hair and self-reported alcohol consumption in 644 cases from different origin. *Forensic Sci Int* 196:111–117 (2010).
- Tarcomnicu I.; Van Nuijs A.; Aerts K.; De Doncher M.; Covaci A.; Neels H. Ethyl glucuronide determination in meconium and hair by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 196:121-127 (2010).
- Tavakoli H.; Hull M.; Okasinski M. Review of current clinical biomarkers for the detection of alcohol dependence. *Innovations in Clinical Neuroscience* 8 (3):26-33 (2011).
- Tolonen A.; Lehto T.; Hannuksela M.; Savolainen M. A method for determination of phosphatidylethanol from high density lipoproteins by reversed-phase HPLC with TOF-MS detection. *Anal Biochem* 341:83-88 (2005).

- Varga A.; Alling C. Formation of phosphatidylethanol in vitro in red blood cells from healthy volunteers and chronic alcoholics. *J Lab Clin Med* 140 (2):79-83 (2002).
- Varga A.; Nilsson S. Nonaqueous capillary electrophoresis for analysis of the ethanol consumption biomarker phosphatidylethanol. *Electrophoresis* 29:1667-1671 (2008).
- Weinmann W.; Schaefer P.; Thierauf A. Confirmatory analysis of ethyl glucuronide in urine by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry according to forensic guidelines. *J Am Soc Mass Spectrom* 15:188-193 (2004).
- Winkler M.; Skopp G.; Alt A.; Miltner E.; Jochum Th.; Daenhardt C.; Sporkert F.; Gnann H.; Weinmann W.; Thierauf A. Comparison of direct and indirect alcohol markers with PEth in blood and urine in alcohol dependent inpatients during detoxication. *Int J Legal Med* 127 (4):761-768 (2013).
- Wojcik M.; Hawthorne J. Sensitivity of commercial ethyl glucuronide (EtG) testing in screening for alcohol abstinence. *Alcohol Alcohol* 42 (4):317-320 (2007).
- Wurst F.; Alexson S.; Wolfersdorf M.; Bechtel G.; Forster S.; Alling C.; Aradóttir S.; Jachau K.; Pragst F. Concentration of fatty acid ethyl esters in hair of alcoholics: comparison to other biological state markers and self reported ethanol intake. *Alcohol Alcohol* 39 (1):33-38 (2004A).
- Wurst F.; Kempter C.; Metzger J.; Seidl S.; Alt A. Ethyl glucuronide: a marker of recent alcohol consumption with clinical and forensic implications. *Alcohol* 20:111-116 (2000).

Wurst F.; Kempter C.; Seidl S.; Alt A. Ethyl glucuronide, a marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications. *Alcohol Alcohol* 34 (1):71-77 (1999).

Wurst F.; Metzger J. The ethanol conjugate ethyl glucuronide is a useful marker of recent alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 26 (7):1114-1119 (2002).

Wurst F.; Thon N.; Aradottir S.; Hartmann S.; Wiesbeck G.; Lesch O.; Skala K.; Wolfersdorf M.; Weinmann W.; Alling C. Phosphatidylethanol: normalization during detoxification, gender aspects and correlation with other biomarkers and self-reports. *Addict Biol* 15:88-95 (2010).

Wurst F.; Wiesbeck G.; Metzger J.; Weinmann W.; Graf M. On Sensitivity, specificity, and the influence of various parameters on ethyl glucuronide levels in urine results from the WHO/ISBRA study. *Alcohol Clin Exp Res* 28 (8):1220-1228 (2004B).

Yegles M.; Labarthe A.; Auwärter V.; Hartwig S.; Vater H.; Wennig R.; Pragst F. Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters concentration in hair of alcoholics, social drinkers and teetotallers. *Forensic Sci Int* 145 (2-3):167-173 (2004).

Zelner I.; Hutson J.; Kapur B.; Feig D.; Koren G. False-positive meconium test results for fatty acid ethyl esters secondary to delayed sample collection. *Alcohol Clin Exp Res* 36 (9):1497-1505 (2012B).

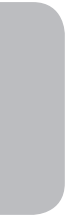
Zelner I.; Kenna K.; Brien J.; Bocking A.; Harding R.; Walker D.; Koren G. Meconium fatty acid ethyl esters as biomarkers of late gestational ethanol exposure and indicator of ethanol-induced multi-organ injury in fetal sheep. *PLOS ONE* 8 (3):1-10 (2013).

Zelner I.; Shor S.; Gareri J.; Lynn H.; Roukema H.; Lum L.; Eisinga K.; Nulman I.; Koren G. Universal screening for prenatal alcohol exposure. A progress report of a pilot study in the region of Grey Bruce, Ontario. *Ther Drug Monit* 32 (3):305-310 (2010).

Zelner I.; Shor S.; Lynn H.; Roukema H.; Lum L.; Eisinga K.; Koren G. Clinical use of meconium fatty acid ethyl esters for identifying children at risk for identifying children at risk for alcohol-Related disabilities: the first reported case. *J Popul Ther Clin Pharmacol* 19(1):26-31 (2012A).

Zelner I.; Shor S.; Lynn H.; Roukema H.; Lum L.; Eisinga K.; Koren G. Neonatal screening for prenatal alcohol exposure: Assessment of voluntary maternal participation in an open meconium screening program. *Alcohol* 46:269-276 (2012C).

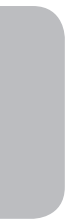
Zheng Y.; Beck O.; Helander A. Method development for routine liquid chromatography-mass spectrometry measurement of the alcohol biomarker phosphatidylethanol in blood. *Clin Chim Acta* 412:1428-1435 (2011).



SECCIÓN II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

SECTION II. Explanations and objectives





El consumo de alcohol etílico es un hábito muy arraigado en nuestra sociedad, con grandes implicaciones culturales, pero también económicas, administrativas y especialmente clínicas.

Tradicionalmente, los métodos que se usaban para el diagnóstico del consumo de alcohol estaban basados en el análisis de la propia molécula del etanol y más tarde en los marcadores indirectos de su metabolismo (MCV, CDT, γ -GT, etc). Debido al pequeño espacio temporal en el que se pueden detectar y a la posibilidad de ofrecer unos resultados positivos originados por otras razones patológicas, nos encontramos con la necesidad de recurrir a marcadores biológicos distintos. Así fue como se empezó a desarrollar el estudio de los marcadores directos del consumo del etanol, analizados en esta Tesis Doctoral, junto con su extracción de las llamadas muestras alternativas, pelo y meconio, que nos permiten diferenciar entre consumos moderados y consumos abusivos. Así pues, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido la puesta a punto de una metodología analítica que permita determinar marcadores del consumo de alcohol en diferentes matrices biológicas, con su posterior validación y aplicación a casos reales. Finalmente, se han elaborado una serie de conclusiones para ayudara nuestro conocimiento y detección de este problema.

Se describe a continuación los objetivos que se pretenden alcanzar en cada capítulo.

Sección I

- *Capítulo I:* Visión general del consumo de alcohol etílico en el mundo y descripción de sus propiedades químicas así como de su farmacocinética.
- *Capítulo II:* Revisión de los posibles tipos de marcadores del consumo de alcohol, haciendo especial hincapié en los estudiados en esta Tesis Doctoral: EtG, FAEs y PEth.
- *Capítulo III:* Estudio de las muestras biológicas donde pueden estar retenidos los analitos de interés. Se hablará solamente de las matrices empleadas en esta Tesis Doctoral.
- *Capítulo IV:* Desarrollo de los métodos de extracción empleados. Fundamento y características.
- *Capítulo V:* Desarrollo de los métodos de detección empleados. Fundamento y características.
- *Capítulo VI:* Amplia revisión bibliográfica de los compuestos de interés.

Sección II

Redacción de los principales objetivos de esta Tesis Doctoral.

Sección III

Lectura de los artículos publicados en esta Tesis Doctoral.

Sección IV

Tratamiento estadístico de los datos mediante el programa estadístico IBM SPSS® Statistics 21. Permite una correcta interpretación de los mismos.

Sección V

Desarrollo de una amplia discusión de los trabajos realizados.

Sección VI

Elaboración de las principales y más relevantes conclusiones obtenidas de esta Tesis Doctoral.



SECCIÓN III. PUBLICACIONES

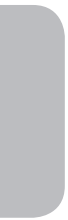
SECTION III. Scientific papers





En esta sección se presentan los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, que incluyen 4 artículos publicados en revistas científicas internacionales de reconocido prestigio. Dichos resultados van acompañados de la descripción de la metodología científica utilizada, de su aplicación a casos reales y de las conclusiones obtenidas en cada caso.

En cada publicación se evalúa el análisis de uno de los marcadores objeto de estudio en las diferentes matrices biológicas empleadas para ello.



Analysis of fatty acid ethyl esters in hair by headspace solid-phase microextraction (HS- SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

Cabarcos P.; Álvarez I.; Bermejo A.M.; Taberner M.J.; López P.;
Fernández P.

Los problemas que conlleva el consumo de alcohol, especialmente en el ámbito clínico, han puesto de relieve la necesidad de poner a punto métodos que permitiesen el análisis de esta sustancia y sus metabolitos, ofreciendo la mayor información posible.

Se ha determinado un metabolito de la molécula del etanol, los ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs), empleando el pelo como matriz biológica. De esta manera se puede determinar si ha habido un consumo de alcohol a lo largo del tiempo.

Después de realizar una correcta recogida del pelo con su posterior pre-tratamiento (lavado, secado, corte y pesada), se procede a la realización de la técnica de extracción. Se deben usar disolventes lipofílicos y medio neutro debido a la facilidad que presentan los FAEEs para hidrolizarse bajo condiciones alcalinas. En este caso, los compuestos estudiados han sido extraídos mediante una extracción líquido-líquido seguida de una HS-SPME empleando una fibra de 65 μm de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB). Se ha utilizado esta fibra por su capacidad para extraer compuestos lipofílicos semivolátiles.

En cuanto a la separación cromatográfica, ésta se ha llevado a cabo mediante la técnica cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS), idónea debido a la baja polaridad que presentan los compuestos.

Una vez definidos los iones cualificadores y cuantificadores de cada compuesto, establecidas las ventanas en SIM y optimizado el método de extracción y de detección, se realiza la validación analítica siguiendo las recomendaciones de la FDA.

Finalmente, el método se ha aplicado a un total de 22 voluntarios mostrándose resultados muy dispares entre los diferentes FAEEs estudiados. El

etil palmitato y el etil miristato han mostrado las concentraciones más altas en el caso de un consumo abusivo de alcohol. Aparecen pequeñas cantidades de FAEEs en abstemios debido a diversos motivos, como pueden ser la utilización de productos capilares que contengan alcohol, la contaminación ambiental, la formación endógena, etc.



CHROMATOGRAPHY

Analysis of Fatty Acid Ethyl Esters in Hair by Headspace Solid-Phase Microextraction (HS-SPME) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Pamela Cabarcos, Iván Álvarez, Ana María Bermejo,
María Jesús Taberero, Patricia López, and Purificación Fernández

Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Faculty
of Medicine, University of Santiago de Compostela, Santiago de
Compostela, Spain

Abstract: Fatty acid ethyl esters (FAEE) can be used as alcohol markers in hair. The purpose of this study was to validate a new method for the detection of FAEE in hair, reducing the extraction time. Hair samples were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry after headspace solid-phase microextraction with deuterated internal standards. Linear curves for ethyl myristate, palmitate and stearate were obtained in the range considered. The limits of detection were 0.8, 0.005, and 0.01 and the lower limits of quantification were 1.8, 0.01, and 0.4 for ethyl myristate, palmitate and stearate, respectively. Intra- and inter-assay precision and accuracy were less than 12.5% and 16.1%, respectively. Recoveries were higher than 13.5% in all cases. Finally, the method was applied to analyze hair of alcoholics, social drinkers, and teetotallers.

Keywords: Alcohol markers, fatty acid ethyl esters, gas chromatography-mass spectrometry, hair analysis, headspace solid-phase microextraction

Received 1 December 2008; accepted 3 August 2009.

Address correspondence to Ana María Bermejo, Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, San Francisco s/n, 15782, Santiago de Compostela, Spain. E-mail: anamaria.bermejo@usc.es

1. INTRODUCTION

Alcohol, one of the most frequently reported addictions, is a significant public health problem in Spain and is, therefore, of particular interest in forensic and clinical medicine. Hair analysis has proved to be suitable for the detection of excessive alcohol consumption. There are several alcohol markers like ethyl glucuronide or cocaethylene that can be detected in hair (Álvarez 2009; Bermejo 2006). In this paper Fatty acid ethyl esters (FAEE) are used to demonstrate a chronic use of alcohol.

Fatty acids ethyl esters (FAEE), neutral hydrophobic non-oxidative metabolites of alcohol, are direct biomarkers of ethanol exposure and are also direct alcohol markers containing the unchanged ethyl group of ethanol (Yegles 2004; Hartwig, Auwärter, and Pragst 2003).

The FAEE are not stable in blood samples due to continued enzyme activity, but are incorporated into hair and can be analyzed in this medium even after several months of ethanol ingestion (Best et al. 2006). In blood they can be used as markers of a recent alcohol intake at least 24 h after completion of ethanol consumption (Pragst et al. 2001).

The enzymatic formation of FAEE after alcohol ingestion was first discovered by Lange, Bergmann, and Sobel in 1981 and later thoroughly investigated mainly by Laposata and coworkers (Pragst et al. 2001; Lange, Bergman, and Sobel 1981; Laposata and Lange 1986; Laposata, Scherrer, and Lange 1989).

Because of their lipophilic character, the FAEE can be excreted by the sebaceous glands and be distributed from there onto the hair surface (Yegles et al. 2004; Auwärter et al. 2001).

A considerable change of the drug concentrations in hair after cosmetic treatment was found by several authors. In principle, the FAEE concentration could be affected by hair treatment in different ways: it can decrease by frequent shampooing or, on the other hand, it can increase by deposition from hair care products containing FAEE (Laposata, Scherrer, and Lange 1989).

The origin of the low FAEE concentrations in teetotallers is not yet clear. Possible explanation includes endogenous ethanol or formation from ethanol-containing hair care products (Kulaga et al. 2006).

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents and Standards

Ethyl myristate, ethyl palmitate, and ethyl stearate, as well as the corresponding free carboxylic acids were purchased from Sigma-Aldrich

(Madrid, Spain). Ethanol d-6 and thionyl chloride were also obtained from Sigma-Aldrich. All other reagents were obtained in analytical grade purity from Merck (Barcelona, Spain).

The deuterated standards d₅-ethyl myristate, d₅-ethyl palmitate and d₅-ethyl stearate were prepared in our laboratory due to the fact that they do not exist commercially, according to literature data. In a 5 mL test tube, 50 μL d₆-ethanol were added to 10 mg of the free acid. The mixture was cooled to -78°C using an Immersion Cooler ThermoHaake EK90. Then, 10 μL thionyl chloride were added and the closed vessel was allowed to warm up and held at 40°C for 2 h. After that, excessive SOCl₂ and d₆-ethanol were removed by a nitrogen stream at room temperature. The oily residues were dissolved in chloroform to obtain a concentration of 5 mg/mL. These stock solutions were stored at 0–4°C. For analysis, a mixture of the three deuterated esters was prepared by dilution with chloroform. The identification of the three d₅-ethyl esters was proven by the mass spectra. By control with GC-MS in the scan mode it was shown that no residual free fatty acids or measurable amounts of other impurities were present.

2.2. Chromatographic Conditions

Chromatographic analyses for FAEE were performed using an electron impact ionization gas chromatograph model 6890 from Hewlett-Packard[®] (Little Fally, DF, USA) interfaced to a mass selective detector (MSD) model 5973 inert from Agilent Technologies (Las Rozas, Spain). An HP5-MS capillary column (30 m × 250 μm × 0.5 μm, Hewlett-Packard) with helium as carrier gas (1.0 mL/min) was used for the gas chromatographic separation. Samples were injected in the splitless mode, and a purge time of 2 min was used. The following temperature program was applied: 1 min at 90°C, then 30°C/min up to 220°C holding 13 min.

All compounds were injected in SCAN mode for their identification (mass-spectra) and then, the analysis was performed in SIM mode to increase the sensibility of the method.

To isolate main ethyl esters from hair samples, a liquid-liquid extraction followed by HS-SPME had been realized, as was suggested by Pragst et al. (2001)

2.3. Hair Samples

Hair samples had been obtained from teetotallers, social drinkers, and alcoholics. The hair samples of teetotallers were obtained from children and adults who definitely did not drink any alcoholic beverage.

Samples were cut from the posterior vertex region of the head, as close as possible to the scalp. The length and color of hair were taken into account, and the proximal section was identified. When hair length was higher than 5 cm, segmental analysis was performed as well.

In order to remove external contamination and sebum that could interfere in the analysis, all hair samples were thoroughly washed before analysis with a liquid soap of neutral pH and deionized water several times and dried at 40°C in heater. The C_{FAEE} was not markedly decreased by washing with water or by shampooing (Laposata, Scherrer, and Lange 1989).

After optimization, the following procedure was used. Hair samples were washed, dried, cut into pieces of about 5 mm length and, finally, were weighed at 50 mg. Depending on the hair length and the reported drinking history, the hair samples were cut into several segments. Then, 250 μ L dimethylsulfoxide, 3 mL hexane and the addition of penta-deuterated internal standards corresponding to the three metabolites ethyl myristate, ethyl palmitate, and ethyl stearate (80 μ L of a mixture 5 ng/ μ L each) were added. The mixture was shaken during 5 min at room temperature. This shaking time is lower than that reported by authors (Pragst et al. 2001; Auwärter et al. 2001; Hartwig, Auwärter, Pragst 2003; Yegles et al. 2004; De Giovanni, Donadio, and Chiarotti 2007). After centrifugation, the hexane layer was separated and transferred into a 5 mL headspace vial. The solvent was completely evaporated at 40°C by a nitrogen stream and 200 mg of sodium chloride (salting-out effect) together with 1 mL phosphate buffer 0.1 M (pH 7) were added. The residue was analyzed by HS-SPME and GC-MS in the selected ion monitoring (SIM) mode.

2.4. HS-SPME

In HS-SPME, the analyzed compounds are adsorbed at moderate temperature on a coated silica fiber, which is placed in the vapor phase above the sample (Auwärter et al. 2001). After that, the fiber is transferred into the injection port of the gas chromatograph and the compounds are desorbed at a higher temperature for GC-MS analysis. The low polar nature of FAEE makes them well suited for GC separation. It is not surprising, therefore, that all of the methods published are based on this instrumental technique.

For these investigations, a 65 μ m polydimethylsiloxane/divinylbenzene fiber (PDMS/DVB; Supelco, Bellefonte, PA, USA) was chosen since this coating is particularly suitable for lipophilic semivolatile compounds (Pragst et al. 2001). The liquid extraction of the hair samples was carried out using a mixer with a rack for 16 samples (Selecta[®]; Barcelona, Spain)

and the solvents were removed under a nitrogen stream. For HS-SPME the following conditions were used: 5 min equilibrium time at 90°C, headspace adsorption 30 min at 90°C. The desorption phase was performed at 240°C for 5 min.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Optimization of the Analytical Method

Fatty acid ethyl esters are unpolar substances, which are easily hydrolyzed in a basic or alkaline medium. Therefore, they must be extracted with lipophilic solvents under mild conditions from the hair matrix. The method consisted of 2 steps: (1) the liquid extraction of the hair samples and (2) the selective separation of the esters from this extract on the basis of their relatively high volatility by HS-SPME and the measurement by GC-MS. At first the HS-SPME conditions and the GC-MS analysis were optimized in absence of hair. After that, the liquid extraction of the hair sample was studied and the calibration and validation of the method were carried out with spiked hair samples.

3.2. Internal Standards and Mass Spectra

The most reliable results are generally obtained with deuterated standards. Therefore, the ethyl myristate- d_5 , ethyl palmitate- d_5 , and ethyl stearate- d_5 were prepared from the corresponding carboxylic acids and d_6 -ethanol as was explained before.

The mass spectra are shown in Fig. 1 (a–f) in comparison to the corresponding non-deuterated esters. It can be seen that the d_5 -ethyl esters have suitable mass spectroscopic properties for the use as internal standards in this investigations. Chromatographic characteristics (retention times and m/z values) of the all compounds are reported in Table 1.

In the analysis of real samples, the retention time and the characteristic peak area were used for identification of the esters. For quantification, only the 213 (218), 284 (289), and 269 (274) ions were used, which always displayed a sufficient intensity and were only to a minor extent disturbed by other matrix constituents.

An example of the good separations chromatographics is shown in Fig. 2. It is a SIM chromatogram of a hair sample with high concentration (15 ng/mg). As generally is found for deuterated standards, the retention times are slightly smaller for the d_5 -FAEE than for the non-deuterated analytes.

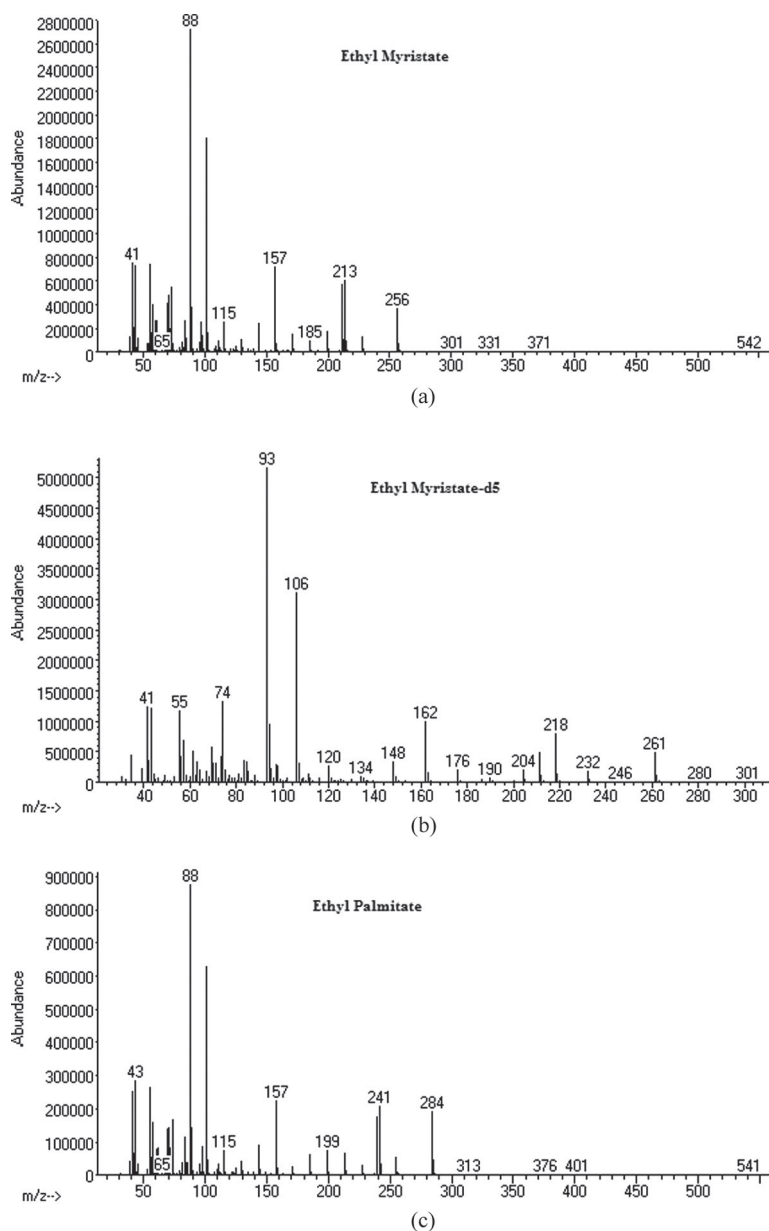
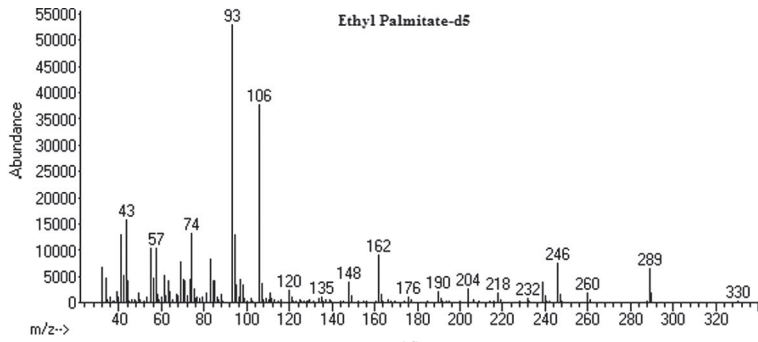
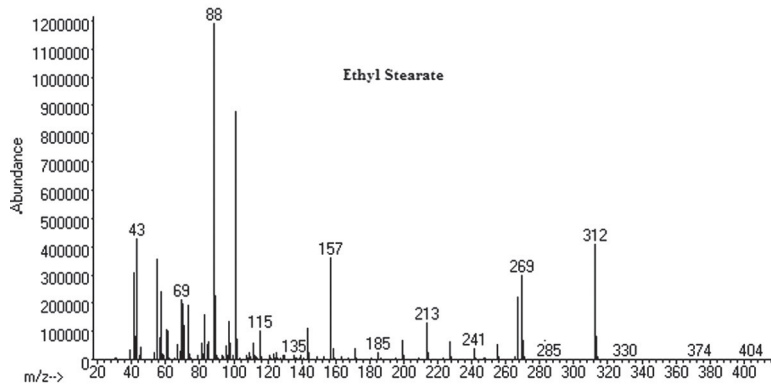


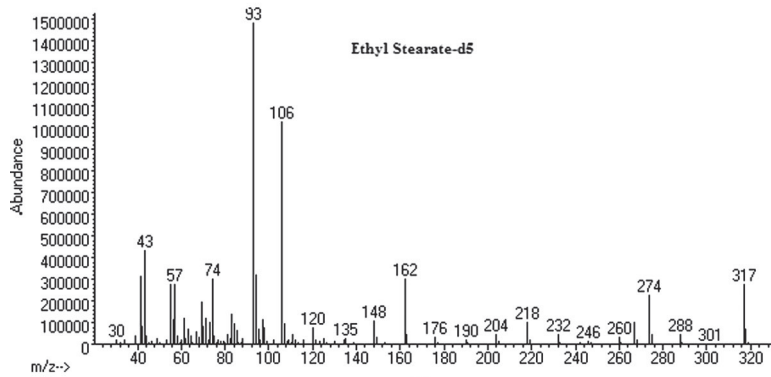
Figure 1. (a) Ethyl Myristate mass spectra, (b) Ethyl Myristate d-5 mass spectra, (c) Ethyl Palmitate mass spectra, (d) Ethyl Palmitate d-5 mass spectra, (e) Ethyl Stearate mass spectra, (f) Ethyl Stearate d-5 mass spectra.



(d)



(e)



(f)

Figure 1. Continued.

Table 1. Chromatographic characteristic of the compounds

Compound	Retention time (min)	Values of m/z in SIM mode				
		Quantification ions	Cualification ions			
Ethyl myristate	8.44	213	88	101	157	256
Ethyl myristate-d ₅	8.40	218	93	106	162	261
Ethyl palmitate	11.31	284	88	101	157	241
Ethyl palmitate-d ₅	11.24	289	93	106	162	246
Ethyl stearate	16.56	269	88	101	157	312
Ethyl stearate-d ₅	16.45	274	93	106	162	317

3.3. Calibration, Limits of Detection (LOD), Limits of Quantification (LOQ), Reproducibility and Recoveries

The analytical validation of the method was performed by establishing selectivity, linearity, limits of detection, and quantification, intra- and inter-day precision, and accuracy study and recoveries (Álvarez et al. 2008).

The selectivity of the method was studied using a hair sample from a teetotaller. Figure 3 shows a chromatogram of this sample after the extraction procedure; here, it can be seen that there was no interference.

Calibration curves for ethyl myristate, ethyl palmitate, and ethyl stearate were prepared six times by adding known amounts of each internal standard (80 µL Sol. 5 ng/µL) to 50 mg of hair to obtain

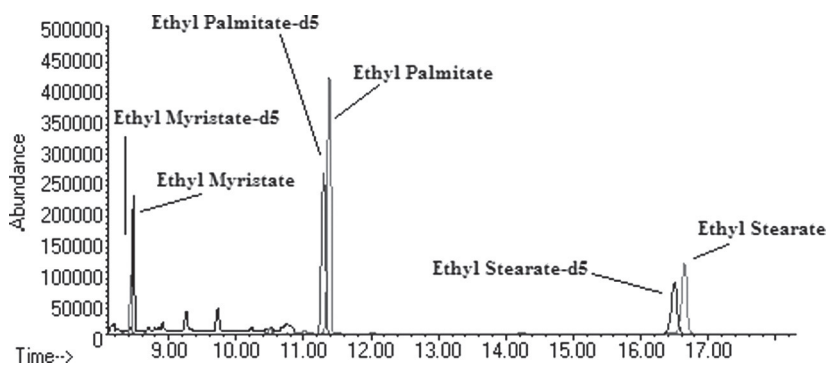


Figure 2. GC-MS-SIM chromatogram of the hair extract with 15 ng/mg of FAEE.

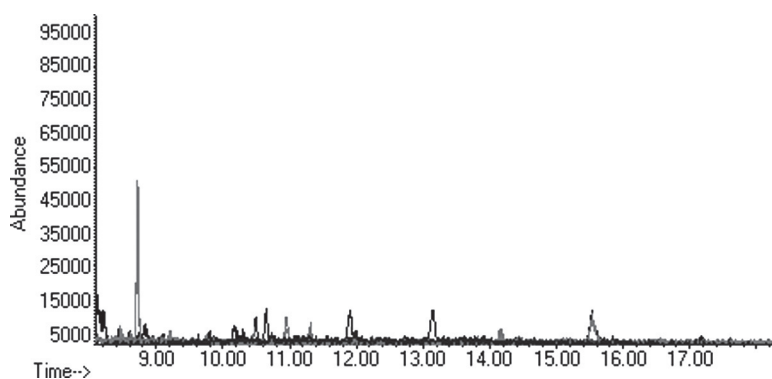


Figure 3. Chromatogram of a blank hair.

concentrations ranging between 0.01 to 15 ng/mg (1.8, 3, 5, 10, 15 for ethyl myristate; 0.01, 0.05, 1, 5, 10, 15 for ethyl palmitate and 0.4, 1, 4, 8, 10, 15 for ethyl stearate). The characteristic data and the correlation coefficients are listed in Table 2.

According to FDA or ICH (ICH 1994; 1996; USDH-FDA 2001) the LOD and the LOQ were estimated as the 3 and 10 fold standard deviation of the base line noise, respectively. The data are also given in Table 2.

The LOD values were 0.8 ng/mg for ethyl myristate, 0.005 for ethyl palmitate, and 0.01 for ethyl stearate. The corresponding LOQ values were 1.8, 0.01, and 0.4 ng/mg, respectively. Both values, LOD and LOQ, for ethyl palmitate were considerably improved in comparison with other authors (Yegles et al. 2004, Pragst et al. 2001, Hartwig, Auwärter, and Pragst 2003; De Giovanni, Donadio, and Chiarotti 2007). The values for r^2 were higher than 0.99.

The reproducibility of the method was examined by measuring 3 levels of concentration (high, intermediate, and low) from hair samples of teetotallers 5 times within 3 days (intra-day study) and 6 times within 6 days (inter-day study). The results obtained are showed in Table 3.

Table 2. Validation dates

Analite	Curve calibration	r^2	S.D.	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)
Ethyl myristate	$y = 0.112 + 0.145x$	0.990	0.116	0.8	1.8
Ethyl palmitate	$y = 0.016 + 0.099x$	0.992	0.075	0.005	0.01
Ethyl stearate	$y = 0.016 + 0.085x$	0.995	0.055	0.01	0.4

Table 3. Intra and inter-day study

Concentration added (ng/mg)	Intra-day study (n = 5)		Inter-day study (n = 5)	
	Relative mean error (%)	C.V. (%)	Relative mean error (%)	C.V. (%)
Ethyl myristate				
1.80	6.33	10.3	4.96	13.7
8.00	0.13	8.19	0.29	4.54
15.00	9.90	6.47	0.04	1.88
Ethyl palmitate				
0.01	1.19	12.5	4.43	9.97
5.00	0.31	0.99	1.39	7.42
15.00	5.95	1.50	2.26	3.84
Ethyl stearate				
0.40	4.07	6.53	3.54	16.1
8.00	2.45	2.70	0.01	2.61
15.00	3.32	2.53	0.66	1.16

The linear curves and acceptable reproducibilities for ethyl myristate, palmitate, and stearate were observed.

According to international validation rules, relative mean error and C.V. are less than 15% except for LLOQ that admitted 20% of error.

The recoveries of the method were examined by measuring 2 levels of concentration (high and low) belong to teetotaller hair 5 times within 2 days. The results are showed in Table 4. Satisfactory results were obtained for ethyl palmitate and stearate; whereas, the lowest values

Table 4. Recoveries results

Concentration added (ng/mg)	Extraction recoveries (%)	CV (%)
Ethyl myristate		
5	24,56	27,33
10	13,45	35,86
Ethyl palmitate		
1	73,25	22,22
10	77,54	9,01
Ethyl stearate		
4	86,14	6,16
10	103,20	11,71

Table 5. Real cases

Case no	Age (sex)/length (cm)	Hair treatment	Groups	Etyl myristate	Etyl palmitate	Etyl stearate	Σ-FAEE concentration (ng/mg)
1	24 (m)/6	-	SD	0.00	0.520	0.00	0.520
2	26 (f)/12	dyeing	SD	0.00	0.550	0.08	0.630
3	52 (f)/6	dyeing	SD	0.00	0.260	0.00	0.260
4	27 (f)/7	Bleaching	SD	0.00	1.400	0.08	1.480
5	26 (f)/5	dyeing	SD	0.00	0.220	0.06	0.280
6	25 (m)/2	capillary treatment	SD	3.75	13.60	2.56	19.910
7	30 (m)/2	-	SD	1.77	1.060	0.02	2.850
8	32 (m)/2	-	SD	0.00	0.160	0.00	0.160
9	55 (f)/5	dyeing	SD	0.00	0.770	0.03	0.80
10	50 (f)/18	-	-	0.00	0.080	0.00	0.080
11	40 (m)/12	-	SD	0.00	0.770	0.03	0.80
12	26 (m)/10	-	SD	0.00	0.170	0.00	0.170
13	37 (m)/6	-	SD	0.00	0.130	0.00	0.130
14	24 (f)/12	bleaching	SD	0.00	0.480	0.01	0.490
15	34 (m)/3	-	A	0.00	5.05	0.03	5.080
16	33 (m)/6	-	A	9.76	3.410	0.24	13.410
17	38 (m)/5	-	A	6.91	0.980	0.07	7.960
18	40 (f)/14	-	A	10.76	4.990	0.72	16.470
19	40 (f)/14	-	A	6.89×10^{-3}	4.700	1.10	5.800
20	50 (m)/4	bleaching	T	0.00	0.000	0.02	0.020
21	9 (m)/2	-	T	0.00	0.000	0.00	0.000
22	52 (m)/4	-	T	0.00	0.098	0.00	0.098

m: male; f: female; SD: social drinkers (≤ 20 g ethanol/day); T: teetotallers; A: alcoholics.

for ethyl myristate may be attributed to compounds polarity or higher endogenous formation of ethyl palmitate and stearate causing higher results.

3.4. Application to Hair Samples of Alcoholics, Social Drinkers and Teetotallers

The method was applied to the hair samples of 22 volunteers. We did not have first-hand knowledge of all the self reports.

The hair concentrations of the three FAEE measured for all samples are given in Table 5. The sum of the concentration of all esters is also referred.

In Figures 4–6, chromatograms relative to a teetotaller, a social drinker, and an alcoholic are presented.

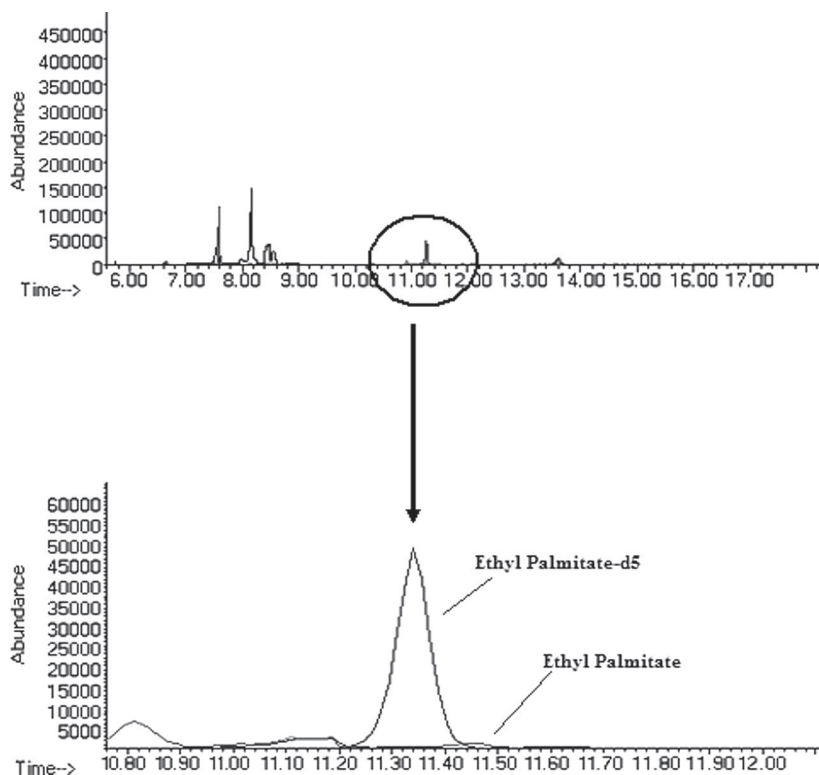


Figure 4. Chromatogram for a sample of teetotaller.

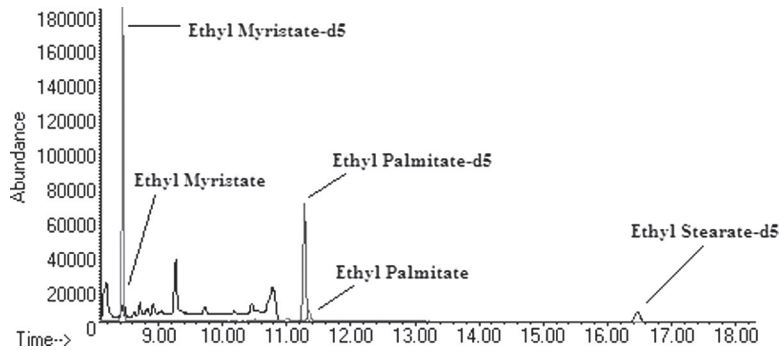


Figure 5. Chromatogram for a sample of social drinker.

The esters were not detected in all cases and, as can be observed, real samples exhibit higher concentrations of ethyl palmitate with respect to other FAEE. Hair samples from some alcoholics, however, present higher concentrations of ethyl myristate.

The concentrations differ strongly from case to case between 0 and 10.76 ng/mg for ethyl myristate, 0 and 13.6 ng/mg for ethyl palmitate and 0 and 2.56 ng/mg for ethyl stearate.

Positive results had been found for teetotallers that resulted in false positives. The presence of FAEE in hair care products, environmental contamination, mainly because of the frequent use of ethanol containing cosmetics, individual factors (hair color, age, sex, etc.) and endogenous formation in the organism, could be the reason for the small positive results found in the case of teetotallers. Therefore, it was observed that FAEE concentrations could be modified by frequent washes, which

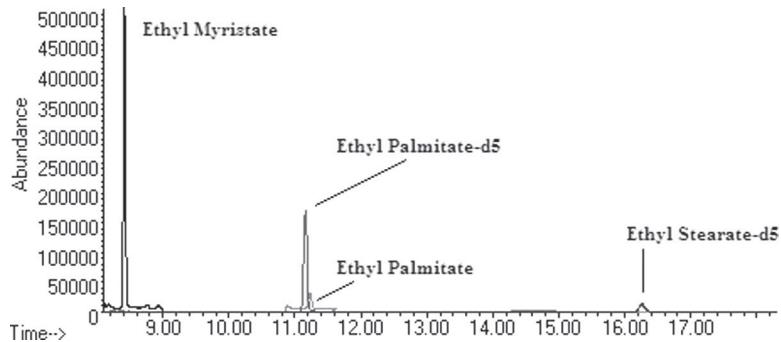


Figure 6. Chromatogram for a sample of alcoholic.

allowed a decrease of these compounds (Laposata, Scherrer, and Lange 1989; Wurst et al. 2004).

For social drinkers, only ethyl palmitate was detected in all cases with a concentration range between 0.13–0.77 ng/mg. In three cases from social drinkers the Σ FAEE was up to 0.8 ng/mg. This fact could be probably due to influence of capillary treatment (dyeing, bleaching, treatment for hair-loss, etc.). These results confirm that it is very important to consider the cosmetic history of a hair sample in the interpretation of hair analysis results.

In most of cases, the hair samples from alcoholics analyzed showed higher concentrations of ethyl myristate than ethyl stearate or palmitate. Strong concentrations have been detected for cases number 16, 17, and 18. These samples were diluted because the results were outside the range.

Some authors have established that a total ethyl myristate, palmitate, and stearate concentration (C_{FAEE}) above 1 ng/mg is a strong indicator of chronic excessive alcohol consumption; the C_{FAEE} for teetotallers is ≤ 0.4 ng/mg, and for social drinkers (≤ 20 g ethanol/day). The C_{FAEE} is generally < 0.8 ng/mg (Hartwig, Auwärter, and Pragst 2003). Similar conclusions have been obtained from this study.

4. CONCLUSIONS

The analysis by HS-SPME and GC-MS with deuterated internal standards proved to be very reliable and sufficiently sensitive for the routine analysis of the FAEE in hair and for the applicability of the method in forensic and clinical practice of the detection and treatment of alcohol abuse.

It was observed that FAEE concentrations could be, not only modified by frequent washes that allowed a decrease of these compounds, but their amount could increase for the environmental contamination, mainly because of the frequent use of ethanol containing cosmetics, use of hair lotion, and individual factors giving false positive results. Therefore, the use of hair lotion should be inquired in each case of hair analysis for FAEE. Fortunately most hair lotions and other hair care products do not contain high concentrations of ethanol. In doubtful cases, pubic hair samples should be analyzed for comparison, which normally is not so much cosmetically treated, and contain FAEE in similar concentrations as scalp hair. This fact was studied by Hartwig, Auwärter, and Pragst in 2003. Hair samples intended for analysis on FAEE should not be stored in laboratories where ethanol may be in the atmosphere; e.g., from the use of a solvent.

In spite of contamination problems of hair, it was demonstrated that hair is a powerful and a new biological womb to determine FAEE. Satisfactory analytical parameters have been achieved proving the usefulness of these metabolites to determine alcohol in hair.

REFERENCES

- Álvarez, I., A. Bermejo, P. Cid, M. J. Taberner, P. Fernández, and P. López. 2008. Microwave assisted extraction for the determination of ethyl glucuronide in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Appl. Toxicol.* 28: 773–78.
- Álvarez, I., A. Bermejo, A. Taberner, P. Fernández, P. Cabarcos, and P. López. 2009. Microwave assisted extraction: a simpler and faster method for the determination of ethyl glucuronide in hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bional. Chem.* 393: 1345–1350.
- Auwärter, V., F. Sporkert, S. Hartwig, F. Pragst, H. Vater, and A. Diefenbacher. 2001. Fatty acid ethyl ester in hair as markers of alcohol consumption. Segmental hair analysis of alcoholics, social drinkers and teetotallers. *Clin. Chem.* 47: 12, 2114–23.
- Bermejo, A. M., P. López, I. Álvarez, M. J. Taberner, and P. Fernández. 2006. Solid-phase microextracion for the determination of cocaine and cocaethylene in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. *For. Sci. Int.* 156(1): 2–8.
- Best, C. A., M. Laposata, V. G. Proios, and Z. M. Szczepiorkowski. 2006. Method to assess fatty acid ethyl ester binding to albumin. *Alcohol Alcohol.* 41(3): 240–46.
- De Giovanni, N., G. Donadio, and M. Chiarotti. 2007. The reliability of fatty acid ethyl esters (FAEE) as biological markers for the diagnosis of alcohol abuse. *J. Anal. Toxicol.* 31: 93–97.
- Hartwig, S., V. Auwärter, and F. Pragst. 2003. Fatty acid ethyl esters in scalp, pubic, axillary, bear and body hair as markers for alcohol misuse. *Alcohol Alcohol.* 38(2): 163–67.
- International Conference on Harmonization (ICH). 1994. *Validation of analytical methods: Definitions and terminology.* ICH Q2 A.
- International Conference on Harmonization (ICH). 1996. *Validation of analytical methods: Methodology.* ICH Q2 B.
- Kulaga, V., D. Caprara, U. Iqbal, and G. Koren. 2006. Fatty acid ethyl esters (FAEE); comparative accumulation in human and guinea pig hair as a biomarker for prenatal alcohol exposure. *Alcohol Alcohol.* 41(5): 534–39.
- Lange, L. G., S. R. Bergmann, and B. E. Sobel. 1981. Identification of fatty acid ethyl esters as a product of rabbit myocardial ethanol metabolism. *J. Biol. Chem.* 256: 1296873.
- Laposata, E. A., and L. G. Lange. 1986. Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. *Science* 231: 497–99.

- Laposata, E. A., D. E. Scherrer, and L. G. Lange. 1989. Fatty acid ethyl esters in adipose tissue. A laboratory marker for alcohol-related death. *Arch. Pathol. Labor Med.* 113: 762–66.
- Pragst, F., V. Auwärter, F. Sporkert, and K. Spiegel. 2001. Analysis of fatty acid ethyl esters in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *For. Sci. Int.* 121: 76–88.
- U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (USDH-FDA) (2001). *Guidance for industry, bioanalytical method validation.*
- Wurst, F. M., S. Alexson, M. Wolfersdorf, J. P. Allen, V. Auwärter, and F. Pragst. 2004. Concentration of fatty acid ethyl esters in hair of alcoholics: Comparison to other biological state markers and self reported-ethanol intake. *Alcohol Alcohol.* 39(1): 33–38.
- Yegles, M., A. Labarthe, V. Auwärter, S. Hartwig, H. Vater, R. Wenning, and F. Pragst. 2004. Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentration in hair of alcoholics, social drinkers and teetotallers. *For. Sci. Int.* 145(2–3): 167–73.

Analysis of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS)

Cabarcos P.; Hassan H.; Taberero M.J.; Scott K.

Journal of Applied Toxicology 33:638-643 (2013)

ISSN: 1099-1263

El alcohol es, probablemente, la droga legal más ampliamente consumida en el mundo.

Debido a los problemas que se generan en torno a esta sustancia, cada vez son más las investigaciones realizadas para determinar marcadores del consumo de etanol empleando diferentes matrices biológicas. La búsqueda de tales marcadores se debe a la imposibilidad de detectar dicha molécula en las muestras alternativas como por ejemplo el pelo, debido a su alta volatilidad. El pelo ha sido, por lo tanto, la matriz empleada en este estudio.

El biomarcador del consumo de etanol estudiado ha sido el etil glucurónido, molécula minoritaria del metabolismo del etanol, estable, no volátil e hidrofílica. A pesar de su baja incorporación al pelo, su presencia en esta matriz es indicativa de un fuerte consumo de alcohol.

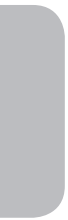
Por lo tanto, el objetivo de este estudio ha sido el desarrollo y posterior validación de un método cromatográfico que permitiese la determinación de EtG en pelo para así diagnosticar un consumo crónico de alcohol.

Una vez pesada la cantidad de pelo necesaria para la realización del análisis, se realiza una extracción por ultrasonidos seguida de una SPE empleando los cartuchos Oasis MAX®.

Con el fin de evitar la fase de derivatización y conseguir un método de detección rápido, se ha empleado la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS). La fase móvil empleada ha comenzado con un elevado porcentaje de fase acuosa debido a la alta polaridad que presenta la molécula en estudio.

Para la realización de la validación del método creado se han seguido las recomendaciones de la Agencia de Alimentos y Medicamentos americana (FDA).

Finalmente, el método se ha aplicado a 72 muestras de pelo. Alrededor de un 15% de las muestras analizadas han superado el valor establecido por algunos autores para diferenciar entre consumo social y abusivo de alcohol.



Analysis of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography-electrospray ionization–tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS)

Pamela Cabarcos,^{a*} Huda M. Hassan,^b María Jesús Tabernero^a and Karen S. Scott^b

ABSTRACT: Many different biomarkers can be used to evaluate ethanol intake. Ethyl glucuronide (EtG) is a direct phase II and minor metabolite of ethanol formed through the UDP-glucuronosyl transferase-catalyzed conjugation of ethanol with glucuronic acid. Its investigation is of interest in both clinical and forensic contexts because of the wide window of detection. A sensitive LC-MS/MS procedure has been developed and fully validated according to the guidelines of forensic toxicology for the analysis of EtG in hair. Sample preparation and chromatographic separation were thoroughly optimized. The analysis was performed in the multiple reaction monitoring mode using the transitions m/z 221 → 203 (for the quantification) and 221 → 85 or 75 (for the qualification) for EtG, and m/z 226 → 208 (for quantification) and 226 → 75 or 85 (for qualification) for EtG-D5, used as the internal standard. Analyses were carried out using an Inertsil ODS-3 column (100 × 3 mm i.d., 3 μm particle size) and a mobile phase composed of formic acid and acetonitrile. Various SPE cartridges and solvents were tested in order to obtain the highest recoveries and cleanest extracts. The assay linearity of EtG was confirmed over the range from 20 to 2500 pg mg⁻¹, with a coefficient of determination (R^2) above 0.99. The lower limit of quantitation (LLOQ) was 20 pg mg⁻¹ and the limit of detection was 10 pg mg⁻¹. Intra- and inter-day assays were less than 15% except at the LLOQ (20%). The analytical method was applied to 72 post-mortem hair samples. EtG concentration in the hair ranged from 0 to 653 pg mg⁻¹ hair. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: LC-ESI-MS/MS; ethyl glucuronide; direct phase II metabolite; UDP-glucuronosyl transferases; reverse phase; precursor ion; daughter ion

INTRODUCTION

Alcohol is perhaps the most widely consumed licit drug in the world. It causes many serious social problems and pathologies. For this reason, scientific research aiming to detect markers of alcohol use in different human matrix has gained interest in recent years (Tarcomnicu *et al.*, 2010).

Urine and blood analysis for ethanol is routinely undertaken in laboratories worldwide. However, ethanol cannot be used as a marker of alcohol consumption in hair because of its high volatility and potential absorption by hair from external sources (Kharbouche *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2008).

As ethanol itself is not a suitable compound for hair analysis, research has focused on other alcohol markers, particularly fatty acids ethyl esters, ethyl glucuronide and cocaethylene (alcohol and cocaine consumption together; Paul *et al.*, 2008).

EtG (ethyl-β-D-6 glucuronic acid) is a minor, stable, nonvolatile, water-soluble and direct phase II metabolite of ethanol formed after conjugation with glucuronic acid via UDP-glucuronosyl transferases. It represents less than 0.06% of the ingested ethanol dose (Kharbouche *et al.*, 2009). The specificity and sensitivity of EtG exceed those of all other known ethanol markers, being detectable only if alcohol has been consumed (Tarcomnicu *et al.*, 2010; Lamoureux *et al.*, 2009; Álvarez *et al.*, 2009). The structure of EtG is shown in Fig. 1.

EtG presents a weak incorporation rate in hair because of its acidic properties ($pK_a = 3.21$, polar molecule); consequently, only small amounts of EtG are detectable in hair. Its analysis thus requires powerful analytical procedures (Kharbouche *et al.*, 2010). Unlike many other more basic substances, EtG determination in hair does not need to take into account the hair color for the correct interpretation of hair testing results (Kharbouche *et al.*, 2010; Morini *et al.*, 2010; Appenzeller *et al.*, 2007).

The analysis of EtG in different matrix by GC/MS requires a derivatization step before analysis, while LC-MS/MS methods do not need derivatization and are thus less complex and less time-consuming. The chromatographic analysis of EtG in hair by reversed-phase LC-MS/MS was proposed by Janda *et al.* (2002). Owing to the highly polar nature of EtG, the chromatographic separation is carried out with a high amount of aqueous mobile phase; therefore a post-column addition of acetonitrile was

* Correspondence to: P. Cabarcos, Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, C/San Francisco s/n 15782, Santiago de Compostela, Spain. Email: Pamela.cabarcos@usc.es

^a Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, C/San Francisco s/n 15782, Santiago de Compostela, Spain

^b Forensic Medicine and Science, University of Glasgow, Glasgow G12 8 QQ, UK

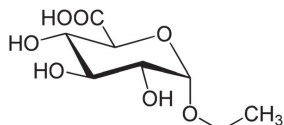


Figure 1. Structure of EtG.

compulsory to obtain a good ionization for MS detection (Tarcomnicu *et al.*, 2010).

The Society of Hair Testing (SoHT, 2009) has published guidelines for the detection of EtG in hair (SoHT, 2009). They recommend a cut-off value of 30 pg mg⁻¹ scalp hair measured in the 0–3 cm proximal segment to distinguish between moderate and heavy consumption of alcohol (Albermann *et al.*, 2010; SoHT, 2009). New requirements were also published for the use of EtG as an abstinence test with a concentration lower than 7 pg mg⁻¹ (Albermann *et al.*, 2010).

The aim of this study was to develop and validate a sensitive and specific liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) method for the determination of EtG in hair to diagnose heavy drinking, using only a small quantity of hair sample (Lamoureux *et al.*, 2009).

MATERIALS AND METHODS

Hair Samples

Head hair samples were obtained from 72 deceased subjects with potential alcohol problems at post-mortem. In all cases, hair was cut by scissors as close as possible from the skin and stored at room temperature until analysis in Forensic Medicine and Science at Glasgow University. A blank sample of hair was obtained from an individual who was known not to consume alcohol.

Reagents and Standards

Acetonitrile, methanol and cyclohexane were HPLC-grade (Merck, Darmstadt, Germany). Formic acid was purchased from Fluka. Deionized water was obtained using a Millipore system Direct-Q3. Ethyl glucuronide and ethyl glucuronide-d5 were purchased from Cerilliant (100 µg ml⁻¹). EtG working solutions were prepared by dilution in methanol at concentrations of 0.1, 0.5, 1, 5 and 10 µg ml⁻¹. EtG-d5 concentration was 5 µg ml⁻¹. SPE Oasis MAX 3 cc columns were purchased from Waters.

Extraction Procedure

In order to remove external contamination and sebum that could interfere in the analysis, all hair samples were thoroughly sonicated twice with water during 3 min, followed by 3 min with dichloromethane. Hair samples were dried at room temperature. To 100 mg of a washed and finely cut (1–2 mm length) hair, 2 ml of water and 20 µl of internal standard solution (5 µg ml⁻¹) were added. After sonication for 15 min without heat and centrifugation for 10 min, the mixture was applied to an Oasis MAX solid-phase extraction (SPE) cartridges previously conditioned with 2 ml of MeOH, followed by 2 ml of water. After that, the prepared sample was added. The SPE cartridges were then washed with 2 ml of cyclohexane. A vacuum was applied for 5 min to remove all residual liquid. Elution was done using 2 ml MeOH–formic acid

(98:2; v/v). The eluate was then evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 37 °C. The residue was dissolved with 200 µl of mobile phase (0.1% formic acid–acetonitrile, 99:1). A 20 µl aliquot was injected into the LC-MS/MS system.

Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry

A ThermoFinnigan LCQ Deca XP equipped with a MS pump system and a surveyor autosampler was used for this study. Chromatographic separation was achieved using an Inertsil ODS-3 column (100 × 3 mm i.d., 3 µm particle size) and guard column (1.5 × 10 mm i.d., 3 µm particle size). This column was chosen based on results of preliminary tests. Comparison tests were done with a Zic[®]-Hiic column, 150 × 2.1 mm, with 3.5 µm packing material, as used by Tarcomnicu *et al.* (Kintz *et al.*, 2008; Tarcomnicu *et al.*, 2010). However, high pressures and variable retention times were observed. A binary gradient consisting of (A) formic acid and (B) acetonitrile was used at a flow-rate of 200 µl min⁻¹. The gradient was run as the following scheme: from sample injection until 8.0 min, isocratic elution with 99% A and 1% B was used; from 8.0 to 8.10 min, a linear gradient to 10% A; from 8.10 to 10.0 min, isocratic elution with 10% A; from 10.0 to 10.10 min, a linear gradient back to 99% A; and from 10.10 to 18.0 min, isocratic elution with 99% A.

Ionization and detection parameters were optimized using the auto-tune function of the MS software by infusion of a 1 µg ml⁻¹ solution of EtG (3 µl min⁻¹) with a syringe-pump coupled with a tee-union to the outlet of the HPLC system. Ionization in the negative mode was produced by a turboionspray source at 275 °C, using nitrogen as sheath and auxiliary gas. Detection was performed in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The precursor ion used was at *m/z* value corresponding to the molecular ion minus one proton (M⁻). Two product ions can be obtained for EtG and its internal standard (IS). The MS/MS data are shown in Table 1. Bold numbers correspond to quantifier transitions. All others transitions are qualifiers. EtG transitions are represented in Fig. 2 (Janda *et al.*, 2002). Chromatograms and mass spectra for EtG and EtG-d5 using the above gradient are shown in Fig. 3 with a concentration of 1 µg ml⁻¹.

RESULTS

Validation Procedure

The analytical range to be validated was chosen based on concentrations reported in the literature (Kharbouche *et al.*, 2009; Kintz *et al.*, 2008; Janda *et al.*, 2002; Alt *et al.*, 2000; Yegles *et al.*, 2004; Morini *et al.*, 2009; Bendroth *et al.*, 2008; Klys *et al.*, 2005).

Table 1. Precursor ion, daughter ion and retention time for EtG and EtG-d5

	Precursor ion <i>m/z</i>	Daughter ion <i>m/z</i>	Retention time (min)
EtG	221	203	8.1
		85	
		75	
EtG-d5	226	208	7.9
		85	
		75	

The validation was carried out according to the guidelines of the FDA (2001). The method was validated for selectivity, linearity and sensitivity, precision and accuracy, quality control, process efficiency, matrix effect and recovery.

Selectivity

Six different hair samples of strict teetotalers were analyzed in order to determine whether any endogenous hair constituents

interfered with the analyte or the IS. No interfering peaks were found at the retention times for EtG or the IS.

Linearity

The calibration was evaluated by analyzing six replicates of spiked hair samples at 20, 100, 500, 1000, 1500 and 2500 pg mg^{-1} . Peak area ratio vs concentration was plotted and curves were linear ($r^2 > 0.99$). The limit of detection (LOD) was determined as 10 pg mg^{-1} and the lower limit of quantification was 20 pg mg^{-1} (Lamoureux *et al.*, 2009; Kintz *et al.*, 2008; Janda *et al.*, 2002; Yegles *et al.*, 2004; Morini *et al.*, 2006, 2009; Bendroth *et al.*, 2008; Klys *et al.*, 2005; Politi *et al.*, 2006).

Precision and accuracy

Intra-day assay was examined by measuring three concentrations within the established linear range (high, intermediate and low concentrations) five times in the same day and on five different days to evaluate inter-day assay (Table 2).

All concentrations were determined using international validation rules. The accuracy of an analytical method describes the closeness of mean test results obtained by the method to the true value (concentration) of the analyte. Accuracy is determined by replicate analysis of samples containing known amounts of the analyte. Accuracy should be measured using a minimum of five determinations per concentration. A minimum of three concentrations in the range of expected concentrations is recommended. The mean value should be within 15% of the

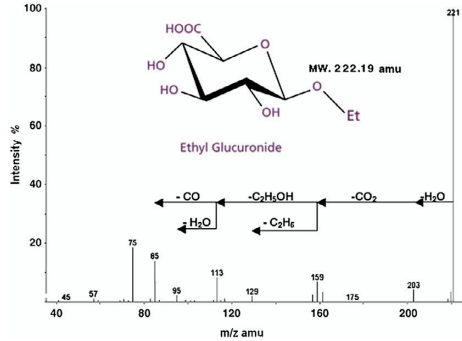


Figure 2. Transitions for EtG.

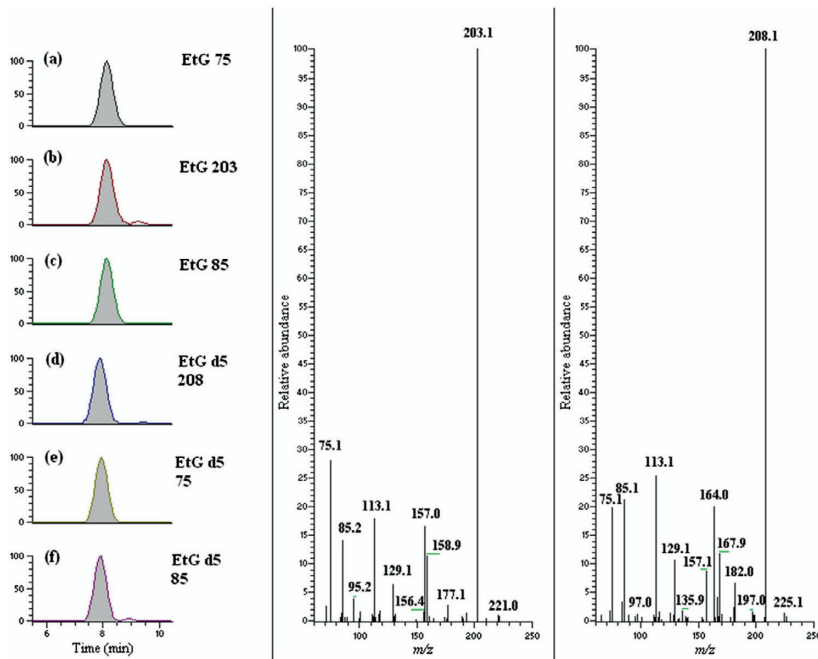


Figure 3. Mass spectra for EtG and EtG-d5.

Table 2. Intra and inter day-assay

Spiked amount of EtG	20 pg mg ⁻¹		500 pg mg ⁻¹		2500 pg mg ⁻¹	
	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
CV	18.04	19	11.16	9.5	8.2	9.5
Relative error	3.51	9.8	13.25	0.6	0.48	3.1

actual value except at the LLOQ (lower limit of quantification), where it should not deviate by more than 20%. The deviation of the mean from the true value serves as the measure of accuracy. The precision of an analytical method describes the closeness of individual measures of an analyte when the procedure is applied repeatedly to multiple aliquots of a single homogeneous volume of biological matrix. Precision should be measured using a minimum of five determinations per concentration. A minimum of three concentrations in the range of expected concentrations is recommended. The precision determined at each concentration level should not exceed 15% of the coefficient of variation (CV), except for at the LLOQ, where it should not exceed 20% of the CV (FDA, 2001). Data presented in Table 2 satisfy the international validation rules. The CV and relative error are less than 15% (11.16 and 13.25% are the highest values, respectively), except for at the LLOQ where they are within the accepted 20% of deviation (19 and 9.8% are the highest values for CV and relative error, respectively).

Quality control

Quality control samples were prepared at two concentrations (low and high) and tested five times on the same day (Table 3).

Table 3. Quality control data

Concentration (pg mg ⁻¹)	Experimental concentration	CV	Bias
50	50.5	14.5	1.1
2000	1718.4	14.5	-14.07

CV, Coefficient of variation.

Process efficiency, matrix effect and recovery

All the parameters were calculated according to Matuszewski *et al.* (2003). Three sets were prepared to evaluate these parameters. These three sets corresponded to three types of system evaluation. Two concentrations were analyzed in all cases and analyses were repeated three times at each concentration. The first set, set 1, was prepared to evaluate the MS/MS response for neat standards of two analytes injected in the mobile phase. The results of analyses of this set provided a good insight into the overall HPLC-MS/MS system reproducibility in measuring the absolute peak areas on consecutive injections, the performance of the detector and the chromatographic system as a whole. The second set, set 2, was prepared in blank hair samples (100 mg). It was first extracted and spiked after extraction with EtG and its IS. The third set, set 3, was prepared in hair as in set 2, but the hair samples were spiked before extraction. The results of the analyses for sets 1–3 are summarized in Tables 4 and 5. The results obtained in this manner allow determination of the matrix effect (ME), recovery (RE) of the extraction procedure and overall process efficiency (PE) by comparing the absolute peak areas for EtG and EtG-d5 obtained in sets 1–3 (Table 5). Peak areas obtained in neat solutions standards in set 1 are depicted as A, the corresponding peak areas for standards spiked after extraction into hair samples as B (set 2), and peak areas for standards spiked before extraction as C (set 3). The ME, RE and PE values can be calculated according to equations (1)–(3) (Matuszewski *et al.* 2003).

$$PE = (A/C) \times 100 \quad (1)$$

$$RE = (A/B) \times 100 \quad (2)$$

Table 4. Mean peak area for EtG and EtG-d5

Concentration (pg mg ⁻¹)	Mean peak area					
	EtG		EtG-d5		EtG-d5	
	Set 1	Set 2	Set 3	Set 1	Set 2	Set 3
500	286234.0	225411.7	213148.0	513377.7	454659.3	411566.0
1500	652307.7	493735.7	628091.0	483880.0	458026.7	341051.0

Table 5. Matrix effect, recovery and process efficiency data

Concentration (pg mg ⁻¹)	ME (%)		RE (%)		PE (%)	
	EtG	EtG-d5	EtG	EtG-d5	EtG	EtG-d5
500	78.75	88.56	94.56	90.52	74.47	80.17
1500	75.69	94.66	127.2	74.46	96.29	70.48
Mean	77.22	91.61	110.9	82.49	85.38	75.32

$$ME = (B/C) \times 100 \quad (3)$$

As LC-MS/MS was used, it is important to consider ion suppression. It was compared with three different cartridges (Oasis MAX, SampliQ and Bond Elut) and an extraction with H₂O. All of them were compared with the signal obtained for the mobile phase. The bigger ion suppression was for extraction with H₂O and SampliQ cartridges.

Application to Hair Samples

Seventy-two hair sample and two samples for proficient test were applied to the method. The percentage of real cases has been represented in Fig. 4, where a classification can be seen according to their EtG level.

The EtG concentration varied between 0 and 653 pg mg⁻¹. Concentrations reported in literature are different between papers (Lamoureux *et al.*, 2009; Kintz *et al.*, 2008; Janda *et al.*, 2002; Alt *et al.*, 2000; Bendroth *et al.*, 2008). Some of them found an EtG of under 10 pg mg⁻¹, but others found higher ranges of values (7–300, 60–800, 4–6000 and 5–13 000 pg mg⁻¹). Yegles *et al.* (2004) found EtG levels for alcoholic subjects to be between 72 and 3000 pg mg⁻¹. A cut-off for EtG in hair was established at 30 pg mg⁻¹ scalp hair by SoHT (SoHT, 2009). Figure 4 shows three EtG levels: lower than cut off, between 30 and 50 pg mg⁻¹ and higher than 50 pg mg⁻¹. The value of 50 pg mg⁻¹ was established

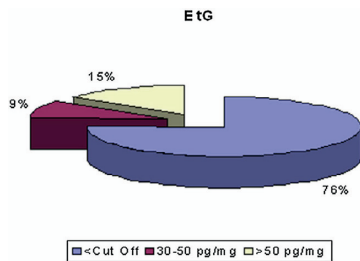


Figure 4. Percentage of real cases.

by several authors (Lamoureux *et al.*, 2009; Janda *et al.*, 2002) to distinguish between social drinkers and alcoholic patients. Some 15% of real cases analyzed can be considered as alcoholic with levels higher than 50 pg mg⁻¹. A chromatogram of a real case (65 pg mg⁻¹) can be seen in Fig. 5.

Two test samples were compared with different laboratories with satisfactory results. This means that the method can be used in toxicological laboratories for real samples analysis.

DISCUSSION

EtG is a metabolite of ethanol, which is incorporated into hair as a consequence of drinking alcohol. A sensitive method was developed for analysis of EtG in hair using LC-MS/MS. Optimization was done with several parameters. Different mobile phases and gradients (Lamoureux *et al.*, 2009; Janda *et al.*, 2002; Bendroth *et al.*, 2008; Klys *et al.*, 2005), HPLC columns, cartridges (Paul *et al.*, 2008; Kharbouche *et al.*, 2009; Lamoureux *et al.*, 2009; Kintz *et al.*, 2008; Janda *et al.*, 2002; Yegles *et al.*, 2004; Klys *et al.*, 2005; Politi *et al.*, 2008), solvents volumes, injection volumes and hair amounts were tried. A sensitive, simple and rapid LC-MS/MS method for the quantification of EtG in hair according to Morini *et al.* (2006) was modified and fully validated according to FDA guidelines (FDA, 2001). Satisfactory results were obtained in the validation procedure. Intra- and inter-day precision and accuracy were less than 15% except for the LLOQ, which was less than 20%. The matrix effect during validation of analytical methods in biological matrix may be best examined by comparing the MS/MS response (peak areas) of an analyte at any given concentration spiked after extraction (B) with the MS/MS response of the same analyte present in mobile phase (unextracted sample, C). The equation may be considered as an absolute matrix effect. A value of 100% indicates that the responses in the mobile phase and in the hair extracts were the same and no absolute matrix effect was observed. A value of >100% indicates analyte signal enhancement owing to the matrix interference and a value of <100% indicates an ionization suppression. The mean absolute matrix effect, calculated according to equation (3), was 77.2 and 91% for EtG and its IS respectively. These values indicate ionization suppression. It is larger for EtG than for EtG-d5. The presence of matrix

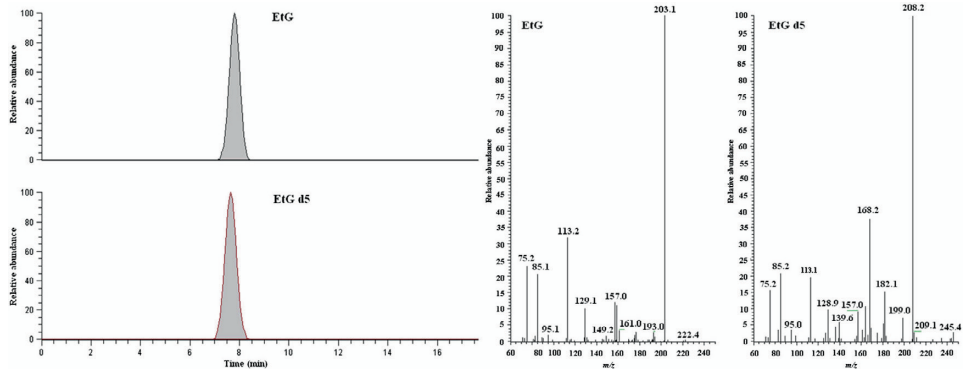


Figure 5. Chromatogram of a real sample.

effect for an analyte does not necessarily indicate that the method may not be valid. Assuming that the relative matrix effect exhibits the same pattern for the drug and the internal standard, the ratio should not be affected by measuring the drug concentration (Matuszewski *et al.*, 2003). The recovery must be calculated using equation (2) instead of equation (1) since it does not take into account the matrix effect that may greatly influence this ratio. The value $A/C \times 100$ may be considered as the overall process efficiency. In this case, owing to the observed ionization suppression for EtG and EtG-d5, the process efficiency values were <100%. The recovery values were 110.8 and 82.4% for EtG and EtG-d5, respectively.

CONCLUSIONS

An Inertsil-ODS 3 column and HPLC-MS/MS method was developed and validated for the analysis of EtG in hair. Sample preparation based on SPE using Oasis MAX cartridges resulted in clean extracts. Matrix effect is not a problem in this method. Test results were satisfactory. Analytes were identified by their retention times and mass spectra. Therefore, this method proved to be very reliable and sufficiently sensitive for the routine analysis of EtG in hair and for the application of the method in forensic and clinical practice of the detection and treatment of alcohol abuse.

References

- Albermann ME, Musshoff E, Madea B. 2010. A fully validated high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair for the proof of strict alcohol abstinence. *Anal. Bioanal. Chem.* **396**: 2441–2447.
- Alt A, Janda I, Seidl S, Wurst F. 2000. Determination of ethyl glucuronide in hair samples. *Alcohol Alcohol.* **35**(3): 313–314.
- Álvarez I, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P, Cabarcos P, López P. 2009. Microwave-assisted extraction: a simpler and faster method for the determination of ethyl glucuronide in hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **393**: 1345–1350.
- Appenzeller BMR, Schuman M, Yegles M, Wennig R. 2007. Ethyl glucuronide concentration in hair is not influenced by pigmentation. *Alcohol Alcohol.* **42**(4): 326–327.
- Bendroth P, Kronstrand R, Helander A, Greby J, Stephanson N, Krantz P. 2008. Comparison of ethyl glucuronide in hair with phosphatidylethanol in whole blood as post-mortem markers of alcohol abuse. *For. Sci. Int.* **176**: 76–81.
- FDA. 2001. *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*. Food and Drug Administration. Available at: <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>.
- Janda I, Weinmann W, Kuehnle T, Lahode M, Alt A. 2002. Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC-MS/MS. *For. Sci. Int.* **128**: 59–65.
- Kharbouche H, Sporkert F, Troxler S, Augsburg M, Mangin P, Staub C. 2009. Development and validation of a gas chromatography-negative chemical ionization tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair and its application to forensic toxicology. *J. Chromatogr. B* **877**: 2337–2343.
- Kharbouche H, Steiner N, Morelato M, Staub C, Boutrel B, Mangin P, Sporkert F, Augsburg A. 2010. Influence of ethanol dose and pigmentation on the incorporation of ethyl glucuronide into rat hair. *Alcohol* **44**(6): 507–514.
- Kintz P, Villain M, Vallet E, Etter M, Salquebre G, Cirimele V. 2008. Ethyl glucuronide: Unusual distribution between head hair and pubic hair. *For. Sci. Int.* **176**: 87–90.
- Klys M, Scislowski M, Rojek S, Kolodziej J. 2005. A fatal clomipramine intoxication case of a chronic alcoholic patient: application of post-mortem hair analysis method of clomipramine and ethyl glucuronide using LC/APCI/MS. *Legal Med.* **7**: 319–325.
- Lamoureux F, Gaullier JM, Sauvage FL, Mercierolle M, Vallejo C, Lachatre G. 2009. Determination of ethyl-glucuronide in hair for heavy drinking detection using liquid chromatography-tandem mass spectrometry following solid-phase extraction. *Anal. Bioanal. Chem.* **394**: 1895–1901.
- Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. 2003. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **75**: 3019–3030.
- Morini L, Politi L, Groppi A, Stramesi C, Poletтини A. 2006. Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **41**: 34–42.
- Morini L, Politi L, Poletтини A. 2009. Ethyl glucuronide in hair. A sensitive and specific marker of chronic heavy drinking. *Addiction* **104**: 915–920.
- Morini L, Zucchella A, Poletтини A, Politi L, Groppi A. 2010. Effect of bleaching on ethyl glucuronide in hair: an *in vitro* experiment. *For. Sci. Int.* **198**: 23–27.
- Paul R, Kingston R, Tsanaclis L, Berry A, Guwy A. 2008. Do drug users use less alcohol than non-drug users? A comparison of ethyl glucuronide concentration in hair between the two groups in medico-legal cases. *For. Sci. Int.* **176**: 82–86.
- Politi L, Morini L, Leone F, Poletтини A. 2006. Ethyl glucuronide in hair: is it a reliable marker of chronic high levels of alcohol consumption? *Addiction* **101**: 1408–1412.
- Politi L, Morini L, Mari F, Groppi A, Bertol E. 2008. Ethyl glucuronide and ethyl sulphate in autopsy samples 27 years after death. *Int. J. Legal Med.* **122**: 507–509.
- SoHT. 2009. Consensus of the Society of Hair Testing on Hair Testing for Chronic Excessive Alcohol Consumption.
- Tarcomnicu T, Van Nuijs ALN, Aerts K, De Doncker M, Covaci A. 2010. Ethyl glucuronide in meconium and hair by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *For. Sci. Int.* **196**: 121–127.
- Yegles M, Labarthe A, Auwärter V, Hartwig S, Vater H, Wennig R, Pragst F. 2004. Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholic, social drinkers and teetotalers. *For. Sci. Int.* **145**: 167–173.

A new method for quantifying prenatal
exposure to ethanol by microwave-assisted
extraction (MAE) of meconium followed by
gas chromatography-mass spectrometry
(GC-MS)

Cabarcos P.; Tabernero M.J.; Álvarez I.; Míguez M.; Fernández P.;
Bermejo A.M.

Una de las consecuencias asociadas al consumo de alcohol materno durante el embarazo es la aparición del Síndrome de Alcoholismo Fetal (FAS), el cual conlleva una serie de graves complicaciones en el recién nacido.

Conseguir la declaración de las madres de una posible ingesta de alcohol durante el período de gestación suele ser una tarea complicada o imposible en la mayoría de los casos. Por este motivo, se requieren métodos específicos.

La determinación de la molécula del etanol presenta una serie de desventajas: ventana de detección temporal corta y rápida eliminación del organismo. Por ello, se ha propuesto el estudio de nuevos marcadores del consumo de alcohol resultando ser los marcadores directos los más específicos. Esto se debe a la presencia de los átomos de carbono de la molécula del etanol, como es el caso de los ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs).

El análisis de estos compuestos en meconio informa de la exposición a alcohol durante el segundo y el tercer trimestre del embarazo, proporcionando una amplia ventana de detección. Además, el uso de esta muestra presenta otras ventajas como es su fácil recogida y alta especificidad.

La novedad del método optimizado radica, principalmente, en la aplicación de la extracción asistida por microondas (MAE) como método de extracción; técnica normalmente usada para la extracción de contaminantes orgánicos en sedimentos, aguas, etc.

La técnica de detección empleada ha sido la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC/MS).

Una vez validado el método, éste se ha aplicado a 81 muestras de meconio recogidas en la Unidad de Neonatología del Complejo Hospitalario

Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). Un 63% de las muestras analizadas han mostrado concentraciones inferiores al valor de cut-off fijado, mientras que se han obtenido en torno a un 30% de resultados positivos. El etil palmitato ha sido el éster etílico predominante en este último grupo. Cabe destacar el especial cuidado que se debe tener con respecto a la formación endógena de estos compuestos en el organismo.



A new method for quantifying prenatal exposure to ethanol by microwave-assisted extraction (MAE) of meconium followed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS)

Pamela Cabarcos · María Jesús Tabernero ·
Iván Álvarez · Martha Míguez ·
Purificación Fernández · Ana María Bermejo

Received: 13 March 2012 / Revised: 4 May 2012 / Accepted: 9 May 2012 / Published online: 6 June 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Ethanol is a legal and widely available substance. There are health and social consequences associated with its abuse. One of the most important problems is related to alcohol consumption during pregnancy. In fact, prenatal ethanol exposure can be associated with fetal alcohol spectrum disorder (FASD), a term used to describe a wide range of potentially lifelong effects that include physical, mental, behavioral, and learning disabilities. Fatty acid ethyl esters (FAEEs), which are non-oxidative metabolites of ethanol, are currently used as biomarkers of direct ethanol consumption in different matrices, including hair, blood, skin surface, and meconium. Analysis of these compounds in meconium reveals exposure to alcohol during the second and third trimesters of pregnancy. An important finding for evaluation of gestational ethanol exposure is the fact that FAEEs do not cross the placenta. Because they accumulate in the fetal gut from approximately the 20th week of gestation until birth, this provides a wide window of detection of chronic exposure to alcohol. The sum of the concentrations of all the FAEEs, with a cutoff of 2 nmol g⁻¹ or 600 ng g⁻¹ meconium, has been recommended as evidence of maternal alcohol use. We introduce a novel technique to quantify ethyl myristate, ethyl palmitate, ethyl stearate, and their deuterated analogues (as internal standards, IS) in meconium using microwave-assisted extraction (MAE) coupled with gas

chromatography–mass spectrometry (GC–MS). Limits of detection and quantification were 50 and 100 ng g⁻¹ for all analytes except ethyl stearate (LOD 100 ng g⁻¹ and LOQ 500 ng g⁻¹). Calibration curves were linear from the LOQ to 5000 ng g⁻¹. The validated method was applied to the analysis of 81 meconium samples.

Keywords Meconium · Fatty acid ethyl esters · Fetal alcohol spectrum disorder · Microwave-assisted extraction · Gas chromatography · Mass spectrometry

Introduction

Fetal alcohol spectrum disorder (FASD) is often the result of maternal alcohol consumption during pregnancy. Symptoms of FASD are distinctive craniofacial abnormalities, growth retardation, and central nervous system damage [1]. The treatment of children exposed to ethanol in utero could be more efficient if early identification of exposure were possible [2]. However, self-reports of gestational drinking from the mother are often difficult to obtain.

Ethanol is eliminated rapidly from circulation, and the time for its detection is in the range of hours. Various new markers have been proposed to expand the detection period, but their characteristics have not yet justified their use in routine medical practice. Direct alcohol biomarkers are valuable because they contain the carbon atoms of ethanol and so can only be derived from alcohol. Some of the most important direct markers are ethyl glucuronide, phosphatidylethanol, and fatty acid ethyl esters (FAEEs) [3]. The FAEEs group consists of more than 20 different compounds from which ethyl laurate (E 12), ethyl myristate (E 14), ethyl palmitate (E 16), ethyl palmitoleate (E 16:1), ethyl stearate

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-012-6108-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

P. Cabarcos (✉) · M. J. Tabernero · I. Álvarez · M. Míguez ·
P. Fernández · A. M. Bermejo
Forensic Science Institute, Faculty of Medicine,
C/San Francisco s/n 15782,
Santiago de Compostela, Spain
e-mail: pamelacabarcos@usc.es

(E 18), ethyl oleate (E 18:1), ethyl linoleate (E 18:2), ethyl linolenate (E 18:3), ethyl arachidonate (E 20:4), and ethyl docosahexanoate (E 22:6) were included in different combinations in analysis in different studies [4, 5]. FAEEs are formed by esterification of ethanol with endogenous free fatty acids via a nonoxidative pathway with the help of FAEE synthase and acyl-CoA. FAEEs formation can be spontaneous but is most often catalyzed by microsomal acyl-CoA: ethanol *O*-acetyltransferase (AEAT) or cytosolic FAEE synthase, which is found throughout the body and which uses ethanol and free fatty acids as its substrates [6]. The newly formed metabolites (FAEEs) are excreted in meconium.

Meconium is the first stool passed by the newborn within 72 h after birth. It is a dark viscous material and contains 60–80 % water [5]. It begins forming at approximately 12 weeks of gestation and serves as a reservoir of fetal chemical exposure during the second and third trimesters of pregnancy; that is why it provides a long time window for detection of chronic exposure to alcohol. Meconium is an optimum sample because of ease of collection and its analysis results in high sensitivity and specificity [7].

There is currently no universally agreed criterion for determination of FAEEs. Because ratios of individual FAEE concentrations vary from sample to sample, testing for several FAEEs and use of the sum of the concentrations of all the FAEEs for interpretation has proved more efficient than use of a single ester. Small amounts of FAEEs were detected in meconium of newborns whose mothers had not consumed alcohol. This may originate from endogenous ethanol or from ethanol traces contained in foods. For this reason, a cut-off had to be defined for discrimination between neonates with and without prenatal alcohol exposure [5]. In some studies 2 nmol g⁻¹ (600 ng g⁻¹) was chosen as cut-off if the sum of the concentrations of all six FAEEs was assumed to differentiate heavy maternal ethanol consumption during pregnancy from occasional use or no use at all. In other studies, the same cut-off was chosen but with the sum of the concentrations of seven or four FAEEs. It is also believed that a total FAEEs concentration above 10,000 ng g⁻¹ may indicate that the newborn has been exposed to significant amounts of alcohol during pregnancy [2, 6, 8–14]. Some authors found that ethyl myristate, palmitate, and laurate were detected in meconium from newborns of abstinent mothers. Ethyl linoleate and arachidonate have been suggested as being highly specific biomarkers for prenatal exposure to alcohol. The same authors also suggest that ethyl arachidonate and docosahexanoate could be potential biomarkers of the effects of alcohol on the developing fetal brain. Other authors have found that ethyl palmitate, ethyl oleate, ethyl linoleate, and ethyl arachidonate seem to be the most informative esters for this purpose [2, 5].

Methods for the determination of FAEEs in meconium samples have been described in the scientific literature.

Most are based on solid-phase extraction and solid-phase microextraction [2, 5, 8–16] but simple, rapid, and less labor-intensive extraction techniques are needed in forensic toxicology. The growing interest in obtaining increasingly better results in this context has led to the development of microwave-assisted extraction (MAE), which has been widely used for extraction of organic pollutants from sediments, soil, water, and other types of material. In contrast, MAE has rarely been used to extract drugs of abuse from different materials, for example serum, urine, tablets, or coca leaves [17]. Chromatographic methods using gas chromatography (GC) coupled with either flame-ionization detection or mass spectrometry (MS) or using LC–MS–MS have been published in recent years [1, 2, 5, 8–16]. This study proposes a new, fast, sensitive, and reliable method for analysis of FAEEs in meconium samples which uses MAE and GC–MS.

The chemical structures of the FAEEs are shown in Fig. 1. The respective deuterated FAEEs were used as internal standards for the analyses.

Materials and methods

Chemicals and standards

Ethyl myristate, ethyl palmitate, and ethyl stearate, and the corresponding free carboxylic acids were purchased from Sigma–Aldrich (Madrid, Spain). Ethanol d-6 and thionyl chloride were also obtained from Sigma–Aldrich. All other reagents were obtained in analytical grade purity from Merck (Barcelona, Spain). Because the deuterated standards d₅-ethyl myristate, d₅-ethyl palmitate, and d₅-ethyl stearate are not available commercially, they were prepared in our laboratory, by a published method [18, 19]. Distilled water was obtained from a Milli-Q water system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Preparation of standard solutions

Stock standard solutions (1.0 mg mL⁻¹) of the three FAEEs and their respective deuterated standards were prepared in chloroform and stored in a freezer at –20 °C. Working solutions at concentrations of 5, 10, and 50 µg mL⁻¹ were

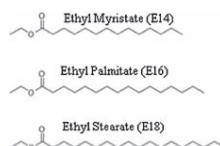


Fig. 1 Structures of E14, E16 and E18

also prepared in chloroform by dilution of the stock solutions.

Meconium samples

A total of 110 meconium samples were obtained from the neonatology wards of the Complejo Hospitalario Universitario of Santiago de Compostela (CHUS) with signed informed consent from all the newborns' parents. However, only in 81 cases was the sample amount sufficient for a single analysis.

Meconium, collected from the diapers within the first 24 to 48 h of the newborn's life, was placed in a plastic tube, homogenized, and immediately stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. It was sent to the Laboratory of Toxicological Analysis of the Institute of Legal Medicine (University of Santiago de Compostela) to measure FAEEs concentrations. The neonatology ward also provided all the information on mother–infant dyads when possible.

Sample preparation

MAE proved to be an efficient and reproducible mode of extraction. Meconium (500 mg), 50 μL IS stock (containing each of the three d_3 -ethyl esters in heptane at $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), 1 mL H_2O , and 12 mL hexane were added to the vessels and microwave-assisted extraction conducted using the program: 2 min heating from room temperature to $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, which was held for 10 min. After extraction, the vessels were cooled to room temperature before opening. After centrifugation for 5 min the extracts were transferred to tubes for pre-concentration. They were pre-concentrated to dryness with an inert gas stream (N_2) at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, resuspended in 40 μL hexane and vortex mixed for 5 min. A 2- μL volume was then injected for GC–MS analysis.

The sum of the concentration of the three FAEEs was calculated and used for further investigation.

Instrumental analysis

Microwave-assisted extractor

Microwaves are non-ionizing electromagnetic waves of frequency from 300 MHz to 300 GHz positioned between X-rays and infrared rays in the electromagnetic spectrum. Some materials can convert part of the electromagnetic energy absorbed from microwaves into heat energy. MAE is the process of heating solvents in contact with a sample with microwave energy to partition compounds of analytical interest from the sample matrix into the solvent. The result is a rapid sample-preparation technique that enables extraction with small amounts of common laboratory solvents in closed

vessels with elevated temperatures and temperature control of the extraction process. This unique heating mechanism can significantly reduce the extraction time (usually less than 30 min). The principle of heating using microwaves is based upon their direct effect on polar materials/solvents. Correct choice of solvent is fundamental for achieving optimum extraction. Solvent choice for MAE is dictated by the solubility of the target analyte, by the interaction between solvent and matrix, and, finally, by the microwave-absorbing properties of the solvent. The solvent should, preferably, have high selectivity toward the analyte of interest, excluding unwanted matrix components. Another important aspect is the compatibility of the extracting solvent with further chromatographic analysis. The dielectric properties of the solvent toward microwave heating are important in microwave extraction. A small amount of water in the extracting solvent can penetrate easily into the matrix, and facilitate better heating of the matrix. As in other extraction techniques, time is another condition which must be taken into account. Generally, by increasing the extraction time, the quantity of analytes extracted is increased, although there is the risk that degradation may occur. Often 15–20 min is sufficient.

Microwave-assisted extraction was carried out using an Ethos Plus MPR300/12S (Milestone, Agrigento, Italy) equipped with a solvent detector. This equipment could be used to extract 12 samples simultaneously in PTFE-lined extraction closed vessels under identical extraction conditions (temperature and pressure), with simultaneous magnetic stirring of the sample and solvent inside. An in-board control system was installed for monitoring and controlling pressure and conditions inside the extraction vessels. The maximum power of the oven is 1,000 W, and the power changes to achieve and maintain the temperature selected [17, 20–22].

GC–MS

All the extracts were analyzed by use of a model 6890 gas chromatograph from Hewlett–Packard (Little Falls, NJ, USA) interfaced to a model 5973 inert mass-selective detector (MSD) from Agilent Technologies (Las Rozas, Spain). An HP5-MS capillary column (30 $\text{m}\times 0.25\text{ mm}$, 0.5 μm film; Hewlett–Packard), with helium as carrier gas (1.0 mL min^{-1}) was used for the gas chromatographic separation. Samples were injected in splitless mode, and a purge time of 2 min was used. The oven temperature program was: 1 min at $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, then $40^{\circ}\text{min}^{-1}$ to $220\text{ }^{\circ}\text{C}$, held for 1 min, then finally 2°min^{-1} to $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. The injector temperature was set at $245\text{ }^{\circ}\text{C}$. Both total-ion detection and single-ion monitoring were used. For full-scan acquisition the MS was operated in positive electron-impact mode (electron

energy 70 eV) and the mass detection range was m/z 50–550. Standards were monitored in full-scan acquisition mode and peak identities were confirmed with the MPW 2007, PMW_TOX 2, and Wiley 275 libraries of mass spectra. The mass selective detector was held at 320 °C, the ion source at 230 °C, and the quadrupole at 150 °C. Quantifier and qualifier ions used for each analyte were selected on the basis of their abundance and m/z values. Because of their reproducibility and lack of interference, high mass ions were selected when possible. All compounds were injected in SCAN mode for identification (mass spectra; Fig. 2); analysis was then performed in SIM mode to increase the sensitivity of the method. GC–MS data (retention times and m/z values) for all the compounds are reported in Table 1. Underlined ions were used for quantification. Ions in parentheses are internal standard ions (d_5).

Results and discussion

Validation procedure

The procedure was validated for linearity, limits of detection and quantification, repeatability (intraday precision), reproducibility (interday precision), and recovery [23]. A pool of unspiked meconium from mothers who had declared they had not consumed alcohol during pregnancy was used for validation.

Selectivity

FAEEs were found in the pooled sample of newborns' meconium. There are several possible reasons for this. Ethanol is a common by-product of normal physiological metabolism in the human gut and is also present in some food

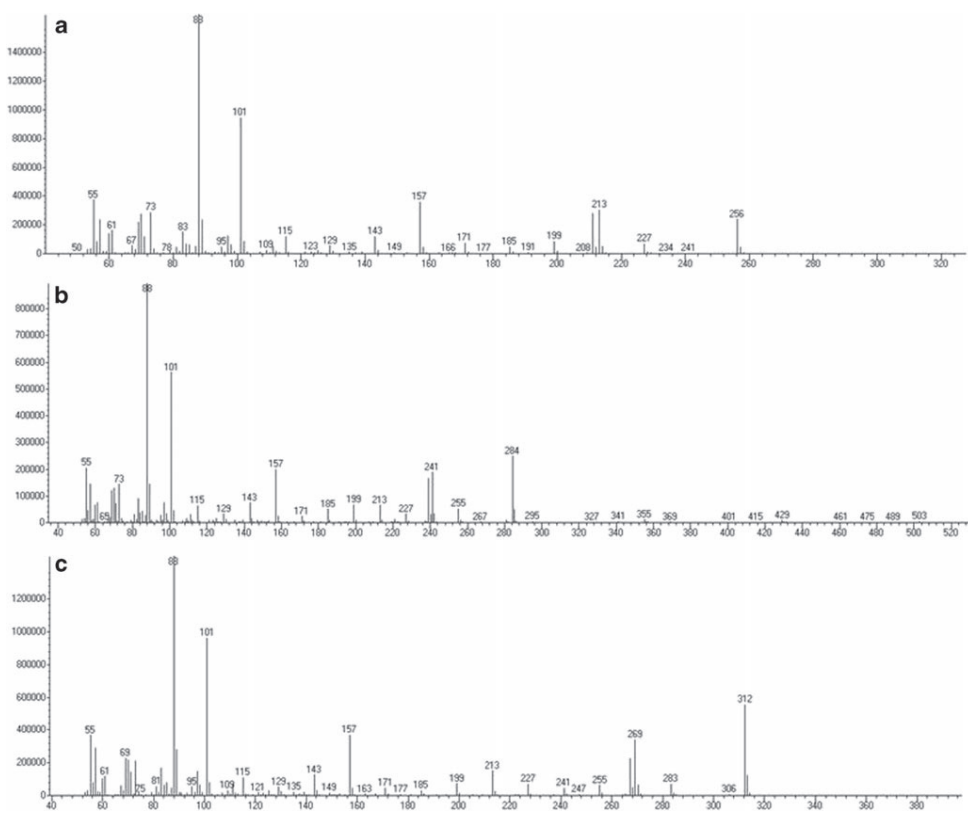


Fig. 2 a Ethyl myristate mass spectrum. b Ethyl palmitate mass spectrum. c Ethyl stearate mass spectrum

Table 1 Chromatographic characteristics of the compounds

	Retention times (min.)	<i>m/z</i> values
Ethyl myristate (E14)	7.61 (7.57)	<u>213 (218)</u> ; 256 (261)
Ethyl palmitate (E16)	10.0 (9.94)	<u>284 (289)</u> ; 241 (246)
Ethyl stearate (E18)	13.53 (13.46)	<u>312 (317)</u> ; 269 (274)

additives and medicines. Some FAEEs are also found in different types of olive oil [2]. Their presence was taken into account when calculating concentrations. A chromatogram obtained from unspiked meconium is shown in Fig. 3.

LOD and LOQ

The LOD and LOQ were determined by analyzing a series of meconium samples containing decreasing amounts of each FAEE. The LOD was defined as the concentration giving a signal-to-noise ratio >3. The LOQ was defined as the concentration giving a signal-to-noise ratio >10.

Linearity

Calibration curves for ethyl myristate, ethyl palmitate, and ethyl stearate were prepared six times for concentrations ranging between 0 and 5,000 ng g⁻¹ (0, 100, 1000, 2000, 3000, 4000, and 5000 ng g⁻¹ for ethyl myristate and ethyl palmitate; 0, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, and 5000 ng g⁻¹ for ethyl stearate) with known amounts of internal standard (50 µL solution, 10 µg mL⁻¹) in 500 mg meconium. The validation data are given in Electronic Supplementary Material Table S1.

Intra and inter-day study

Repeatability and reproducibility was determined by intra-day and inter-day replicate analyses. Meconium samples spiked with each analyte at low, medium, and high concentrations were analyzed five times within three days and five times within five days for the intra-day and inter-day

studies, respectively. The results obtained are shown in Electronic Supplementary Material Table S2.

According to international validation rules, relative mean error and C.V. should be less than 15 % except at the LLOQ, at which 20 % error is allowed [23].

Recovery

The recovery of an analyte is the detector response obtained from an amount of the analyte added to and extracted from the biological matrix, compared to the detector response obtained for the true concentration of the pure authentic standard [23].

The recovery of the method was examined by comparing the analytical results for extracted samples at three levels of concentration (high, medium, and low) five times within three days with unextracted standards that represent 100 % recovery. The results are shown in Electronic Supplementary Material Table S3.

Application to real samples

Finally, the developed method was used to analyze 81 meconium samples. It was found that thirty-one contained more than 600 ng g⁻¹, a value established as cut-off for prenatal exposure to alcohol. Because FAEEs may originate from endogenous ethanol or from ethanol traces contained in common foods, a cut-off value for the compounds in meconium had to be established [4]. Seven real cases were out the concentration range. It was difficult to obtain a completely accurate statement from the mothers regarding their consumption of alcohol. Table 2 shows information related to alcohol consumption and its effects on newborns

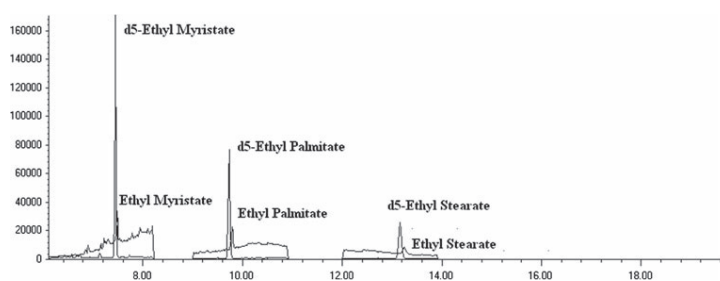
Fig. 3 Chromatogram obtained from unspiked meconium

Table 2 Clinic dates and concentration of FAEEs detected in meconium samples analyzed by MAE and GC–MS

ID	Clinic dates	Ethyl myristate (ng g ⁻¹)	Ethyl palmitate (ng g ⁻¹)	Ethyl stearate (ng g ⁻¹)	ΣFAEE (ng g ⁻¹)	Classification
1	Fibular agenesis syndrome	537.4	1,615	446.8	2,599	Positive
4	Premature birth	74.54	14.84	17.58	106.96	Negative
8	Premature birth	301.9	194.9	280.8	777.6	Positive
12	Jitteriness	2290	3,698	1078	7,066	Positive
15	Respiratory distress	78.95	140.0	67.87	286.8	Negative
17	Respiratory distress	956.7	5,044	2,806	8,806	Positive
28	Perinatal depression	137.8	559.2	220.0	917.0	Positive
40	IGR	136.9	361.5	244.9	743.3	Positive
44	Respiratory distress	268.9	334.3	164.9	768.1	Positive
56 ^a	ND	18,403	31,266	5,963	55,632	Positive
61	ND	22,458	23,029	9,863	55,350	Positive
64	IGR, premature birth and low weight	10,007	11,445	2,792	24,244	Positive
102	ND	1,617	13,751	4,631	19,999	Positive
109	ND	3,538	8,047	1,800	13,385	Positive

ND, no data available; IGR, intrauterine growth retardation

^a Occasional alcohol consumption

and the concentration of FAEEs (more real cases are included in Electronic Supplementary Material Table S4). Alcohol consumption was only recognized in three cases. Figure 4 shows a chromatogram obtained from a real case.

Discussion

Ethanol is among the most widely used teratogens worldwide. Meconium is a particularly complex matrix to analyze. Endogenous compounds present in this matrix cause interferences and require removal before chromatographic analysis [2]. FAEEs in meconium have been recommended as a useful indicator of alcohol exposure [11]. To support this an efficient, accurate, inexpensive, and rapid method is needed to detect and quantify FAEEs in meconium. This analytical method supports these requirements.

Traditionally, all methods were based on the method described by Bernhardt et al. [24]. This involves liquid–liquid and SPE extraction steps. In 2009, Hutson et al. [12] introduced a novel technique to quantify FAEEs in meconium by use of SPME. No evidence of use of MAE was found. Initially, FAEEs were detected and quantified by use of GC coupled to either flame-ionization detection (FID) or mass spectrometry (MS). The first method based on tandem mass spectrometry was published by Bearer et al. [1]. An LC–MS–MS method was developed by Pichini et al. in 2008 [14]. However, GC–MS is the technique most often used for determination of these compounds. Details of all these methods are summarized in Table 3.

The most reliable results are generally obtained by use of deuterated standards. Therefore, d₅-ethyl myristate, d₅-ethyl palmitate, and d₅-ethyl stearate were prepared from the corresponding carboxylic acids and d₆-ethanol, as explained

Fig. 4 Chromatogram obtained from a real case (ID 40)

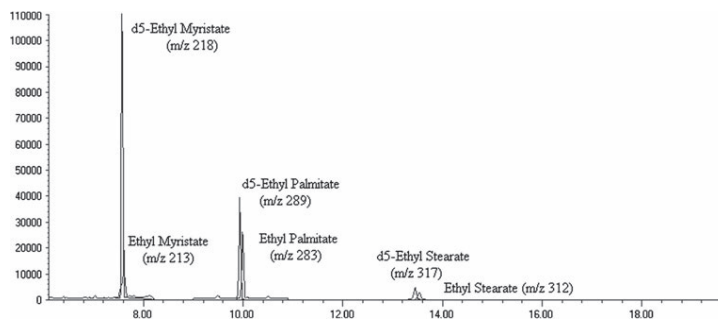


Table 3 Review of articles using meconium as biological matrix for ethyl myristate, ethyl palmitate, and ethyl stearate

Ref.	Meconium (g)	Extraction technique	Analytical method	LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)	Recovery (%)
[1]	–	–	GC-FID; GC-MS-MS	–	–	–
[10]	0.5	SPE	GC-FID	50	100	–
[16]	0.5–1	SPE	GC-MS	50	–	–
[14]	1	SPE	LC-MS-MS	12.8–15.6	46.1–51.2	55.4–95.6
[13]	1	SPE	LC-MS-MS	–	0.12–0.20 ^a	53.6–86.7
[9]	–	Liquid-liquid extraction	GC-FID; GC-MS	50	–	–
[12]	0.05	HS-SPME	GC-MS	0.05 ^a	0.13–0.14 ^a	–
[15]	0.5	SPE	LC-MS-MS	0.01–0.08 ^a	0.02–0.27 ^a	40–86
[5]	0.05	HS-SPME	GC-MS	15	50	–
[2]	0.1	HS-SPME	GC-MS	5–30	10–60	3.7–33.4
[8]	0.05	HS-SPME	GC-MS	15	–	–
[11]	0.5	Liquid-liquid extraction; HS-SPME	GC-MS	6.3–11.8	18.8–35.4	3.2–19.5
This method	0.5	MAE	GC-MS	50	100	50.06–95.81

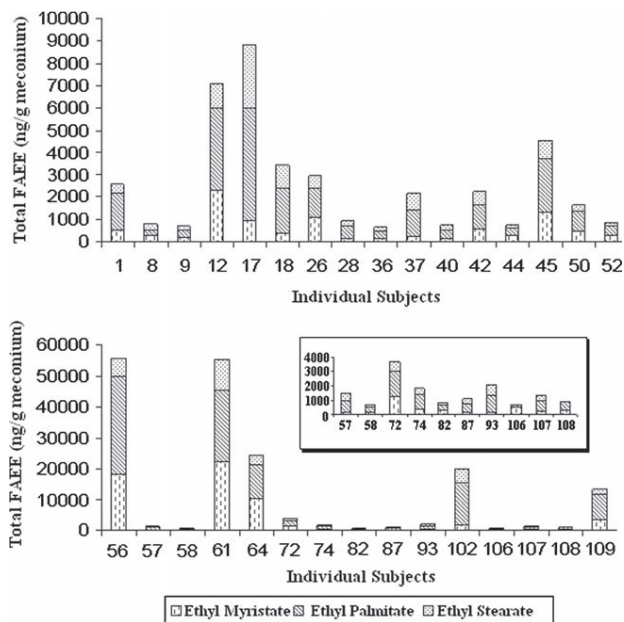
^aUnits: nmol g⁻¹

elsewhere [18]. Three FAEEs (ethyl myristate, ethyl palmitate, and ethyl stearate) only were studied, because unsatisfactory results were obtained for other esters.

The calibration plot was linear for FAEEs over the range 0–5000 ng g⁻¹. LOD and LOQ are higher than those obtained by other authors, but sensitivity is sufficient because

of the cut-off established at 600 ng g⁻¹. Precision and accuracy satisfactorily met internationally established acceptance criteria [23]. Recovery varied substantially, depending on which extraction method was used. It is apparent from Table 3 that recovery was lowest when HS-SPME was used. Recovery was better when SPE is used, and was similar to that obtained

Fig. 5 Distribution of the relative FAEE concentrations for different subjects in positive cases



by MAE, but the latter technique is faster. The small sample amount of 500 mg was particularly important, because less than 1 g was collected in many cases. The sample amount usually varies from 0.05 to 1 g, according to other authors (Table 3). However, 500 mg is the most commonly used amount.

In analysis of real samples, retention times and characteristic peak areas were used for identification of the esters. For quantification, only the 213 (218), 284 (289), and 312 (317) ions were used, the same as those used by other authors.

For interpretation, the sum of the concentrations of E14, E16, and E18 was used. The concentration of the individual esters is shown in Fig. 5 for positive cases. It can be seen that the ratio of the esters varies substantially from case to case. This confirms that the sum of the concentrations is more suitable for interpretation than one only [5]. The distribution of FAEEs was similar to that obtained by other authors. The values ranged from 0 to 55,632 ng g⁻¹ with seven outliers from approximately 7,000 to 55,600 (cases 12, 17, 56, 61, 64, 102, and 109, only one of whom admitted alcohol consumption). This range can be compared with that in the literature; real cases up to similar quantities have been detected [2, 8, 11]. The concentration was below the cut-off of 600 ng g⁻¹ for 51 cases (63 %). Seven of the thirty positive cases (8.6 %) had concentrations above 5,000 ng g⁻¹. In two positive samples, E18 was not detected (ID 106 and 108), as was also found by Roehsig et al. In agreement with literature data [1, 5, 10], E 16 was found to be the most frequent ethyl ester with the highest concentration. However, ethyl myristate has also been reported as being the second most predominant FAEE in positive samples. Moore et al. [16] also concluded from their results that a sum of FAEE concentrations above 10,000 ng g⁻¹ may indicate that the newborn has been exposed to significant amounts of alcohol during gestation. E14 was the most prevalent FAEEs detected in negative samples.

Conclusion

This proposed method for monitoring FAEEs in meconium by MAE–GC–MS analysis proved to be sufficiently sensitive for identification of FAEEs in all samples. Special care must be taken with endogenous formation of these compounds.

Our results demonstrated that MAE is well suited to determination of different FAEEs in meconium samples. Microwave energy expedites extraction of the analyte while increasing its recovery compared with HS-SPME. Because the technique uses standard laboratory equipment, it can be an effective method compared with potential alternatives, for example liquid–liquid extraction and solid-phase microextraction. GC–MS was found to be specific, sensitive, and

selective enough for determining the low analyte concentrations to be expected in meconium.

We also concluded that FAEEs can be analyzed in meconium by using a relatively small sample by a simple and reliable procedure. It was also confirmed that the sum of the concentrations of three FAEEs is more appropriate for interpretation than any of the esters alone. Some authors have concluded that use of FAEE levels alone does not seem to be an acceptable strategy in the absence of other data to corroborate such exposure. Combined use of FAEEs with other markers of alcohol consumption is suggested for better estimation of the extent of alcohol consumption and to avoid false positive and false negative results [4–6, 15, 25–29]. A cutoff of 600 ng g⁻¹ was regarded as appropriate on the basis of previous studies. In our study we concluded that ethyl palmitate is the most abundant FAEE when alcohol consumption is encountered.

References

1. Bearer CF, Jacobson JL, Jacobson SW, Barr D, Croxford J, Molteno CD, Viljoen DL, Marais AS, Chiodo LM, Cwik AS (2003) Validation of a new biomarker of fetal exposure to alcohol. *J Pediatr* 143:463–469
2. Roehsig M, Mendes de Louzada D, Moura S, Albuquerque EM, Yonamine M (2010) Determination of eight fatty acid ethyl esters in meconium samples by headspace solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J Sep Sci* 33:2115–2122
3. González-Illán F, Ojeda G, Díaz Liz M, Rosario O (2011) Detection of fatty acid ethyl esters in skin surface lipids as biomarkers of ethanol consumption in alcoholics, social drinkers, light drinkers and teetotalers using a methodology based on microwave-assisted extraction followed by solid-phase microextraction as gas chromatography–mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 35:232–237
4. Joya X, Friguls B (2012). Determination of maternal-fetal biomarkers of prenatal exposure to ethanol: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. In press
5. Bakdash A, Burger P, Goecke T, Fasching P, Reulbach U, Bleich S, Hastedt M, Rothe M, Beckmann M, Pragst F, Kornhuber J (2010) Quantification of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in meconium from newborns for detection of alcohol abuse in a maternal health evaluation study. *Anal Bioanal Chem* 396:2469–2477
6. Pichini S, Marchei E, Vagnarelli F, Tarani L, Raimondi F, Maffucci R, Sacher B, Biscaglia M, Rapisardi G, Elicio MR, Biban P, Zuccaro P, Pacifici R, Pierantozzi A, Morini L (2011) Assessment of prenatal exposure to ethanol by meconium analysis: Results of an Italian multicenter study. *Alcohol Clin Exp Res* 36(3):417–424
7. Shor S, Nulman I, Kulaga V, Koren G (2010) Heavy in utero ethanol exposure is associated with the use of other drugs of abuse in a high-risk population. *Alcohol* 44:623–627
8. Goh Y, Hutson J, Lum L, Roukema H, Gareri J, Lynn H, Koren G (2010) Rates of fetal alcohol exposure among newborns in a high-risk obstetric unit. *Alcohol* 44:629–634
9. Gareri J, Lynn H, Handley M, Rao C, Koren G (2008) Prevalence of fetal ethanol exposure in a regional population based sample by meconium analysis of fatty acid ethyl esters. *Ther Drug Monit* 30 (2):239–245
10. Chan D, Bar-Oz B, Pellerin B, Paciorek C, Klein J, Kapur B, Farine D, Koren G (2003) Population baseline of meconium fatty

- acid ethyl esters among infants of nondrinking women in Jerusalem and Toronto. *Ther Drug Monit* 25:271–278
11. Hutson J, Rao C, Fulga N, Aleksa K, Koren G (2011) An improved method for rapidly quantifying fatty acid ethyl esters in meconium suitable for prenatal alcohol screening. *Alcohol* 45:193–199
 12. Hutson JR, Aleksa K, Pragst F, Koren G (2009) Detection and quantification of fatty acid ethyl esters in meconium by headspace solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr B* 877:8–12
 13. García-Algar O, Kulaga V, Gareri J, Koren G, Vall O, Zuccaro P, Pacifici R, Pichini S (2008) Alarming prevalence of fetal alcohol exposure in a Mediterranean city. *Ther Drug Monit* 30(2):249–254
 14. Pichini S, Pellegrini M, Gareri J, Koren G, García-Algar O, Vall O, Vagnarelli F, Zuccaro P, Marchei E (2008) Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for fatty acid ethyl esters in meconium: Assessment of prenatal exposure to alcohol in two European cohorts. *J Pharm Biomed Anal* 48:927–933
 15. Kwak H, Kang Y, Han K, Moon J, Chung Y, Choi J, Han J, Kim M, Armenta E, Ocampo A (2010) Quantitation of fatty acid ethyl esters in human meconium by an improved liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chrom B* 878:1871–1874
 16. Moore C, Jones J, Lewis D, Buchi K (2003) Prevalence of fatty acid ethyl esters in meconium specimens. *Clin Chem* 49(1):133–136
 17. Álvarez I, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P, Cabarcos P, López P (2009) Microwave-assisted extraction: a simpler and faster method for the determination of ethyl glucuronide in hair by gas chromatography–mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 393:1345–1350
 18. Cabarcos P, Álvarez I, Bermejo AM, Tabernero MJ, López P, Fernández P (2009) Analysis of fatty acid ethyl esters in hair by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). *Anal Lett* 42:2962–2977
 19. Pragst F, Auwärter V, Sporkert F, Spiegel K (2001) Analysis of fatty acid ethyl esters in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). *For Sci Int* 121:76–88
 20. Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S (2007) Microwave assisted extraction- An innovative and promising extraction tool for medical plant research. *Phcog Rev* 1(1):7–18
 21. Fernández P, Vázquez C, Lorenzo RA, Carro AM, Álvarez I, Cabarcos P (2010) Experimental design for optimization of microwave-assisted extraction of benzodiazepines in human plasma. *Anal Bioanal Chem* 397:677–685
 22. Álvarez I, Bermejo AM, Cid P, Tabernero MJ, Fernández P, López P (2008) Microwave-assisted extraction for the determination of ethyl glucuronide in urine by gas chromatography–mass spectrometry. *J Appl Toxicol* 28:773–778
 23. Food and Drug Administration. 2001. U.S. Department of Health and Human Services, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. FDA [Available on line at URL: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>] (Accessed January 2012)
 24. Bernhardt TG, Cannistraro PA, Bird DA, Doyle KM, Laposata M (1996) Purification of fatty acid ethyl esters by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 675:189–196
 25. Gareri J, Appenzeller B, Walasek P (2011) Impact of hair-care products on FAEE hair concentrations in substance abuse monitoring. *Anal Bioanal Chem* 400:183–188
 26. Suesse S, Pragst F, Mieczkowski T, Selavka CM, Elian A, Sachs H, Hastedt M, Rothe M, Campbell J (2011). Practical experiences in application of hair fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide for detection of chronic alcohol abuse in forensic cases. *Forensic Sci Int*. In press
 27. Pragst F, Rothe M, Moench B, Hastedt M, Herre S, Simmert D (2010) Combined use of fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide in hair for diagnosis of alcohol abuse: Interpretation and advantages. *For Sci Int* 196:101–110
 28. Albermann M, Musshoff F, Madea B (2010) Comparison of ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEEs) concentrations in hair for testing abstinence. *Anal Bioanal Chem* 400(1):175–181
 29. Burd L, Hofer R (2008) Biomarkers for detection of prenatal alcohol exposure: A critical review of fatty acid ethyl esters in meconium. *Birth Defect Res (Part A)* 82:487–493



Application of dispersive liquid-liquid
microextraction for the determination of
phosphatidylethanol in blood by liquid
chromatography tandem mass
spectrometry

Cabarcos P; Cocho JA; Moreda A; Míguez M; Tabernero MJ;
Fernández P; Bermejo AM

El consumo crónico de alcohol conlleva implicaciones médicas importantes debido a sus efectos tóxicos. Por este motivo, es necesario el uso de marcadores biológicos que ayuden a demostrar el consumo abusivo de esta sustancia.

Se ha estudiado el PEth, fosfolípido que requiere para su formación metabólica la presencia de etanol en grandes cantidades. Por ello, se puede decir que la presencia de este metabolito es indicativa de un fuerte consumo de alcohol.

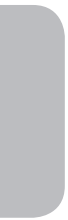
Existen más de 20 especies de PEth en sangre total; sin embargo, la 16:0/18:1 y la 16:0/18:2 son las predominantes en los bebedores abusivos. Su vida media es de aproximadamente 7 días. Si se trata de consumo crónico de alcohol se pueden encontrar concentraciones altas de PEth en sangre hasta después de 29 días.

Para la extracción de PEth se ha empleado la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME); principal novedad del método creado. Se trata de una técnica rápida, de bajo coste, con altas recuperaciones y con menor impacto medioambiental.

El método cromatográfico empleado ha sido la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS).

Después de realizar la validación analítica siguiendo las recomendaciones de la FDA, el método se ha aplicado a 50 casos reales de sangre. Los resultados obtenidos muestran un 56% de casos positivos frente a un 44% de casos negativos. Estos datos han sido contrastados con los resultados obtenidos mediante el análisis de la molécula de etanol en los 50 casos reales empleando la técnica de GC-FID, análisis rutinario en nuestro laboratorio. Hemos encontrado una correlación de los datos entre sí, como se

ha podido ver en la tabla de concentraciones presente en el artículo publicado, excepto para dos casos. En ellos, la concentración de PEth ha resultado negativa frente a una concentración positiva de etanol. Hay que señalar que las muestras de sangre utilizadas para las dos determinaciones han sido las mismas en todos los casos: la utilidad del PEth viene dada por su mayor ventana de detección, y podría ser detectado muchos días después de la eliminación de etanol en sangre, pero no se ha dispuesto de esta segunda muestra de cada uno de los casos para poder realizar el análisis y comparar en el segundo momento el porcentaje de positivos a etanol y a PEth.





Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of phosphatidylethanol in blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry

Pamela Cabarcos^{a,*}, José Ángel Cocho^c, Antonio Moreda^b, Martha Míguez^b, María Jesús Tabernero^a, Purificación Fernández^a, Ana María Bermejo^a

^a Instituto de Ciencias Forenses, Servicio de Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, C/San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain

^b Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, Avenida de las Ciencias s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain

^c Laboratorio de Metabolopatías, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, C/Choupana s/n, 15706 Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 December 2012

Received in revised form

26 February 2013

Accepted 2 March 2013

Available online 16 March 2013

Keywords:

Phosphatidylethanol

Phosphatidylbutanol

LC-MS/MS

Electrospray ionization

Dispersive liquid liquid microextraction

ABSTRACT

Phosphatidylethanol (PEth) is a phospholipid which requires for its metabolic formation the presence of relatively high ethanol levels. PEth is thus a promising marker to quantify ethanol abuse. Dispersive liquid–liquid microextraction has become a popular technique because it is fast, inexpensive, easy to operate and consumes low volume of organic solvent. In this method, the appropriate mixture of extraction solvent (230 μ L dichloromethane) and disperser solvent (630 μ L acetone) are injected into the sample by syringe, rapidly. The liquid chromatography method using a reversed phase-C8 column and a negative ion mode electrospray ionization tandem mass spectrometry detection instrument was developed for the determination of small amounts of PEth that might be present in blood samples, using phosphatidylbutanol (PBut) as an internal standard. The sensitivity of detection obtained with tandem MS was better than that of previous methods. Good linearity was obtained for a range of LOQ–10 μ g/mL for PEth, whereas all of the deviations in precision and accuracy were less than 15% except for the LLOQ, where it should not exceed 20%. A set of 50 blood samples were analyzed by such method and whole blood concentrations of PEth 16:0/18:1 ranged from LLOQ to 1.71 μ g/mL.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Heavy drinking constitutes a significant problem in our societies as alcohol is the most popular legal drug used in our times [1,2]. Its chronic consumption is a known cause of many medical conditions due to the toxic effects of ethanol or its metabolism [3]. In addition, chronic heavy drinking during pregnancy often leads to the appearance of the fetal alcohol syndrome (FAS), the most well-known consequence of FASD (Fetal alcohol spectrum disorders). It is characterized by facial dysmorphism, reduced growth, neurological deficit, mental disorders, development disabilities and mental retardation [4,5]. Because of these reasons, the availability of reliable biological markers of ethanol consumption becomes an extremely important issue in both clinical and forensic settings to prove recent use of ethanol and/or chronic heavy drinking. It includes markers of alcohol related toxic effects, such as mean corpuscular volume (MCV) and gamma-glutamyltransferase (gGT); indirect markers, such as carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and 5-hydroxytryptophol

(5-HTOL); and direct markers, including blood ethanol itself, as well as alcohol derivatives such as fatty acid ethyl esters (FAEE), ethyl glucuronide (EtG), ethyl sulfate (EtS), and phosphatidylethanol (PEth) [6].

The blood biomarker PEth is a phospholipid formed from phosphatidylcholine (PC) in cell membranes by a transphosphatidyl transfer reaction catalyzed by phospholipase D (PLD) only in the presence of ethanol. Phospholipase D normally hydrolyzes PC into phosphatidic acid (PA) and choline, but because the affinity for ethanol is 1000 fold higher than for water, PEth is formed at the expense of PA when ethanol is present. The reaction is shown in Fig. 1 [2,7]. From the standpoint of the chemical structure, PEth is not a single molecule but a group of phospholipids with a common polar phosphoethanol head group onto which two fatty acid moieties are attached at positions sn-1 and sn-2. There exist many combinations of chain lengths with different numbers of double bonds leading as a result a large number of PEth molecular species; typically with a chain lengths of 16, 18 or 20 carbons. Phosphatidylethanol 16:0/18:1 (nomenclature for fatty acids = :[number of double bonds]) and 16:0/18:2 are the major fatty acid combinations in PC extracted from human erythrocyte membranes [8]. Recently published literature has shown the several molecular species of PEth

* Corresponding author. Tel.: +34 881812450.

E-mail address: pamela.cabarcos@usc.es (P. Cabarcos).

exist in blood samples drawn from alcohol-dependent subjects [6]. It is measurable up to 15–20 days after last intake of alcohol in heavy drinkers according to Joya et al. [2]. The mean half life is about 4 days due to its slow degradation rate [1]. For all these reasons, it has been suggested that PEth could potentially be used as a marker of ethanol use [4,9]. Nevertheless, special care must be taken because the PLD enzyme is active at temperatures as low as -20°C employed for storage purposes and consequently, PEth may be generated post-sampling if ethanol is present, potentially leading to false indications of prior heavy drinking [6]. The chemical structures of PEth and PBut and its possible structures on the monitored fragments are shown in Fig. 2.

Over the past few decades, different analytical techniques have been used to detect and quantify total PEth in biological matrices: thin layer chromatography (TLC), capillary electrophoresis, non-aqueous capillary electrophoresis (NACE) coupled to UV-detection, liquid chromatography (LC) coupled with an evaporative light-scattering detector (ELSD) or, more recently, LC electrospray ionization (ESI) mass spectrometry or multiple mass spectrometry (LC-MS and LC-MS/MS) [6].

The novelty of the method consists of using dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), introduced by Assadi and co-workers in 2006 [10], as the extraction method. It is a simple and fast microextraction technique based on the use of an appropriate extractant (an organic solvent with high density) and a disperser solvent with high miscibility in both extractant

and aqueous phases. DLLME consists of two steps: (1) Injection of an appropriate mixture of extracting and disperser solvents into aqueous sample, containing the analytes. In this step, the extracting solvent is dispersed into the aqueous sample as very fine droplets and the analytes are enriched into it. After the formation of cloudy solution, the surface area between the extracting solvent and the aqueous sample becomes very large, so the equilibrium state is quickly attained and, therefore, the extraction time is very short. In fact, this is the principal advantage of this method. (2) Centrifugation of cloudy solution. After that, a sedimented phase is settled in the bottom of a conical tube. Other advantages include simplicity of operation, rapidity, low cost, high recovery, high enrichment factor and environmental benignity [11].

The aim of this study was to develop a liquid chromatography mass spectrometry method for the determination and quantification of PEth in blood using dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) as a new extraction method. The method was then applied to blood samples collected from heavy and social drinkers and makes it practical for routine laboratory use.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Phosphatidylethanol (16:0/18:1; 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanol; 98% purity; $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$) and Phosphatidylbutanol (1-O-palmitoyl-2-O-oleoyl-sn-3-phosphobutanol; 98% purity; $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$), used as internal standard, were purchased from Enzo Life Sciences (ELS AG (Switzerland)). Stock solutions were prepared in chloroform. Working solutions were prepared by dilution in mobile phase. All other chemicals were of HPLC-grade from Merck (Barcelona, Spain). Deionized water was obtained using a Millipore system Direct-Q3.

2.2. Blood samples

The blood specimens used for method development were obtained from clinical samples sent to our department for testing alcohol by GC-FID. Blank specimens used to develop and validate

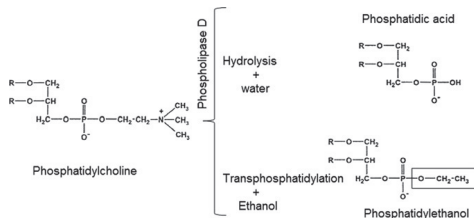


Fig. 1. Schematic figure of the formation of PEth via transphosphatidylatation catalyzed by phospholipase D.

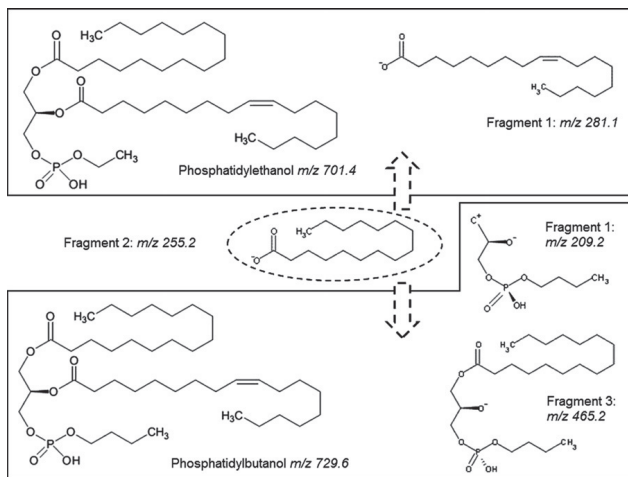


Fig. 2. Chemical structures of PEth and PBut.

the method were obtained from clinical samples but they were previously analyzed by GC-FID. A pool of negative blood analyzed by GC-FID was done and it was previously analyzed by this new method to confirm the negative results. The samples were collected in EDTA tubes and stored at 4 °C before analysis.

2.3. Sample preparation

Aliquots of 0.2 mL whole blood were used for analysis, spiked with PBut (50 µL Sol. 2 µg/mL). Methanol (950 µL) was added and the precipitation was removed by centrifugation (10 min). Then, it was diluted with water (1.4 mL) and a dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) was the following step. After an experimental design using StatGraphics, the best conditions were as follows: 630 µL of acetone (as disperser solvent) containing 230 µL of dichloromethane (as extracting solvent) was rapidly injected into sample and the mixture was gently shaken. Then, the mixture was centrifuged and the droplet formed was collected by a 100 µL syringe and transferred to a 8 mL glass vial. The organic solvent was evaporated under a stream of nitrogen in a heated aluminum block at 40 °C. The dried residue was redissolved with 100 µL of mobile phase (90% A–10% B) prior to injection of a 20 µL aliquot into the LC-MS/MS system.

2.4. Instrumentation

The LC tandem-MS system was an Agilent 1200 series (Agilent; Madrid; Spain) connected to Sciex API 4000 with the ESI interface operated in negative ion mode and Analyst 1.4.2 software (Applied Biosystems; Madrid, Spain). Data were acquired in the multiple reaction monitoring (MRM) mode: PEth-16:0/18:1 (*m/z* 701.4–255.2 and 281.1) and PBut (729.6–209.2, 255.3 and 465.2) (Table 1). The transitions marked with asterisk were used for quantification. For all the scans, the following conditions were set: collision gas 10 psi, curtain gas 10 psi, nebulizer gas 30 psi, auxiliary gas 60 psi, ion spray voltage –4500 V, temperature 450 °C, declustering potential –100 V, entrance potential –10 V, collision energy –50 V and collision cell exit potential –6 V (for list of parameters, see Table 1). Separation was performed by a Zorbax Eclipse XDB-C8 (2.1 × 50 mm; 3.5 µm; Agilent) maintained at 30 °C. LC system was operated in gradient mode with solvent A being 20% 2 mM ammonium acetate pH 7 and 80% acetonitrile and solvent B 100% isopropanol. From sample injection until 1 min, isocratic elution with 90% A and 10% B was used; from 1–3 min, a linear gradient to 50% A; from 3–5 min, a linear gradient to 100% B; from 5–6.5 min, a linear gradient back to 90% A and from 6.5–8.5 min, 90% A. The total flow rate was set to 0.3 mL/min and the sample injection volume, 20 µL.

Table 1

Mass spectrometric parameters for the LC-ESI-MS/MS method for quantitative and qualitative measurement of PEth in blood. Analysis was performed using ESI in negative ion mode [M–H][–]. List of the MRM parameters.

	Precursor ion, [m/z]	Daughter ion, [m/z]	Declustering potential [V]	Collision energy [eV]	Entrance potential [V]	Collision cell exit potential [V]	Retention time (min)
PEth 16:0/18:1	701.4	255.2	–100	–50	–10	–6	2.5
		281.1*	–100	–40	–15	–6	
PBut 16:0/18:1	729.6	209.2	–100	–50	–10	–3	3.1
		255.3*	–100	–50	–15	–10	
		465.2	–90	–40	–10	–10	

Mass spectrometric parameters for the LC-ESI-MS/MS method for quantitative and qualitative measurement of PEth in blood. Analysis was performed using ESI in negative ion mode [M–H][–]. List of the MRM parameters.

3. Results

3.1. Validation procedure

Validation was achieved according to the FDA Guideline for bioanalytical method validation [12]. The suitability of the method for quantitative analysis was studied by testing selectivity, linearity and sensitivity, precision and accuracy, process efficiency, matrix effect and recovery.

3.1.1. Selectivity

Selectivity is the ability of an analytical method to differentiate and quantify the analyte in the presence of other components in the sample. Potential interfering substances in a biological matrix include endogenous matrix components, metabolites, decomposition products and medication and other exogenous xenobiotics [12].

The selectivity was estimated by analyzing blood samples (*n* = 6) collected from different tetrastaters. No interfering peaks were found at the retention time for PEth and PBut.

3.1.2. Linearity

The calibration curve was created using a blank sample and spiked samples with PEth at concentration of 0.03, 0.5, 1, 2, 5, 7 and 10 µg/mL. All standard samples were spiked with internal standard (2 µg/mL). The curve was obtained by fitting the ratio of the peak areas of PEth 16:0/18:1 to that of IS versus concentrations. A linear response was observed in the range 0–10 µg/mL with a good correlation coefficient (0.998).

The LOD, defined as the lowest concentration giving a response of at least three times relationship S/N, was 0.01 µg/mL. The lowest standard on the calibration curve, LLOQ, should be accepted as the limit of quantification if the analyte response is at least 10 times the response compared to blank response. Moreover, analyte peak should be identifiable, discrete and reproducible with a precision of 20% and accuracy of 80–120% [12]. It was 0.03 µg/mL.

3.1.3. Precision and accuracy

The accuracy of an analytical method describes the closeness of mean test results obtained by the method to the true value (concentration) of the analyte. It is determined by replicate analysis

Table 2
Intra and inter day-assay.

Spiked amount of PEth	0.03 µg/mL		0.5 µg/mL		5 µg/mL	
	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
CV	16.12	18.21	10.95	14.45	11.89	8.56
Relative error	3.82	5.43	8.53	6.27	0.02	2.42

Intra and inter day-assay.

of samples containing known amounts of the analyte. Accuracy should be measured using a minimum of five determinations per concentration. A minimum of three concentrations in the range of expected concentrations is recommended. The mean value should be within 15% of the actual value except at LLOQ, where it should not deviate by more than 20%.

The precision of an analytical method describes the closeness of individual measures of an analyte when the procedure is applied repeatedly to multiple aliquots of a single homogeneous volume of biological matrix. Precision should be measured using a minimum of five determinations per concentration. A minimum of three concentrations in the range of expected concentrations is

Table 3
Matrix effect (ME), Recovery (RE) and Process Efficiency (PE) data for PEth (1) and PBut (2).

Concentration [$\mu\text{g/mL}$]	Mean peak area						ME [%]		RE [%]		PE [%]	
	1			2								
	Set 1	Set 2	Set 3	Set 1	Set 2	Set 3	1	2	1	2	1	2
0.5	4.44E+07	1.34E+07	6.22E+06	2.10E+07	4.85E+06	3.60E+06	30.22	23.09	66.38	74.16	14.02	17.13
5	1.44E+08	1.13E+08	4.92E+07	1.74E+07	1.01E+07	3.54E+06	78.42	57.67	73.54	75.18	34.14	20.29

Matrix effect (ME), Recovery (RE) and Process Efficiency (PE) data for PEth (1) and PBut (2).

Table 4
Subjects characteristics ($n=50$).

Subjects	Gender	Age	Alcohol intake	PEth [$\mu\text{g/mL}$]	Ethanol concentration GC-FID [g/L]
1	M	21	–	0.08	0.69 (B); 1.16 (U)
2	M	47	Alcoholic	1.71	3.64 (B); 4.38 (U)
3	M	42	–	1.12	4.34 (B); 6.43 (U)
4	M	53	Alcoholic	Traces	3.00 (B); 2.42 (U)
5	F	38	Alcoholic	1.1	4.57 (B); 4.57 (U)
6	M	50	–	0.28	2.32 (B); 2.58 (U)
7	M	57	Possible alcohol dependence	0.82	1.60 (B); 1.84 (VH)
8	M	26	–	0.63	1.08 (B); 1.46 (U)
9	M	76	–	0.9	2.75 (B); 2.94 (VH)
10	M	61	–	0.43	2.18 (B); 2.78 (U)
11	M	66	Possible alcohol dependence	0.13	2.88 (B); 3.25 (VH)
12	M	52	–	0.68	3.21 (B); 4.20 (U); 3.78 (VH)
13	M	61	–	0.36	3.27 (B); 3.33 (VH)
14	M	66	–	0.39	1.12 (B); 1.33 (U); 1.22 (VH)
15	M	51	Teetotalers	0	NEG
16	M	74	Alcoholic	0.06	NEG
17	F	47	Teetotalers	Traces	NEG
18	M	56	Alcoholic	0.42	NEG
19	M	44	–	0.51	3.8 (B); 4.33 (VH)
20	F	51	Teetotalers	0	NEG
21	M	53	–	0.16	1.81 (B); 2.31 (U)
22	M	58	–	0.09	NEG
23	M	70	Teetotalers	0	NEG
24	M	66	–	0.08	NEG
25	M	35	–	0.03	NEG
26	F	53	–	0.06	1.28 (B)
27	M	82	–	0	NEG
28	F	82	–	0	NEG
29	M	58	–	Traces	NEG
30	F	61	Possible alcohol dependence	0.07	NEG
31	F	75	–	Traces	NEG
32	M	50	–	0	0.18 (B)
33	F	62	–	Traces	NEG
34	F	69	–	Traces	NEG
35	M	57	–	Traces	0.14 (B); 0.32 (U)
36	M	64	–	Traces	0.79 (B); 0.86 (U)
37	F	54	–	Traces	NEG
38	M	47	–	0.23	NEG
39	F	72	–	0	NEG
40	M	53	–	Traces	NEG
41	M	54	–	0.05	NEG
42	M	61	–	Traces	0.19 (B)
43	M	55	–	0.05	2.9 (B); 2.95 (U); 3.1 (VH)
44	M	67	–	Traces	NEG
45	M	27	–	0.05	0.63 (B)
46	M	76	–	0	NEG
47	M	61	–	0.05	NEG
48	M	49	–	0.06	1.86 (B); 2.04 (VH)
49	M	60	–	0.81	2.86 (B); 2.91 (VH)
50	M	–	–	Traces	NEG

Subjects characteristics ($n=50$; B: blood; U: urine; VH: vitreous humor).

recommended. The precision determined at each concentration level should not exceed 15% of the coefficient of variation (CV) except for the LLOQ, where it should not exceed 20% of the CV [12].

Intra-day and inter-day assay was evaluated by performing repeated injections ($n=5$) of the same sample at three concentrations (0.03, 0.5 and 10 $\mu\text{g/mL}$) in the same day and on five different days respectively. Data presented in Table 2 satisfy the international validation rules. The CV and relative error are less than 15% (14.45 and 8.53% are the highest values, respectively), except for at the LLOQ where they are within the accepted 20% of deviation (18.21 and 5.43% are the highest values for CV and relative error, respectively).

3.1.4. Process efficiency, matrix effect and recovery

Three sets of two concentrations and repeated three times at each concentration (it is represented its average in the table) were prepared to evaluate the recovery, process efficiency and the absence or presence of matrix effect as described Matuszewski et al. [13]. The first set was prepared to evaluate the MS/MS response for neat standards of two analytes (PEth and PBut) injected in the mobile phase. The second set (set 2) was prepared in blood extracts spiked after extractions. The third set (set 3) was prepared in blood samples but spiked before extraction. The results of the analyses for sets 1–3 are summarized in Table 3.

The results obtained in this manner allow determination of the matrix effect (ME), recovery (RE) of the extraction procedure and process efficiency (PE) by comparing the absolute peak areas for PEth and PBut obtained in sets 1–3 (Table 3). Peak areas obtained in neat solutions standards in set 1 are depicted as A, the corresponding peak areas for standards spiked after extraction into blood samples as B (set 2), and peak areas for standards spiked before extraction as C (set 3). The ME, RE and PE values can be calculated according to Eq. (1)–(3) [13].

$$ME(\%) = B/A \times 100 \quad (1)$$

$$RE(\%) = C/B \times 100 \quad (2)$$

$$PE(\%) = C/A \times 100 = (ME \times RE) \times 100 \quad (3)$$

3.2. Application to real samples

The capabilities of the proposed method of identifying and quantifying PEth, a marker of alcohol, was tested on blood samples collected from clinical samples. Some information is described in Table 4. It can be seen that fifty blood samples were applied to the method and all of them were previously analyzed by GC-FID for the determination of ethyl alcohol. Following this technique, we found samples 1–14; 19; 21; 26; 36; 43; 45; 48 and 49 with positive results. It agrees with our results except for samples 4 and 36 that we found them as negative. Information about alcohol consumption is not easy to obtain, but we know that samples 2, 4, 5, 16 and 18 belong to alcoholic people, as can be supported by our results. Positive results obtained by HPLC-MS/MS ranges between 0.046 to 1.706 $\mu\text{g/mL}$ (higher than 0.03 $\mu\text{g/mL}$; a value established as cut-off). It is shown a bar chart in Fig. 3 from these values. A chromatogram of real case number 7 is showed below (Fig. 4).

4. Discussion

Biological markers of ethanol consumption are widely used and are needed in a number of situations where alcohol abuse may occur and should be avoided. Detection in medical practises, during treatment of recovering alcoholics, during pregnancy and also for forensic purposes are examples of such situations. PEth has a mean half-life of about four days in blood of alcoholics, and it was still measurable after up to 2–3 weeks of sobriety. Because of its high specificity and slow elimination it has been proposed as a marker for alcohol abuse [2,14–17].

Traditionally, the most used analytical method was HPLC-ELSD but HPLC-MS or tandem spectrometry were used since 2009. This caused lower LOD and LOQ and better recoveries; for instance, 33% from Gnann et al. [18] versus Nalesso or Faller et al. [6,19]. It is a common practise to determine the recovery of a compound extracted from a matrix by comparing the response of a compound spiked into a biological sample, extracted, reconstituted in a solvent and injected with the corresponding peak areas of the same compound injected directly in the same solvent. It would be equivalent to the recovery

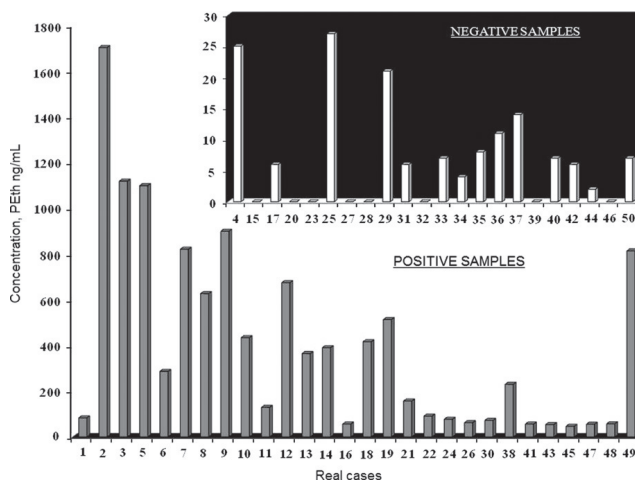


Fig. 3. Bar chart from real cases.

being determined as Eq. (3). However, this practise may not be correct since it does not take into account the matrix effect that may greatly influence this ratio. Eq. 3 (PE) may be instead considered as the overall process efficiency [13]. LOD and LOQ were improved highly; from 1998 until 2009 we can found these values much higher than nowadays. At present, it ranges between 0.017 and 0.054 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for LOD and LOQ respectively except for those values found by Nalesso

et al. (0.0005 and 0.001 μM) [6], which were quite different from the others values. Range of concentrations show differences in all these reviewed years. In this case, the higher point chosen for the calibration curve was 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ as it is in accordance with values showed in earlier reports. All these data can be seen in Table 5 [20–30].

The mean absolute matrix effect, calculated according to Eq. (1) was 30.22 and 23.09 (for a concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 78.42

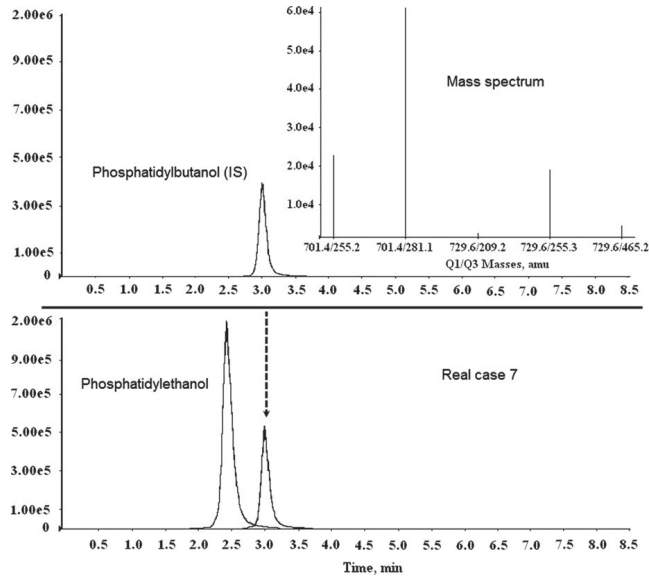


Fig. 4. Chromatogram of a blank sample and a real case.

Table 5

Review of articles using blood as biological matrix for PETH.

Ref.	Blood (mL)	Extraction technique	Analytical method	LOD [μM]	LOQ [μM]	Range of concentrations [μM]	Recovery (%)	Real cases [μM]
Nalesso A. 2011	0.3	LLE	LC-MS/MS	0.0005	0.001	0.001–2.0	80	–
Faller A. 2011	0.1	LLE	LC-MS/MS	0.02*	0.08*	0.05–5*	68.9 90.7	0.92–213*
Zheng Y. 2011	0.1	LLE	LC-MS/MS	0.009	0.1	0.05–2.48	–	LOD-18.7
Stewart S. 2010	1	LLE	LC-MS/MS	–	0.02*	–	–	–
Gnann H. 2010	0.3	LLE	LC-MS/MS	0.04	–	–	–	–
Nalesso A. 2010	0.3	LLE	NACE-ESI-MS	0.1	0.4	0.4–10	–	–
Stewart S. 2009	10	–	LC-MS/MS	–	0.02*	–	–	–
Helander A. 2009	0.1	LLE	LC-MS	< 0.02	< 0.1	0.2–20.0	–	0.1–21.7
Gnann H. 2009	0.3	LLE	LC-MS/MS	0.02*	0.05*	0.02–2*	33	–
Comasco E. 2009	–	–	–	–	0.25	–	–	–
Marques P. 2009	–	–	–	–	0.22	–	–	–
Kip M.J. 2008	–	–	HPPLC-ELSD	–	0.22	–	–	–
Bendroth P. 2008	–	–	HPPLC-ELSD	–	0.22	–	–	0.33–19
Varga A. 2008	0.3	LLE	NACE-UV	0.4	–	0–10	–	–
Aradottir S. 2006	0.3	LLE	HPPLC-ELSD	–	0.22	0–16	–	–
Aradottir S. 2005	0.3	LLE	HPPLC-ELSD	–	0.2	0.2–4	–	0.5–12
Aradottir S. 2004	1–0.3	LLE	HPPLC-ELSD	–	–	–	–	–
Varga A. 2002	–	LLE	HPPLC-ELSD	0.2	–	–	–	–
Hansson P. 2001	0.3	LLE	HPPLC-ELSD	0.8	–	–	–	0.8–22
Varga A. 2000	0.3	LLE	HPPLC-ELSD	–	–	–	–	–
Yon C. 2000	–	–	GC-MS	–	–	–	–	–
Gunnarsson T. 1998	4	LLE	HPPLC-ELSD LC-MS	0.2	–	–	–	–
This method	0.2	DLLME	LC-MS/MS	0.01 [†]	0.03 [†]	0–10 [†]	70	LLOQ-0.002 [†]

* $\mu\text{g}/\text{mL}$.

and 57.67 (for a concentration of 5 µg/mL) for PEth and PBut, respectively. A value of 100% indicates that the response in the mobile phase and in the blood extracts were the same and no absolute matrix effect was observed. A value of > 100% indicates an ionization enhancement and a value of < 100%, as this case, indicates an ionization suppression. The presence of an absolute or even a relative matrix effect for a given analyte (PEth in this case) does not necessarily indicate that the bioanalytical method may not be valid. Assuming the relative matrix effect exhibits the same pattern for the drug and the internal standard in all lots studied, the drug-to-internal standard ratio, a measure of the drug concentration, should not be affected.

The sample preparation step in an analytical process typically consists of an extraction procedure that results in the isolation and enrichment of components of interest from a sample matrix. Regarding this, liquid–liquid extraction (LLE) is the only extraction used by all authors. LLE is among the oldest of the preconcentration and matrix isolation techniques in analytical chemistry. However, LLE is time-consuming and requires large amounts of organic solvent. Solid phase extraction (SPE) uses much less solvent than LLE, but can be relatively expensive. Supercritical fluid extraction (SFE) can also be relatively expensive. Compared with LLE, SPME is a solvent free process that includes simultaneous extraction and preconcentration of analytes from aqueous samples or the headspace of the samples. However, SPME is also expensive, its fiber is fragile and has limited lifetime and sample carry over can be a problem. We improved this analytical procedure by using DLLME. It was found to be an alternative extraction method to LLE with good recoveries (around 70%). DLLME was demonstrated as a novel microextraction technique with a high performance and powerful preconcentration method. In this method, the appropriate mixture of extraction solvent and disperser solvent is injected into aqueous sample rapidly. Thereby, cloudy solution is formed. In fact, it is consisted of fine particles of extraction solvent which is dispersed entirely into aqueous phase. After centrifugation, the fine particles of extraction solvent are sedimented in the bottom of the conical test tube. Some important parameters, such as kind of extraction and disperser solvent and volume of them, and extraction time were investigated. The advantages of DLLME method are simplicity of operation, rapidity, low cost, high recovery and enrichment factor [10].

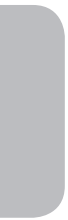
5. Conclusions

In the present study, a new extraction technique (DLLME) was described. It is fast, simple and inexpensive method. Good recoveries within a short time were got. The LC-MS/MS method with C8 column was developed for analyzing very small amounts of PEth. The results show that this technique is highly sensitive to determine PEth at low concentrations. The samples used here were human blood from clinical samples. The total analysis time was 8.5 min. Lower detection limits were obtained compared to published

articles. The method provides high precision and accuracy within the linear range of detection. Data presented in this article suggest that PEth may be considered as an excellent candidate for a sensitive and specific marker of alcohol intake.

References

- [1] H. Gnann, C. Engelmann, G. Skopp, M. Winkler, V. Auwärter, S. Dresen, N. Ferreiros, F.M. Wurst, W. Weinmann, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (7) (2010) 2415–2423.
- [2] X. Joya, B. Friguls, S. Ortigosa, E. Papaseit, S.E. Martínez, A. Manich, O. García-Algar, R. Pacific, O. Vall, S. Pichini, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 69 (0) (2012) 209–222.
- [3] S.H. Stewart, A. Reuben, A. Brzezinski, D. Koch, J. Basile, P. Randall, P. Miller, *Alcohol Alcohol.* 44 (5) (2009) 464–467.
- [4] S.H. Stewart, T.L. Law, P.K. Randall, R. Newman, *Alcohol—Clin. Exp. Res.* 34 (3) (2010) 488–492.
- [5] C. Lupton, L. Burd, R. Harwood, *Am. J. Med. Genet. C (Semin. Med. Genet.)* 15 (1) (2004) 42–50.
- [6] A. Nalesso, G. Viel, G. Cecchetto, D. Mioni, G. Pessa, D. Favretto, S.D. Ferrara, *J. Chromatogr. A* 1218 (46) (2011) 8423–8431.
- [7] E. Comasco, N. Nordquist, J. Leppert, L. Orelund, R. Kronstrand, C. Alling, K. Nilsson, *J. Stud. Alcohol Drugs* 70 (5) (2009) 797–804.
- [8] A. Helander, Y. Zheng, *Clin. Chem.* 55 (7) (2009) 1395–1405.
- [9] S. Aradottir, B. Olsson, *BMC Biochem.* 6 (1) (2005) 18.
- [10] M. Rezaee, Y. Assadi, M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1–9.
- [11] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, *J. Chromatogr. A* 1217 (16) (2010) 2342–2357.
- [12] Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services, *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, FDA*. (<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>), 2011 (accessed 29.10.12).
- [13] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.* 75 (13) (2003) 3019–3030.
- [14] F.M. Wurst, B. Tabakoff, C. Alling, S. Aradottir, G. Wiesbeck, F. Müller-Spahn, F. Pragst, B. Johnson, M. Javors, N. Ait-Daoud, G. Skipper, C. Spies, Y. Nachbar, O. Lesch, K. Ramskogler, S. Hartmann, M. Wolfersdorf, *Alcoholism-Clin. Exp. Res.* 29 (7) (2005) 1268–1275.
- [15] P. Hansson, A. Varga, C. Krantz, *Int. J. Leg. Med.* 115 (3) (2001) 158–161.
- [16] F. Pragst, K. Spiegel, F. Sporkert, M. Bohnenkamp, *Forensic Sci. Int.* 107 (1–3) (2000) 201–223.
- [17] T. Gunnarsson, A. Karlsson, P. Hansson, G. Johnson, C. Alling, G. Odham, *J. Chromatogr. B* 705 (2) (1998) 243–249.
- [18] H. Gnann, W. Weinmann, C. Engelmann, F.M. Wurst, G. Skopp, M. Winkler, A. Thierauf, V. Auwärter, S. Dresen, N.F. Bouzas, *J. Mass Spectrom.* 44 (9) (2009) 1293–1299.
- [19] A. Faller, B. Richter, M. Kluge, P. Koenig, H. Seitz, A. Thierauf, H. Gnann, M. Winkler, R. Mattern, G. Skopp, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (4) (2011) 1163–1166.
- [20] Y. Zheng, O. Beck, A. Helander, *Clin. Chim. Acta* 412 (2011) 1428–1435.
- [21] A. Nalesso, G. Viel, G. Cecchetto, G. Frison, S.D. Ferrara, *Electrophoresis* 31 (2010) 1227–1233.
- [22] P. Marques, S. Tippetts, J. Allen, M. Javors, C. Alling, M. Yegles, F. Pragst, *F. Wurst, Addiction* 105 (2009) 226–239.
- [23] M.J. Kip, C.D. Spies, T. Neumann, Y. Nachbar, C. Alling, S. Aradottir, W. Weinmann, F.M. Wurst, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 32 (7) (2008) 1284–1291.
- [24] P. Bendroth, R. Kronstrand, A. Helander, J. Greby, N. Stephanson, P. Krantz, *Forensic Sci. Int.* 176 (2008) 76–81.
- [25] A. Varga, Staffan Nilsson, *Electrophoresis* 29 (2008) 1667–1671.
- [26] S. Aradottir, G. Asanovska, S. Gjers, P. Hansson, C. Alling, *Alcohol. Alcohol.* 41 (4) (2006) 431–437.
- [27] S. Aradottir, K. Moller, C. Alling, *Alcohol. Alcohol.* 39 (1) (2004) 8–13.
- [28] A. Varga, C. Alling, *J. Lab. Clin. Med.* 140 (2002) 79–83.
- [29] A. Varga, P. Hansson, G. Johnson, C. Alling, *Clin. Chim. Acta* 299 (2000) 141–150.
- [30] C. Yon, J.S. Han, *Exp. Mol. Med.* 32 (4) (2000) 243–245.



SECCIÓN IV. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

SECTION IV. Statistical analysis

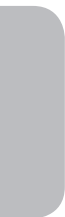




SECCIÓN IV: TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

SECTION IV: Statistical analysis

IV.1. Estadística descriptiva	255
IV.1.1. Medidas de posición y dispersión	255
IV.1.1.1. Histograma	255
IV.1.1.2. Gráfico de cajas	258
IV.2. Análisis estadístico bivalente	261
IV.2.1. Diagramas de dispersión	261
Referencias bibliográficas	269



En base a los resultados obtenidos mediante el análisis de los FAEEs y del EtG en meconio, se ha hecho un estudio estadístico con el fin de establecer dos tipos de correlación:

- Correlación entre los diferentes FAEEs analizados.
- Correlación de los FAEEs con el EtG.

Para ello, se ha empleado el programa estadístico IBM SPSS®Statistics 21.

Debido a la asimetría (deslizamiento hacia la derecha) de los datos resultantes al analizar los casos reales, se ha preferido aplicar el logaritmo decimal a los datos experimentales al igual que han hecho otros autores [Bakdash y col., 2010]. Así pues, se ha trabajado con 4 variables a las que se les ha aplicado el logaritmo: concentración de EtG (EtilG), concentración de etil miristato (EtilM), concentración de etil palmitato (EtilP) y concentración de etil estearato (EtilE).

Se ha contado con un total de 81 datos (concentraciones) correspondientes a FAEEs. En cambio, cuando el estudio de la correlación se hace con los datos conjuntos de los FAEEs y el EtG, el número se reduce a 47.

Cuando se realiza el análisis estadístico con 47 datos, las variables resultantes son las siguientes:

- LoEtG: logaritmo decimal de la concentración del etil glucurónico.
- LoEtM: logaritmo decimal de la concentración del etil miristato.
- LoEtP: logaritmo decimal de la concentración del etil palmitato.
- LoEtE: logaritmo decimal de la concentración del etil estearato.

Sin embargo, cuando se emplean los 81 datos de FAEEs, las variables se denominan del siguiente modo:

- LoEtilM: logaritmo decimal de la concentración del etil miristato.
- LoEtilP: logaritmo decimal de la concentración del etil palmitato.
- LoEtilE: logaritmo decimal de la concentración del etil estearato.

IV.1. Estadística descriptiva

IV.1.1. Medidas de posición y dispersión

Con las medidas de posición se trata de determinar dónde está el valor central de la variable. Al analizar la dispersión se desea conocer cuán separados están los valores de la variable de su valor medio (Tabla 10).

Tabla 10. Medidas de posición y dispersión de las cuatro variables estudiadas.

Medidas	LoEtIlM	LoEtIlP	LoEtIlE	LoEtG
Media	2.2616	2.3887	2.1383	1.5733
Mediana	2.0619	2.2366	1.9679	1.6794
Desviación típica	0.55915	0.75895	0.65341	0.36707
Varianza	0.313	0.576	0.427	0.135

IV.1.1.1. Histograma

En este apartado interesa ver si la distribución de una variable difiere de una distribución normal. La distribución normal, o campana de Gauss, es una familia de curvas que cumplen las siguientes propiedades:

- Tiene un único valor máximo, que coincide con la media, la moda y la mediana.
- Es simétrica respecto al eje vertical que corta el punto máximo.
- Se aproxima al eje horizontal de forma asintótica tanto por la derecha como por la izquierda.

El histograma de frecuencias muestra un gráfico en el que, en el eje horizontal aparecen los valores de la variable y en el eje vertical el número de veces que se repite cada valor.

En las Figuras 18-21 aparecen representados los datos de los tres ésteres etílicos de los ácidos grasos y del etil glucurónico en forma de histograma.

A. FAEEs

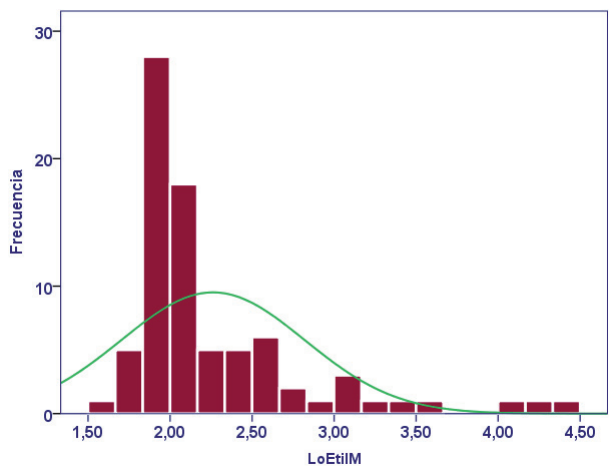


Figura 18. Histograma del etil miristato.

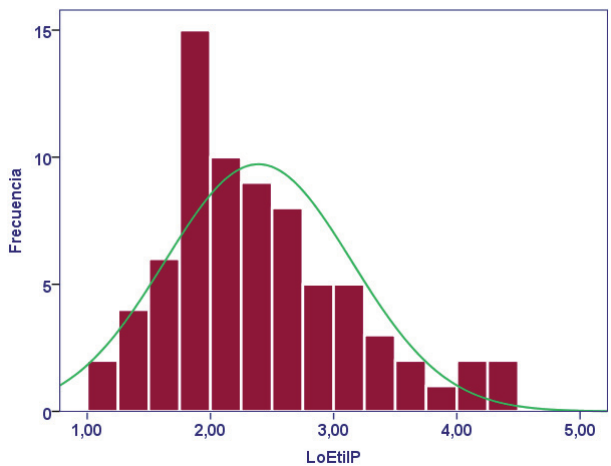


Figura 19. Histograma del etil palmitato.

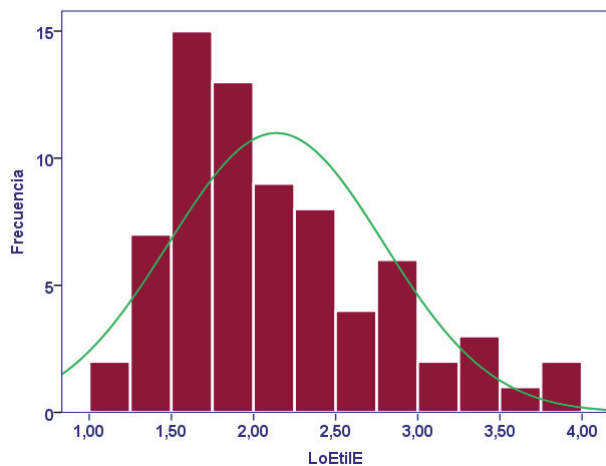


Figura 20. Histograma del etil estearato.

B. EtG

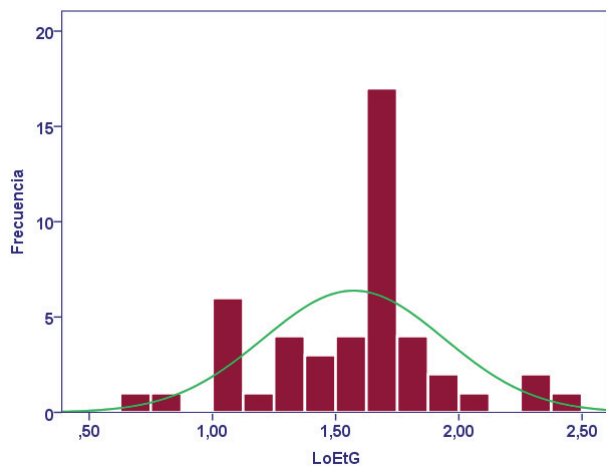


Figura 21. Histograma del etil glucurónico.

IV.1.1.2. Gráfico de cajas

El gráfico de cajas representa otra manera de ver la distribución que siguen los datos de una variable. En él se representa la mediana y los cuartiles. Aquellos puntos marcados con un círculo o una estrella son los valores atípicos identificados por el programa. Los valores identificados con una estrella caen más allá de 3 veces el recorrido intercuartílico.

A. FAEEs

Se representan los 81 resultados obtenidos para el estudio individual de los tres FAEEs (Figura 22).

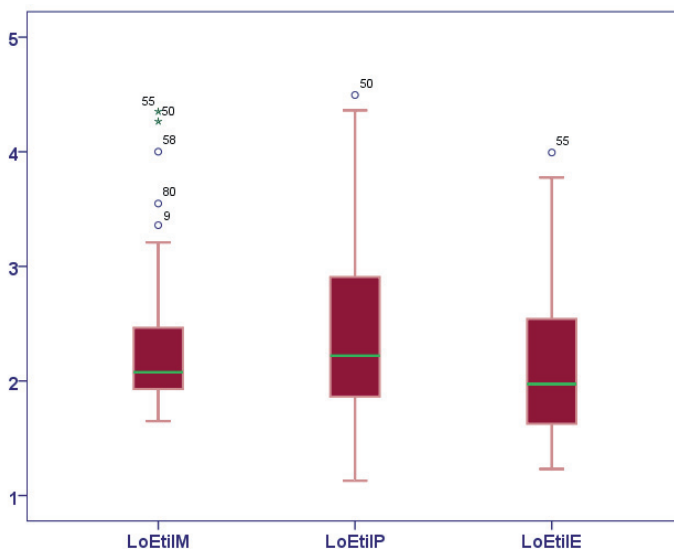


Figura 22. Gráfico de cajas del etil miristato, del etil palmitato y del etil estearato.

A la izquierda de la mediana, los datos se encuentran más concentrados, como se puede observar también en los histogramas mostrados anteriormente. Cabe destacar la mayor concentración a la que están sometidos los datos en el caso del etil miristato. También aquí está presente un mayor

número de valores extremos u outliers. La distribución de los FAEEs, mediante el uso de histogramas, también ha sido reflejada por Sübe y col [2010].

Si observamos la desviación típica para estos compuestos en la tabla anterior, Tabla 10, vemos como se ratifica lo expuesto en este apartado: la desviación típica del etil miristato es ligeramente menor que para el etil palmitato o estearato.

B. FAEEs/EtG

Se representan los gráficos de cajas para los 47 resultados obtenidos en el análisis conjunto de los tres FAEEs y del EtG (Figura 23).

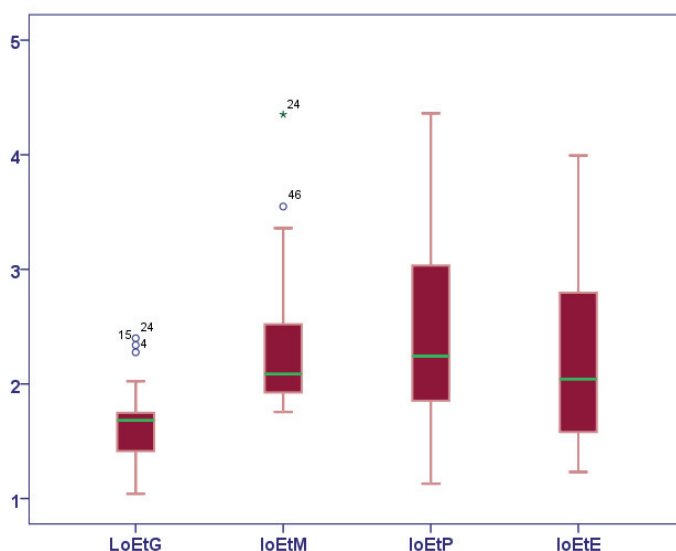


Figura 23. Gráfico de cajas de los FAEEs y del EtG.

Los valores situados a la izquierda de la mediana de los 47 resultados correspondientes a los tres FAEEs se encuentran más concentrados, de la misma manera que sucedía en el estudio anterior. En cambio, las

concentraciones situadas en torno al percentil 50, para el caso del EtG, están muy juntas con respecto al percentil 75.

Al igual que sucedía en el análisis de las 81 muestras analizadas para los tres FAEEs, en este caso se observa que el etil palmitato y estearato son los compuestos que presentan los datos más asimétricos (mayor deslizamiento hacia la derecha).

IV.2. Análisis estadístico bivalente

IV.2.1. Diagramas de dispersión

Los diagramas de dispersión permiten describir el comportamiento conjunto de dos variables. Cuando se trabaja con experimentos bivariantes estos diagramas pueden dibujarse en el plano; así, se puede representar una de las variables en el eje x y la otra en el eje y .

A. FAEEs

El diagrama de dispersión de los tres compuestos, sin aplicar logaritmos a sus respectivos datos, no parece mostrar con claridad la tendencia de los mismos. Esto se debe al gran deslizamiento por la derecha que presentan los datos encontrados (Figuras 24-26).

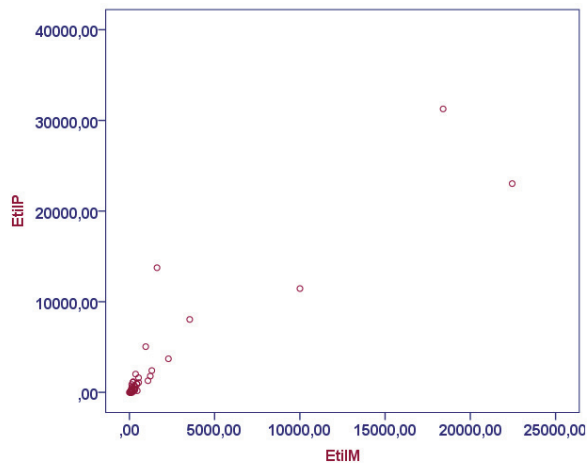


Figura 24. Diagrama de dispersión entre EtIM/EtIP.

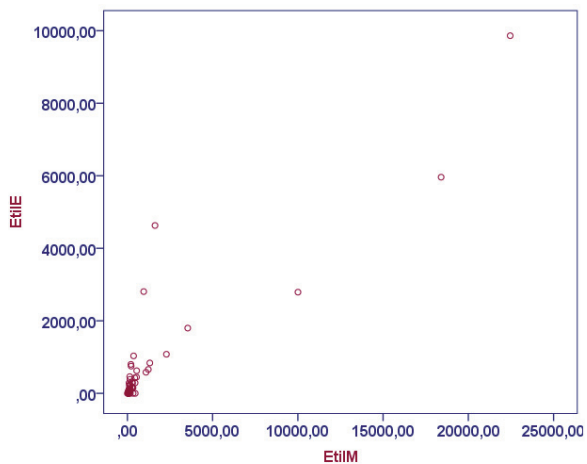


Figura 25. Diagrama de dispersión entre EtimM/Etile.

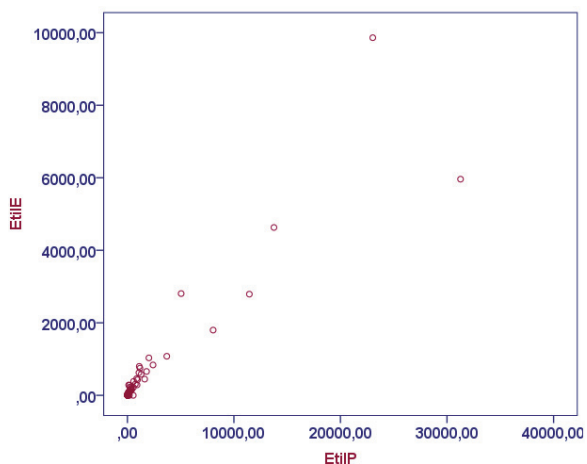


Figura 26. Diagrama de dispersión entre EtilP/Etile.

Si por el contrario aplicamos logaritmos, los diagramas de dispersión obtenidos se muestran en las Figuras 27-29.

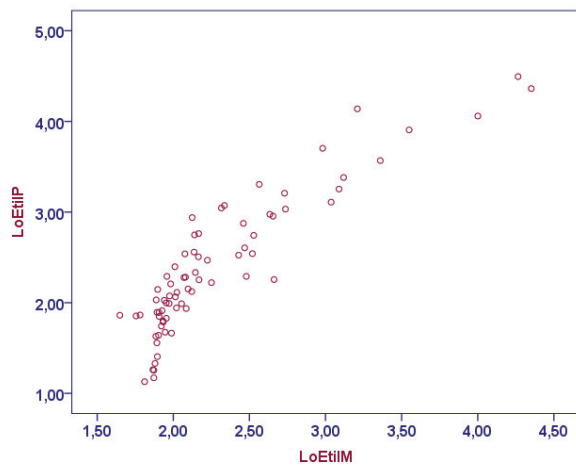


Figura 27. Diagrama de dispersión entre LoEtIM/LoEtIP.

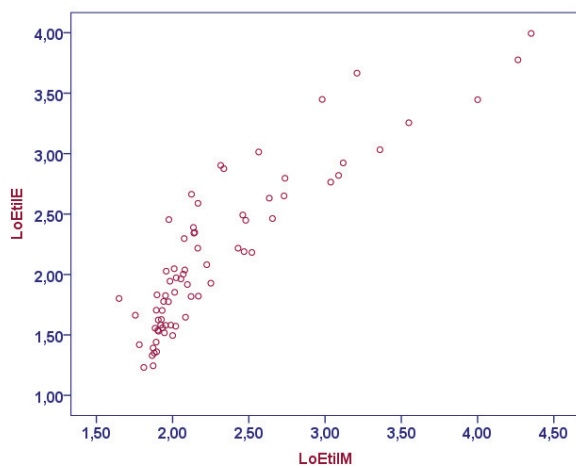


Figura 28. Diagrama de dispersión entre LoEtIM/LoEtIE.

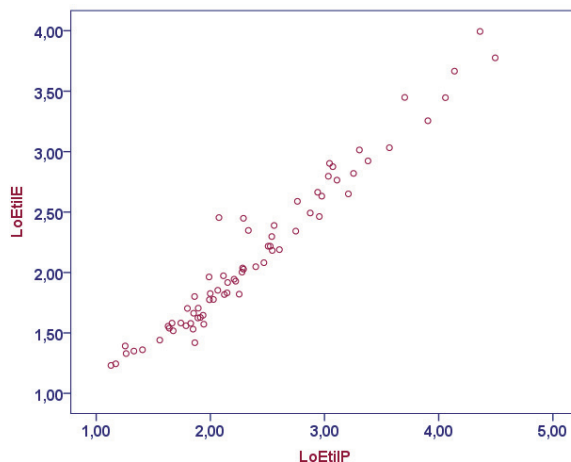


Figura 29. Diagrama de dispersión entre LoEtilP/LoEtilE.

Un parámetro que nos ayudará a definir la correlación que siguen los datos es el coeficiente de correlación lineal de Pearson. En la Tabla 11 se representan los valores obtenidos para cada una de estas relaciones.

Tabla 11. Coeficientes de correlación de Pearson para las relaciones entre los FAEEs.

Compuestos	Coeficiente de correlación de Pearson
LoEtilM/LoEtilP	0.899
LoEtilM/LoEtilE	0.883
LoEtilP/LoEtilE	0.977

A la vista de estos resultados, junto con los diagramas representados en las Figuras 25-27, se deduce que el etil palmitato y el etil estearato siguen una correlación lineal fuerte. En el caso de las relaciones entre el etil miristato con el etil palmitato y el etil estearato la correlación lineal es más débil. Se han estudiado otro tipo de relaciones no lineales para estos casos.

❖ Relación entre etil miristato/etil palmitato

La relación cuadrática ha resultado ser un modelo más adecuado para este conjunto de datos. La Figura 30 representa la relación lineal frente a la cuadrática.

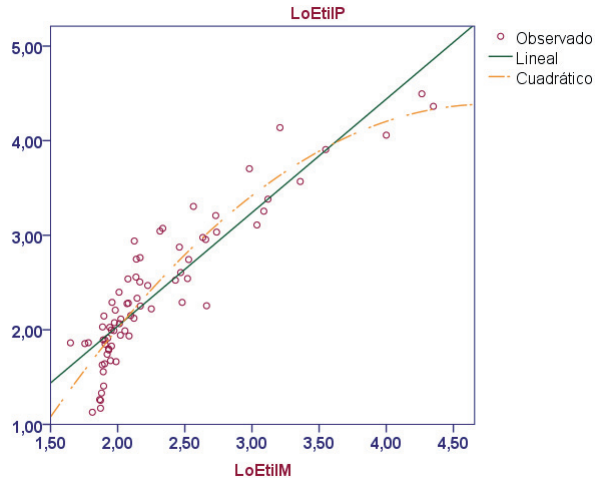


Figura 30. Relación lineal y cuadrática entre LoEtilM/LoEtilP.

La siguiente tabla muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación al cuadrado (r^2) para cada tipo de representación, siendo x los valores para el etil miristato e y los valores para el etil palmitato.

Tabla 12. Ecuación de la recta y coeficiente de correlación de los dos modelos con mejor bondad de ajuste para la relación LoEtilM/LoEtilP.

Tipos de relación	Ecuación	r^2
Modelo lineal	$y = -0.362 + 1.2 x$	0.809
Modelo cuadrático	$y = -2.653 + 2.953 x - 0.310 x^2$	0.841

❖ Relación entre etil miristato/etil estearato

La bondad del ajuste mejora al usar un modelo inverso. Se representa la relación lineal frente a la relación inversa (Figura 31). La Tabla 13 muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación al cuadrado (r^2) para cada tipo de representación, siendo x los valores para el etil miristato e y los valores para el etil estearato.

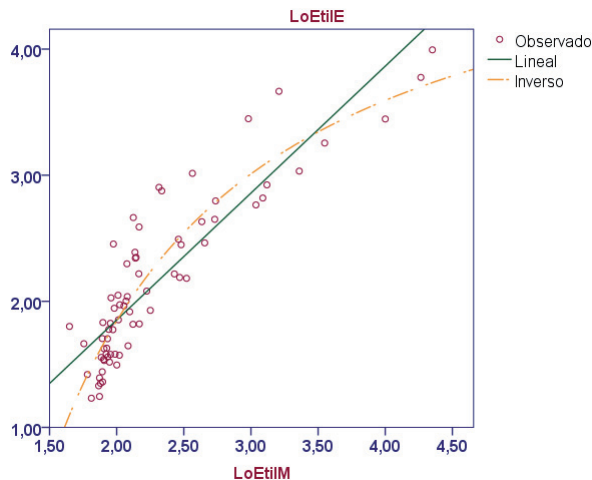


Figura 31. Relación lineal e inversa entre LoEtIlM/LoEtIlE.

Tabla 13. Ecuación de la recta y coeficiente de correlación de los dos modelos con mejor bondad de ajuste para la relación LoEtIlM/LoEtIlE.

Tipos de relación	Ecuación	r^2
Modelo lineal	$y = -0.161 + 1.007 x$	0.780
Modelo inverso	$y = 5.342 - (6.996/x)$	0.820

B. FAEEs/EtG

El estudio de la correlación entre los dos marcadores del consumo de alcohol se hará también aplicando el logaritmo decimal a los datos

experimentales. Las siguientes figuras muestran los diagramas de dispersión para estos dos biomarcadores.

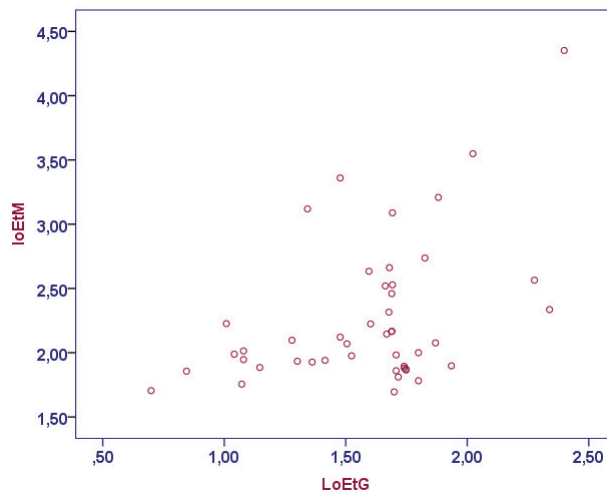


Figura 32. Diagrama de dispersión para la relación LoEtG/LoEtM.

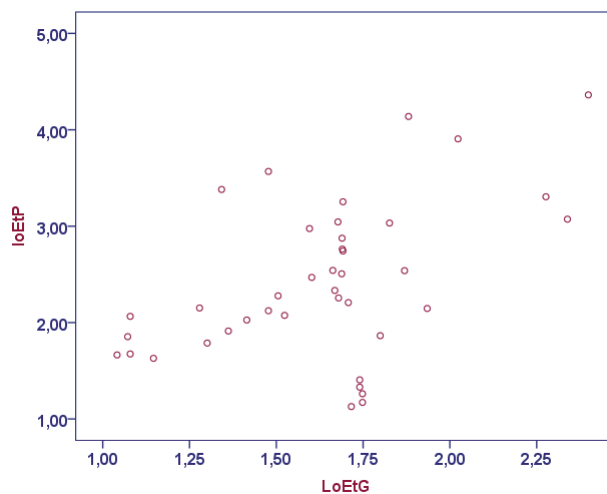


Figura 33. Diagrama de dispersión para la relación LoEtG/LoEtP.

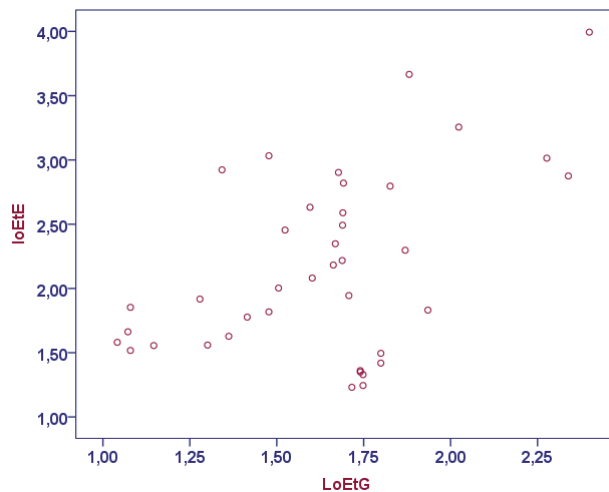


Figura 34. Diagrama de dispersión para la relación LoEtG/LoEtE.

Los coeficientes de Pearson de estas relaciones aparecen reflejados en la siguiente tabla.

Tabla 14. Coeficientes de correlación de Pearson para las relaciones entre el EtG y los diferentes FAEEs.

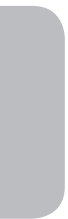
Compuestos	Correlación de Pearson
LoEtG/LoEtM	0.442
LoEtG/ LoEtP	0.487
LoEtG/ LoEtE	0.500

Las relaciones del EtG con cada uno de los FAEEs estudiados muestran una cierta tendencia ascendente. La relación entre ellos es muy débil.

Referencias bibliográficas

Bakdash A.; Burger P.; Goecke T.; Fasching P.; Reulbach U.; Hastedt M.; Rothe M.; Beckmann M.; Pragst F.; Kornhuber J. Quantification of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in meconium from newborns for detection of alcohol abuse in a maternal health evaluation study. *Anal Bioanal Chem* 396:2469-2477 (2010).

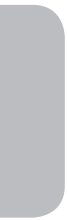
Sübe S.; Selavka C.; Mieczkowski T.; Pragst F. Fatty acid ethyl ester concentrations in hair and self-reported alcohol consumption in 644 cases from different origin. *Forensic Sci Int* 196:111-117 (2010).



SECCIÓN V. DISCUSIÓN

SECTION V. Discussion





SECCIÓN V: DISCUSIÓN

SECTION V: Discussion

V.1. FAEEs, EtG and PETH: Study and incorporation	276
V.1.1. Study of the biological markers analysed	276
V.1.2. Its incorporation into hair	277
V.1.3. Origin of hair studied	278
V.2. Study of fatty acid ethyl esters (FAEEs) in hair	280
V.3. Study of ethyl glucuronide (EtG) in hair	288
V.4. Study of fatty acid ethyl esters (FAEEs) in meconium	295
V.5. Study of phosphatidylethanol (PEth) in blood	306
References	311



As highlighted in the part entitled Explanations and Objectives, the main purpose of this Doctoral Thesis has been to develop an analytical methodology that allows the determining of alcohol consumption, a substance with a great impact on our population.

With this objective in mind, the markers of the ethanol molecule in two of the known alternative biological matrices, hair and meconium, have been studied in this case. Hair gives us information about ethanol consumption in the population offering us a wide window of detection. However, if we want information about the consumption during pregnancy, analysing a pregnant woman's hair will not guarantee that the consumption took place during pregnancy. The matrices that can inform us about the consumption during pregnancy are the hair and meconium of the newborn. In this Doctoral Thesis we have decided to use meconium as its window of detection is wider than that of the newborn's hair: detection of the last 16 weeks of pregnancy compared to the last 20-24 weeks in the case of using meconium, as well as a greater ease of collection.

For the study of PEth, one of the traditional matrices, blood, has been used as this metabolite is found in red blood cells.

Finally, so that these methods can be applied in any Toxicology Laboratory and be capable of giving reliable, exact and precise results, it is necessary to carry out its validation and subsequent use on real samples.

V.1. FAEs, EtG and PETH: Study and incorporation

V.1.1. Study of the biological markers analysed

The detection of these three markers can be carried out on different body fluids, but the great inconvenience in the majority of the cases is its small window of detection. In the case of EtG and FAEs, the possible detection fluctuates between 2 and 80 hours depending on the biological matrix used. This is solved working with hair or meconium as they allow us to establish a chronic consumption (Table 15).

Table 15. Window of detection of different biological matrices.

Compounds	Biological matrices	Detection Time
EtG	Urine	± 80 hours
	Blood	± 18 hours
	Plasma	± 8 horas
	Hair	Chronic consumption established
	Meconium	Chronic consumption established
FAEs	Urine	-
	Blood	± 24 hours (44 hours in abusive consumers)
	Plasma	± 2 hours
	Hair	Chronic consumption established
	Meconium	Chronic consumption established
	Different post-mortem tissues	-
PETH	Blood	± 7 days (29 days in abusive consumers)
	Guts: liver, lung, spleen	-

The first results of the EtG extraction from hair date from the year 2000 [Pragst et al.; 2000]. That same year, Skopp et al. and Alt et al. also managed to extract this metabolite in those cases where there had been an abuse of alcohol consumption [Skopp et al., 2000; Alt et al., 2000]. Nevertheless, in the case of the FAEEs, its existence as a product of the biotransformation of ethanol has been known since 1960. Yet it was not until the year 2001 when Pragst et al. put it forward as a possible marker of the consumption of ethyl alcohol [Pragst et al., 2001]. The extraction of the FAEEs from meconium came later, initially investigated by Mac et al. in 1994, followed by Klein et al. and Bearer et al. in 1999 [Mac et al., 1994; Klein et al., 1999; Bearer et al., 1999].

The study of PEth is more recent, thus making the bibliography found considerably less. We know that its half life is of approximately 7 days, except in chronic consumers where up to after 29 days can be found. Isaksson et al. [2011] refer to its possible detection in different organs such as liver, lung, spleen or even the central nervous system.

V.1.2. Its incorporation into hair

There is still a great controversy with regards to the incorporation of EtG and FAEEs into hair. The main routes appear through the sweat glands, the sebaceous glands or blood. In the case of EtG, the incorporation via fat is a very unlikely hypothesis due to its polar composition. Therefore, the majority of authors affirm that the main route of incorporation of this metabolite into hair is through sweat [Yegles et al., 2004; Pragst et al., 2010; Agius et al., 2012; Schrader et al., 2012]. On the contrary, other authors tend towards the incorporation from blood during the process of hair growth [Raino et al., 2008; Agius et al., 2012; Pianita et al., 2013]. This has been confirmed by studies carried out by Kharbouche et al. [2010] on rat hair, which lacks sweat glands, obtaining positive results for EtG. However, in the case of FAEEs the majority of

authors propose the incorporation through the sebaceous glands [Auwarter et al., 2001; Musshoff et al., 2002; Hartwing et al., 2003; Wurst et al., 2004; Auwarter et al., 2004; Pragst et al., 2010; Sübe et al., 2010; Albermann et al., 2011].

V.1.3. Origin of hair studied

The origin of the hair analysed has also been subject to study. Normally, hair from the scalp must be used, although there are a series of reasons why hair from another origin must be used: (1) lack of capillary hair; (2) excessively short hair or frequently treated with invasive cosmetic products; (3) need for another sample of hair from a different region to confirm results or (4) external contamination.

We must take into account that the interpretation of the results will be different seeing as the speed of hair growth, the growth cycles, the sebaceous and sweat gland activity, the hair thickness, the influence of external contamination and/or the use of cosmetic treatments will also be so [Hartwing et al., 2003; Suesse et al., 2012].

Hartwing et al. [2003] carried out a study comparing the results obtained from capillary hair and hair from other regions (pubic, underarm, beard, chest, arm, leg and even eyebrow hair) confirming its use and helping prevent errors in interpretation.

In general, sample gathering of pubic or underarm hair must be avoided as the studies carried out to date show conflicting results (highly positive results in pubic hair originating from occasional consumers due to the contamination via urine) [Kintz et al., 2008; Kerekes et al., 2009; Hamid et al., 2011]. This study has been carried out with hair samples originating from scalp in all cases.

Some authors emphasize the parameters that affect the process of hair extraction, such as the efficiency of the washing process, the pulverization mode or the solvents, temperature and time used in the process [Politi et al., 2006]. The investigations carried out on the performance using sprayed or cut hair seem to favour the use of the first, showing slightly higher concentrations. Its explanation probably lies in the use of a more homogeneous matrix [Maenhout et al., 2013].

V.2. Study of fatty acid ethyl esters (FAEEs) in hair

The most studied FAEEs found in the bibliography have been ethyl myristate, ethyl palmitate, ethyl oleate and ethyl stearate. Caprara et al. [2005A, 2005B] have also analysed ethyl palmitoleate and laurate with the objective of increasing the reliability of the analysis.

The extraction of the FAEEs from hair (20-50 mg in the revised bibliography) must be carried out using lipophilic solvents under delicate conditions as we are dealing with non-polar substances, easily hydrolysed in a basic or alkaline environment.

One of the most used procedure for its extraction has been the method proposed by Bernhardt et al. [1996], carrying out a liquid-liquid extraction with acetone/hexane and purifying after extraction with SPE (aminopropyl columns).

Pragst et al., in the year 2001, proposed a new method for the extraction of these hair compounds which consisted of two stages: (1) liquid-liquid extraction and (2) separation of the keratin matrix compounds of hair by HS-SPME, taking advantage of its high volatility and using a 65 μm polydimethylsiloxane/divinylbenzene fibre (PDMS/DVB) whose filing is adequate for semi volatile lipophilic compounds. In order to favour the extraction by SPME we must avoid the hydrolysis of the compounds, encourage the evaporation and retain the impurities. To do so the phosphate buffer is added to pH 7 as at this pH the esters should remain stable even at high temperatures. Furthermore, the free carboxylic acids (present in hair lipids) should be in an ionic, non volatile state. On the other hand, the evaporation is favoured by the saline effect, for this reason NaCl is added.

In previous studies it has been noted that the longer the aliphatic chain, the lower its volatility will be. The optimum temperature in this case has been 90°C. It was also proven that with extraction times greater than 30 min, the peak area was reduced, which we can attribute to the hydrolysis of the esters [Pragst et al., 2001].

With regards to the solvents used, we observed that a combination of a non polar solvent, hexane, with a solvent with swelling properties offered the best result [Pragst et al., 2001].

The method put forward in this Doctoral Thesis consists of an optimisation of the HS-SPME brought up in the bibliography but with two main improvements: (1) reduction of the mixing time in the liquid-liquid extraction from 15-20 hours to 5 minutes, and (2) use of a smaller quantity of reactives [Cabarcos et al., 2009]. Other extraction techniques have also been tried such as SPE and extraction via sonication, the results of which were not satisfactory.

The first technique used to determine FAEEs was thin layer chromatography (TLC) followed by gas chromatography (GC) developed by Kinnunen et al. in the year 1984 [Kinnunen et al., 1984]. This has been the most used technique together with mass spectrometry due to its suitability to work with volatile compounds [Pragst et al., 2001; Albermann et al., 2011]; it is also the technique used in this Doctoral Thesis [Cabarcos et al., 2009].

Politi et al. [2011] make reference to recent incorporation of tandem gas chromatography to determine the FAEEs.

EI or CI have been the most used sources of ionisation. Some authors advise using CI instead of EI as the latter results in identical fragments of the FAEEs [Musshoff et al., 2002].

The HP5-MS column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) has been the most used chromatographic column to separate compounds. It is a 5%-phenyl-methylpolysiloxane column with non polar filling and very low bleeding, ideal for GC-MS. Other capillary columns used in the bibliography with a stationary phase very similar to the widely used HP5-MS, have been: CPSil-8, Equity-5 or VF-Xms (Table 6, Chapter I.VI).

Helium (He) has been the carrier gas used in all cases with a 1mL/min flow, working with splitless and using the SIM ionisation mode.

The most used temperature program has been the one suggested by Pragst et al. [2001], even though later on small modifications were made to it [Giovanni et al., 2007; Kulaga et al., 2009; Sübe et al., 2010]. The program used in the carrying out of this study has been a modification of that proposed in the year 2001, reaching an inferior final temperature [Cabarcos et al., 2009].

The validation of the suggested methods in this Doctoral Thesis has been carried out following the regulations imposed by the FDA, American Food and Drug Administration.

The ULOQ consulted in the different studies has fluctuated around 2 ng/mg, except for Pragst et al. [2001] who proposed values of 15 ng/mg, as used in this study, due to the concentrations found. Sübe et al. [2010] and Politi et al. [2011] have used values ten times inferior.

The LOD and LLOQ have been very constant throughout the years of study, only Caprara et al. [2005A, 2005B, 2006] have managed to lower these values about ten times. In our case, we have managed to improve the LOD and LLOQ for ethyl palmitate [Cabarcos et al., 2009].

The recovery of ethyl palmitate and stearate has been satisfactory unlike the ones obtained for ethyl myristate, whose percentage has fluctuated

between 14 and 25%. The extraction has been shown to be more adequate for the first two compounds as the temperature used in the extraction process was 90°C, ideal for ethyl palmitate and ethyl stearate. However, this temperature can cause the hydrolysis or the deterioration of part of ethyl myristate. It is a more volatile compound than the others due to its shorter aliphatic chain, thus making its ideal temperature lower. This fact together with the possible greater endogenous formation of ethyl palmitate and ethyl stearate in the organism can be the cause of the different performance obtained.

In all of the studies present in the revised bibliography, the same ions for the 3 compounds subject to study have been used.

The validated method has been applied to real cases. It is therefore necessary to establish some cut-off values and thereby make a correct interpretation of the results obtained. Although currently there is still great controversy with regards to this point, the SoHT (Society of Hair Testing) has defined this parameter as the sum of 4 FAEEs (ethyl myristate, palmitate, stearate and oleate) to differentiate between abusive consumption and moderate consumption of alcohol. The last consensus made by this organisation in June 2012 established that if the sum of the concentrations of these 4 esters is ≥ 0.2 ng/mg in hair measuring 0-3cm or ≥ 0.4 ng/mg in hair measuring 0-6cm, it is an indication of heavy alcohol consumption (SoHT, 2012).

Some authors like Hartwig et al. [2003], Yegles et al. [2004] and Wurst et al. [2004] refer to the following cut-off values:

- $C_{\text{FAEEs}} \geq 1$ ng/mg indicates a chronic consumption of ethyl alcohol.
- $C_{\text{FAEEs}} < 0.8$ ng/mg indicates a moderate consumption of ethyl alcohol.
- $C_{\text{FAEEs}} \leq 0.4$ ng/mg makes reference to teetotallers.

Nevertheless, other authors like Pragst et al. [2010], Sübe et al. [2010], Albermann et al. [2011] or Suesse et al. [2012] established the necessity to set different cut-off values according to the length of hair instead of having a stable value. This way a value of 0.5 ng/mg was used to differentiate between a moderate and abusive consumption of ethanol, if the length of the hair was ≤ 3 cm and a value of 1 ng/mg for lengths of capillary hair between 3.1-6 cm. Sübe et al. [2010] also established this latter value to apply to body hair regardless of its length. More recently, Hastedt et al. [2013] have preferred to use a value of 1.08 ng/mg, higher than that set by the SoHT in order to avoid false positives. Therefore it is not difficult to suppose that the interpretation of the results is not simple. In our case we have followed the cut-off values put forward by Hartwig et al. [2003].

The method developed has been applied to 22 hair samples belonging to a heterogeneous population. The concentrations obtained have been very different amongst some esters and others. For this reason, the values have fluctuated between 0-10.76 ng/mg for ethyl myristate, between 0-13.6 ng/mg for ethyl palmitate and between 0-2.56 ng/mg for ethyl stearate. However, these levels are in agreement with those indicated in other studies (Table 6, Chapter I.VI).

It is interesting to note that in the revised bibliography (Table 2, Chapter I.VI), the majority of the authors coincide when speaking about the predominant ethyl esters, putting ethyl palmitate and oleate in first place [Pragst et al., 2001; Hartwig et al., 2003; Auwärter et al., 2004; Kulaga et al., 2006; Caprara et al., 2007; Sübe et al., 2010]. This leads us to believe that both analytes are good markers of the consumption of ethyl alcohol. Nevertheless, Giovanni et al. [2008] have observed an increase in the FAEEs, especially of ethyl myristate and palmitate, in ethanol saturated environments. On the other hand, Sübe et al. [2010] have related the only presence of ethyl palmitate and

stearate to a possible external contamination instead of the incorporation through the sebaceous glands.

The method developed in this Doctoral Thesis to determine the FAEEs in hair also shows a predominance of ethyl palmitate compared to the other two esters studied. However, in those cases with a heavy consumption of alcohol, high concentrations of ethyl myristate can mainly be seen. With regards to the results in teetotallers' hair, ethyl palmitate and myristate have been the most abundant [Cabarcos et al., 2009].

Due to the reduced number of real cases to which the method of determining FAEEs has been applied, it is very complicated to reach final conclusions. Nevertheless, it has been proven that the values obtained are in agreement with the majority of the studies published to date and thus justify the use of this type of non invasive samples in the evaluation of ethanol consumption.

The appearance of false positives is a very common problem in this type of analysis, making it still very complicated to give reliable answers to this fact. Some authors highlight endogenous formation, the incorporation via capillary products containing ethanol, external contamination or the different techniques used as factors that can have influence on the result. Others mention diet, medication and metabolic processes as the cause of the production of small quantities of FAEEs in total abstainers [Auwärter et al., 2001; Hartwig et al., 2003; Chan et al., 2004A; Caprara et al., 2005A; Sübe et al., 2010; Albermann et al., 2011; Suesse et al., 2012]. However, these compounds are not altered by hair colour due to its lipophilic and neutral nature, and considering melanin favours interactions with basic and cationic substances [Kulaga et al., 2009; Suesse et al., 2012; SoHT, 2012].

In the consulted bibliography the possibility that the concentration of FAEEs increases from the proximal region to the distal probably due to the disposal caused by the sebaceous glands is also considered [Auwärter et al, 2001; Auwärter et al., 2004; Wurst et al., 2004; Giovanni et al., 2007]. Furthermore, long hair is washed more intensely near the scalp which causes a decrease in the disposal of FAEEs in the proximal sections. Yegles et al. [2004] and Sübe et al. [2010] also suggest an increase in the concentration from the proximal region to the distal (5-10cm) but then observe a decrease as of 5-10 cm in length. All these factors must be taken into account and we must be very cautious in the interpretation of the results.

Regarding the confirmation of results, the SoHT, during their 2009 meeting, put forward the use of two markers: FAEEs and EtG. In the consensus made during the year 2012, they also suggest that EtG must be the first option to evaluate the aforementioned consumption, backed up by various authors [Pragst et al., 2010; Albermann et al., 2011; Suesse et al., 2012]. Sübe et al. [2010] even suggest the comparison with the classic markers.

It is fundamental to stress the different behaviour of the fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide with respect to cosmetic treatments: (1) false positives for FAEEs because of the use of lotions containing alcohol would give negative results for EtG, (2) just as false negatives for EtG because of bleaching would show positive results for FAEEs [Pragst et al., 2006; Suesse et al., 2012; SoHT 2012]. It can be concluded that a positive result for FAEEs confirms a positive result for EtG, but a negative result for FAEEs cannot exclude a positive result for EtG.

The existence of a correlation between daily alcohol consumption and the concentration of FAEEs in hair is another aspect addressed by the authors. Some confirm the existence of such correlation [Pragst et al., 2010] while others, such as Auwärter et al., [2001] deny such fact. He suggests as an

explanation for the lack of correlation, the dependency of age and sex on the production of fat since this is controlled by hormones. This makes the segregation of the sebaceous glands different amongst some individuals and others. Sübe et al. [2010] also deny the existence of a correlation between the quantity consumed and the concentration of FAEEs due to the biological variability and the different capillary treatments used.

According to the study that Yegles et al. carried out in the year 2004, there is no correlation between the concentration of EtG and FAEEs in hair, and suggest the different formation sites of both or the different forms of deposition in hair as possible causes, reaffirmed also by Pragst et al. [2010] and Albermann et al. [2011]. FAEEs are mainly incorporated into hair through the sebaceous glands, making the incorporation rate depend on sex and age. Furthermore, capillary hair treatments can affect the sebaceous layer by eliminating it or false positives can be given because of capillary treatments containing this substance [Yegles et al., 2004]. Pragst et al. [2006] also speaks about pharmacokinetic differences and biochemical interindividual differences as a possible explanation for the lack of correlation between these two alcohol markers.

V.3. Study of Ethyl Glucuronide (EtG) in hair

The extraction techniques have not varied much along the years (Table 3, Chapter I.VI). The first revised extraction technique dates from the year 2000 and consists of an extraction via ultrasound in water and/or organic solvents for 3 hours. In the year 2002, Janda et al. suggested the extraction of EtG using SPE, whereas in the year 2004 Yegles et al. considered these two techniques: firstly an ultrasonication and then a SPE to obtain a greater analyte concentration [Janda et al., 2002; Yegles et al., 2004]. The sonication time used by the authors has been, in general, 2 hours, which was reduced to 15 minutes in the study presented in this Doctoral Thesis [Cabarcos et al., 2013B].

With regards to the cartridges used in SPE we find aminoprophyl columns, OASIS® MAX and Clean Screen™ columns. Amongst these, the most used has been OASIS® MAX, also used in the study presented, followed by the aminoprophyl ones.

As well as both of these conventional techniques used nowadays, not only together but separately, others have been used: urine screening [Klys et al., 2005; Wojick et al., 2007], MAE [Álvarez et al., 2008; Álvarez et al., 2009] or the carrying out of SPE followed by HS-SPME [Agius et al., 2010; Agius et al., 2012].

Another innovative method proposed by Malkowska et al. in the year 2012 consists of extraction by means of freezing and thawing cycles. This technique needs to be studied in depth as it has only been carried out on rat hair [Malkowska et al., 2012].

Various analytical methods have been used to determine the EtG in hair, urine, blood and plasma throughout the years. The most frequently described methods have been GC-MS and LC-MS/MS. As of the year 2000,

practically all authors have chosen this last technique in the analysis of EtG as it does not require the derivatisation stage, as well as being a quicker technique. Other lesser used techniques have been: GC-MS/MS since 2008, LC-MS or immunoassays [Helander et al., 2009A; Kharbouche et al., 2009] (results later confirmed by LC-MS/MS). Bendroth et al. used UPLC-MS/MS for its determination in 2008 [Bendroth et al., 2008].

A negative ionisation has been used. The vast majority of authors have quantified the EtG peaks and its deuterated analogue with the same transitions (EtG: 221-75; EtG-d5: 226-75). However, in the study presented here the transition 221-203 has been used to quantify EtG and 226-208 for EtG-d5 in order to show a greater abundance compared to the rest of the transitions.

In the revised bibliography different types of appropriate columns have been used to work in reverse phase because of the notable polar character the molecule subject to study has (Synergy™ RP, Luna® HILIC, Hypercarb™, Inertsil® ODS3, Acquity™ BEH HILIC, LiChroCart® Purospher RP 18, Uptisphere®-3SI). It is well known that the polarity of the mobile phase should be similar to the polarity of the compound to be eluted, which at the same time permits a balance with the stationary phase. The stationary phase cannot strongly retain the eluates because of the possibility of becoming indefinitely retained to it. The column fillings used have been modified silica for the transitory retention of the compound to elute. The most used columns have been Inertsil® ODS-3, used in this Doctoral Thesis, and Hypercarb™.

Regarding the configuration of the columns it is worth saying that:

- The length has varied from 10 mm, one of the most recent, to 250 mm. The shorter the column, the shorter the analysis time.
- The diameter of the column has fluctuated between 2 and 3 mm. The smaller the diameter, the greater the sensitivity on behalf of the chromatographic column.
- The particle size has fluctuated between 1.7 and 5 μm . The smaller the particle size, the greater the efficiency and resolution achieved.

In general, the configuration of the columns is in constant change, going from column lengths of 250 mm in the year 2010 to 10 mm in the year 2012, or particle sizes of 4 μm in the year 2002 to 1.8 μm in the years 2008-2012.

The majority of the authors have worked in a gradient mode, thus achieving a better resolution of the chromatographic peaks. The mobile phase used has been the same in the majority of the cases: acetonitrile/formic acid mixture whose flow has fluctuated between 0.2 and 0.4 mL/min.

Very different values corresponding to the analysis time have been found, going from 20-21 minutes in the years 2006-2008, 18 minutes [Tarcomnicu et al., 2010; Albermann et al., 2012; Cabarcos et al., 2013B], 14-15 minutes [Concheiro et al., 2009; Albermann et al., 2010] to 5-8 minutes over the last years [Pragst et al., 2010; Hastedt et al., 2012; Schröder et al., 2012; Kronstrand et al., 2012].

The validation of the analytical method takes on different aspects. The sensitivity of the analytical methods has been improving along the years. Therefore, the LOD have gone from values fluctuating around 50 pg/mg at the beginning of the year 2002 [Janda et al., 2002] to values fluctuating between

0.86 and 10 pg/mg more recently [Bean et. al., 2008; Cabarcos et al., 2013B]. In the same way, this improvement in sensitivity is also applied to the LLOQ, going from 102 pg/mg in the year 2002 to fluctuate between 1.88 [Bean et al., 2008] and 50 pg/mg over the last years. The levels of LOD and LLOQ of the optimised method in this Doctoral Thesis have been 10 and 20 pg/mg respectively. Even though these limits have been slightly higher than those reached by other authors over the last years, they are considered sensitive enough to quantify EtG in hair [Cabarcos et al., 2013B].

The recoveries have fluctuated between 80 and 102%, obtaining in our method a performance of 74-127%.

The matrix effect has been in all cases < 100%, which indicates the presence of an ion suppression.

Establishing universal cut-off values for EtG is still a complicated task. In the year 2010 the SoHT set a cut-off value of 30 pg/mg to define an abusive consumption of alcohol, but this figure disappeared in the last consensus made in the year 2012, where a value of ≥ 7 pg/mg was established to imply a heavy consumption of alcohol. Moreover, it was also established that a positive result for EtG prevailed over a negative one for FAEs.

Various authors have established their own cut-off points differentiating between teetotallers and social consumers, and between the aforementioned and abusive consumers (Table 16). Thus we find:

Table 16. Cut-off values according to different authors (A: teetotalers/moderate consumers; B: moderate consumers/abusive consumers).

Author	Cut-off (pg/mg)	
	A	B
Morini L.; 2009	-	27
Kerekes I.; 2009	7	25
Pragst F.; 2008	-	25
Bendroth P.; 2008	-	30
Kintz P.; 2008	-	50
Appenzeller B.; 2007B	4-15	23

The majority of the cut-off points suggested by the authors to distinguish between a moderate and abusive consumption fluctuate between 23 and 30 pg/mg. The values 23, 25 and 27 pg/mg can be considered to show the same sensitivity. However, not in the case of the values 30 and 50 pg/mg.

More recently, Liniger et al. [2010] put forward the following classification:

- EtG concentration < 7 pg/mg: negative result but an occasional consumption of alcohol may exist.
- EtG concentration between 7 and 30 pg/mg: moderate consumption of alcohol (20-40 g alcohol/day).
- EtG concentration > 30 pg/mg: excessive and regular consumption of ethanol.

The method suggested to determine EtG in hair samples has been applied to 72 people, some of whom with known alcohol problems. The concentrations obtained have fluctuated between 0 and 653 pg/mg, giving 24%

positive results [Cabarcos et al., 2013B]. The revised data in the bibliography has been very heterogeneous with values between 180-1000 pg/mg predominating.

As previously mentioned in the already discussed method, the majority of the authors have coincided in the need to confirm the obtained results via the analysis of EtG with another biomarker to try to reduce the risk of false negatives and positives [Lamoureux et al., 2009; Pragst et al., 2010]. The two biomarkers that should be used according to the SoHT are FAEEs and EtG. It can thus be said that both markers are complementary.

There are various opinions when establishing a correlation between the amount of alcohol consumed and the concentration of EtG in hair. Therefore, we find authors opposing such a correlation, like Alt et al. [2000], Janda et al. [2002] or Yegles et al. [2004], and authors defending its presence [Appenzeller et al., 2007B; Politi et al., 2007; Pragst et al., 2010; Liniger et al., 2010].

However, no document confirming the existence of a correlation between the two suggested markers has been found to confirm the results, as explained in the previous discussion. All authors coincide when it comes to giving possible reasons: the different mechanisms of formation and incorporation into hair. We must remember that FAEEs are incorporated into hair mainly through the sebaceous glands.

Another important aspect when carrying out a correct interpretation of the results is the influence of pigmented hair and cosmetic treatments. EtG can easily be eliminated through washing as it does not bind to hair melanin because of its acid properties and its polarity. The basic substances (pKa 8-10) and the lipophilic molecules (easy penetration through the membranes) accumulate in pigmented hair due to its high affinity for melanin. On the

contrary, EtG is a hydrophilic molecule with a low pKa (3.21; acid properties) causing only small quantities to be detected in hair, which is why its concentration does not differ between pigmented and non pigmented hair [Appenzeller et al., 2007A; Politi et al., 2007; Kulaga et al., 2009; Kharbouche et al., 2010; Pragst et al., 2010; Suesse et al., 2012; SoHT 2012].

On the other hand, another important aspect to be considered is the possibility that the concentrations of the analytes suffer changes induced by cosmetic treatments the hair has undergone. In normal conditions, the cuticle is intact and acts as a barrier against the loss of incorporated substances, but some cosmetic treatments, especially those using acids or strong bases such as bleaching and perms, can lead to alterations in hair. These alterations (damage to the cuticle, changes in the molecular structure of the pigments such as melanin or deterioration of the incorporated substances) mean a decrease in the concentration of analytes present in hair [Jurado, 2007; Morini et al., 2010; Pragst et al., 2010; Maenhout et al., 2013]. Consequently, hair colour must not be taken into account but the influence of cosmetic treatments to make a correct interpretation of the results of the analysis should be considered [FDA, 2009].

On the contrary to what happened in the case of the FAEEs, various authors have suggested the decrease of the concentrations of EtG from the proximal section to the distal.

V.4. Study of fatty acid ethyl esters (FAEEs) in meconium

The carrying out of a method to detect the consumption of ethanol during pregnancy using meconium as its biological matrix allows us to know the possible exposure of such consumption to the fetus. One of the main problems associated with consumption is the appearance of FAS, which, as seen in Section I, implies the appearance of morphological and mental abnormalities in the newborn, as well as the risk of miscarriage during the second quarter of the pregnancy. An early detection would help in the prevention of subsequent problems.

The study of the determination of FAEEs in meconium to evaluate the possible exposure to ethyl alcohol during pregnancy has formed part of the integrated hispanic-italian action between the Istituto di Medicina Legale delle assicurazioni, Università Cattolica del Sacro Cuore (Rome) and our laboratory during the years 2010-2011.

During a one-year period meconium samples from newborns of mothers who were attended at the Complejo Hospitalario Universitario (CHUS) in Santiago de Compostela were collected with previous consent. They were made to sign an informed consent form, which can be seen in Figure 35. The majority of the refusals to participate in the study were basically due to the fear of being placed into a group they denied belonging to or the fear of losing the guardianship of their newborn, despite being an anonymous study.

Consentimiento Informado (*Informed Consent Form*)

Se solicita la participación de su hijo en un estudio de investigación, cuya finalidad radica en evaluar la repercusión que pueda tener sobre los recién nacidos la ingesta de ciertas sustancias durante la gestación por la madre.

Para la realización de dicho estudio, se procederá a la recogida de una muestra de orina y meconio del recién nacido y una muestra de sangre del cordón umbilical. Se realizará así mismo un cuestionario sobre los hábitos maternos durante la gestación.

Usted tiene derecho a conocer los resultados obtenidos en el estudio, y en ningún caso la participación en el mismo supondrá perjuicio alguno. Todos los datos e información recogidos serán tratados con la máxima confidencialidad de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal.

Ante cualquier duda que se pueda plantear al leer este consentimiento, pida que se le explique cualquier término que no entienda.

D/Dña....., con DNI....., padre/madre del paciente.....**expongo** que he sido informado/a por miembro del personal del estudio, en entrevista personal realizada el día

Manifiesto así mismo que he entendido toda la información que me ha sido dada, aclarándose las dudas que han surgido de un modo correcto y satisfactorio.

Por todo ello otorgo mi consentimiento a que se incluya dentro del estudio.

Paciente/representante del menor El médico

Figure 35. Consent form given to expectant mothers who agree to participate in the study.

The women included in this study were interviewed to gather information about their toxic habits, medicine intake, complications during pregnancy etc. The following data was also collected:

❖ Mother's medical record

- Age, marital status
- Mother's illnesses
 - Sexually transmitted diseases (HIV, gonorrhoea, syphilis, HBV, etc.).
 - Other illnesses (psychiatric, neurological, cardiovascular, etc.).
- Clinical or confirmed suspicion of alcoholism
- Gynaecological record
 - Previous: Number of pregnancies (natural or caesarean birth), fertility treatments, general pregnancies, miscarriages, premature birth, withdrawal symptoms, sudden death or any perinatal pathology.
 - Current: Number of prenatal visits, high-risk pregnancy, instrument-assisted birth, caesarean. High blood pressure, preeclampsia, eclampsia, premature prolapse of the placenta or any other pathology.

❖ Newborn medical record

- Weight at birth, week of pregnancy, cranial perimeter, Apgar test.
- Intrauterine foetal growth restriction, neurological alterations, microcephalia, congenital deformities, evidence of withdrawal symptoms or any other contingency.

Out of the 110 meconium samples collected, 68 were divided up to analyse FAEs and EtG, but because of an insufficient sample quantity only 47 were analysed all together. This last metabolite has been evaluated in the Università Cattolica del Sacro Cuore in Rome. Therefore, data for two biological markers of ethanol, FAEs and EtG, have been obtained from the same meconium samples, thus making it possible to carry out the statistical processing of the data in this section via the statistical programme IBM SPSS® Statistics 21.

The population studied included expectant mothers with some type of pathology (preeclampsia, diabetes, HIV, hepatitis, etc) and their newborns, as well as expectant mothers who despite having no pathology gave birth to babies with or without any pathology (jaundice, tachypnea, whining, irritability, etc). The age range of the pregnant women ranged from 25 to 43. All of the expectant mothers had a pregnancy controlled by the Galician Health Service, Sergas. Six percent admitted the chronic or regular use of tobacco during pregnancy and only 3.7% admitted the occasional consumption of alcohol.

Clinical perinatal alterations have been observed in 15 newborns. The percentage distribution of the pathologies found in these 15 newborns is represented in Figure 36. Premature birth has been the most frequently found clinical sign (7 cases). Other pathologies such as respiratory distress (3 cases), deformities (2 cases), IUGR (intrauterine growth restriction; 2 cases), neonatal sepsis, jitteriness (1 case), perinatal depression (1 case) and low weight (1 case) have also been found but in a lower proportion.

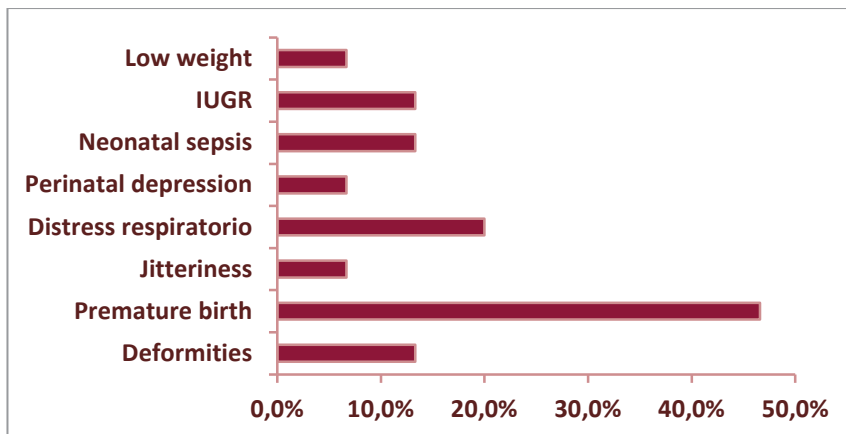


Figure 36. Frequent clinical perinatal alterations.

Traditionally, the extraction methods were based on the method described by Bernhardt et al. [1996]. This consisted of carrying out an ELL and a SPE. Later on, Hutson et al. [2009] developed a new method using HS-SPME to extract ethyl palmitate, stearate, oleate and linoleate, still very much used nowadays.

The most used fibre has been a 65 µm PDMS/DVB except Roehsig et al. [2010], who opted for 100 µm PDMS/DVB, recommended fibre for non polar and volatile compounds. The advantages of this technique, ideal for volatile and semi volatile compounds were a cleaner collection of extracts (matrix interference not extracted) and the use of less toxic solvents.

In order to develop a methodology which would determine the exposure to ethanol during pregnancy different techniques have been tested. The technique selected was microwave assisted extraction because of the good resolution of the chromatographic peaks and the high recoveries obtained. We are dealing with an original method, never used before to separate the compounds of meconium, except in the case of Illán et al. [2011], who used it combined with HS-SPME to extract the FAEEs from skin.

The analytical technique used in the separation of these substances has been GC, ideal because of the low polarity present in the FAEEs. It is not surprising that the majority of the methods published are based on this technique, together with a FID detector or later on a MS detector. In the year 2008 Pichini et al. introduced LC-MS/MS, yet GC-MS is still the most used technique to date [Pichini et al., 2008].

The columns used in GC have basically been two: HP5-MS [Bakdash et al., 2010; Roehsig et al., 2010; Hastedt et al., 2012] or Factor Four [Hutson et al., 2009; Shor et al., 2010; Hutson et al., 2011; Zelner et al., 2012; Zelner et al., 2013].

The carrier gas used has been He, with a 1 mL/min flow, a SIM ionisation and a splitless injection.

The temperature ramp has varied in the different studies published reaching a final temperature of 300°C in all cases.

The validation ranges used by the different authors have reached values between 5.000 and 20.000 ng/g for the ULOQ.

The LOD and LLOQ found in the bibliography also show differences amongst some authors and others. While some suggest a LOD of 15 ng/g [Hutson et al., 2009; Bakdash et al., 2010; Goh et al., 2010], others suggest values ranging from 50-100 ng/g [Ostrea et al., 2006; Gareri et al., 2008; Cabarcos et al., 2012]. The values found for LLOQ follow the same pattern, varying between 30-50 ng/g [Moore et al., 2001; Bakdash et al., 2010; Hutson et al., 2009] and 100 ng/g, the value put forward in this Doctoral Thesis [Cabarcos et al., 2012]. Hutson et al. [2011] and Zelner et al. [2013] have managed to improve these values, suggesting LOD between 3-12 ng/g and LLOQ between 12-35 ng/g.

To correctly interpret the analytical data some cut-off values have been established. In the same way as in the determination of FAEEs in hair, it is considered more efficient to establish the cut-off value as the sum of the analysed FAEEs instead of setting a different one for each individual FAEE because of the variation observed in the individual concentrations of these compounds.

Some authors choose to define a value of 50 ng/g, which corresponds to the accumulation of 7 FAEEs (excluding ethyl laurate and myristate) [Moore et al., 2001; Moore et al., 2003; Derauf et al., 2003; Hutson et al., 2006]. Other authors have established a 2 nmol/g (600 ng/g aprox.) cut-off value for studies of 7 FAEEs. Nevertheless, the same cut-off was suggested for an accumulation of 4 FAEEs [Bakdash et al., 2010]. Bakdash et al. [2010] has set a cut-off of 500 ng/g, slightly lower than the previously suggested as it has included a lower number of FAEEs (16:1, 18:3 y 20:4 were not included in the analysis).

The majority of the authors confirm the fact suggested by Moore et al. [2003]; a total concentration of FAEEs > 10.000 ng/g is indicative of a heavy consumption of alcohol during pregnancy.

As previously shown, a total of 110 meconium samples were collected of which 81 were used for the analysis of FAEEs and 68 for the analysis of EtG. Out of the 81 samples of FAEEs analysed, 30 gave a positive result (with 7 outliers) and 51 gave negative values. On the other hand, 21 positive cases were obtained for EtG and 47 negative ones [Cabarcos et al., 2012].

In order to carry out a statistical study of the correlation between the results of these two metabolites of ethyl alcohol, only 47 have been relied on.

The variability of the resulting data has been the following (Figure 37):

- Number of cases with FAEEs +/EtG +: 7
- Number of cases with FAEEs -/EtG -: 18
- Number of cases with FAEEs -/EtG +: 11
- Number of cases with FAEEs +/EtG -: 11

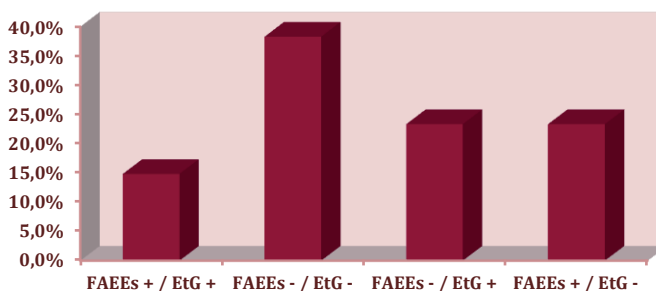


Figure 37. Number of cases of FAEEs and EtG expressed in percentage.

The most difficult data to explain are those in which positive values of EtG and negative values of FAEEs are obtained, as the appearance of EtG implies an abusive consumption of alcohol. A possible explanation could be the enzymatic degradation of the FAEEs or a smaller window of detection of EtG in meconium compared to FAEEs due to its high level of hydrophilia.

The concentrations obtained from the real cases in the analysis of the FAEEs have been much higher than the cut-off value established, which means the LLOQ do not need to reach such low values as those obtained by some authors.

The quantities of sample used in the bibliography have varied between 0.5-1 g, except as of the year 2009 when some authors opted to work with smaller sample quantities.

Regardless of the quantity of the sample taken, the recoveries have fluctuated between 3-33% [Hutson et al., 2009; Roehsig et al., 2010; Shor et al., 2010; Hutson et al., 2011], except for Ostrea et al. [2006], who achieved a performance of 101%. The detection technique used in these cases was GC-MS and the extraction technique SPME, except in the case of Ostrea et al., where SPE was used. The recoveries achieved using LC-MS/MS with quantities of meconium fluctuating between 1-0.5 g were better: 40-95% [Pichini et al., 2008; Algar et al., 2008; Kwak et al., 2010], somewhat similar to the performance achieved in this Doctoral Thesis using GC-MS and MAE. In view of this data, it can be deduced that the recovery levels depend on the extraction technique used, which are considerably worse with the use of SPME.

There is a great difference regarding the compounds of greater concentration found according to the different authors. Consequently, for example, in a study carried out by Bearer et al. in the year 1999, ethyl linoleate was identified as the predominant FAEE in a first study, but in a second study it was ethyl oleate [Bearer et al., 1999].

The majority of the authors coincide in suggesting the presence of ethyl linoleate as an indicative fact of fetal exposure to alcohol in meconium and in excluding ethyl myristate and laurate in the statistical analysis as found in large quantities in non consumer mothers, and therefore considered not indicative of alcohol consumption during pregnancy [Bearer et al., 2003; Chan et al., 2003; Moore et al., 2003; Kaphalia et al., 2004; Bearer et al., 2005; Ostrea et al., 2006; Pichini et al., 2008; Algar et al., 2008; Bakdash et al., 2010; Hastedt et al., 2012]. Other authors do not clarify which was the predominant compound among those of higher concentration. Therefore, Moore et al. [2001], Caprara et al. [2006] and Bakdash et al. [2010] found ethyl palmitate, oleate, stearate and linoleate in high concentrations in the meconium of newborns exposed to large amounts of alcohol. Moore et al. [2003] and Bearer et al. [2003] specified in detail the FAEEs of higher concentration found: ethyl linoleate and palmitate,

followed by oleate and palmitoleate, and finally ethyl stearate and linolenate. Ethyl arachidonate was hardly detected, probably as it is more susceptible to light and heat. However, Ostrea et al. [2006], as well as proposing ethyl linoleate as an indicator of alcohol consumption, also suggested ethyl arachidonate. On the contrary, other authors disagree when proposing ethyl linoleate as the main FAEEs, such as Chan et al. [2003], whose study did not detect ethyl stearate, oleate and linoleate in more than 80% of the analysed samples or Baricelli et al. [2004] and Algar et al. [2008] who found ethyl oleate and palmitoleate as the main ones. Roehsig et al. [2010] found ethyl laurate as the most detected compound even in non consumer mothers. Notwithstanding, ethyl myristate was only found in one sample. These results are contrary to those put forward by Chan et al. [2003], who had detected ethyl myristate in 80% of the samples of meconium analysed from non consumer mothers.

In the study carried out in this Doctoral Thesis we have found ethyl palmitate as the predominant FAEEs and of higher concentration, followed by ethyl myristate, which was the most frequent in the case of non consumer mothers. The development of an analytical methodology introducing ethyl linoleate, palmitate and oleate has turned out to be impossible because of the low signal detected, probably caused by the instability of the compounds (ethyl oleate is sensitive to light; ethyl linoleate must be stored under a nitrogen atmosphere) [Cabarcos et al., 2012].

The data found regarding the correlation also differs from ones to the others. Derauf et al. [2003], Chan et al. [2004B] and Hutson et al. [2006] stated that there was no correlation between maternal alcohol intake and the concentration of FAEEs. Nevertheless, Bearer [2001], Ostrea et al. [2006] and Peterson et al. [2008] did find a significant correlation.

Algar et al. [2008] established the existence of a good correlation between ethyl linolenate, palmitoleate and oleate. In this Doctoral Thesis the

correlation between the 3 FAEEs analysed has been studied, obtaining a strong linear correlation between ethyl palmitate and ethyl stearate. However, the correlation between ethyl myristate and the previous FAEEs adjusted better to other types of non linear correlations.

Let us remember at this point the agreement reached by the majority of the authors: the necessity to contrast the results obtained via the study of FAEEs with the study of other markers, of which EtG is the most used. The study of the correlation between both markers in meconium has only been found in the publication of Bakdash et al. [2010], showing a positive linear relationship. On the contrary, the data produced in this study have shown a very weak correlation.

V.5. Study of phosphatidylethanol (PEth) in blood

The analysis of this biomarker allows us to resolve one of the main problems with the previous markers of alcohol consumption: the concentrations of PEth in blood are highly correlated to the amount of alcohol consumed.

The most abundant species of PEth in abusive drinkers are 16:0/18:1 and 16:0/18:2, giving a 37-46% and 26-28% total phosphatidylethanol in total blood respectively. Other species such as 16:0/20:4 or 18:1/18:1 and 18:0/18:2 represent around 8-13% and 11-12% respectively. The species 16:0/16:0, 16:0/20:3, 18:0/18:1 y 18:1/18:2 have much smaller quantities in total blood, each one representing around 1-5%. The most repeated species in this bibliographical revision has been 16:0/18:1. Genetic influence, alcohol consumption history or metabolic disorders are possible factors causing the appearance of one species or another, the main cause being diet [Viel et al., 2012].

From Table 5 it is concluded that the only extraction technique used to date has been liquid-liquid extraction. This is a traditional technique widely used in Forensic Toxicology with a simple procedure but with certain limitations: laborious technique, formation of emulsions, high consumption of solvents, etc. To resolve these problems, the extraction of PEth using dispersive liquid-liquid microextraction has been suggested. It is a quick extraction, easy to carry out, low cost, with a minimum consumption of organic solvents and high recoveries. Different variables of the extraction process have been optimised using the programme StatGraphics®.

The detection techniques used have been adapting to the new necessities over the years. Thus we go from a first analysis of PEth using thin layer chromatography (TLC) during the 80s, a limited sensitivity technique, to a

liquid chromatography connected to an evaporative light scattering detector (ELSD). This last technique has been the most used in the field of toxicology, covering the end of the 90s to the year 2009, although more recent publications can be found. Its main inconvenient consists of the impossibility to quantify the species separately, determining only the total amount of PEth.

The first and only technique using GC-MS was developed to detect two products originating from the derivatisation process [Changsuek et al., 2000]. This technique was never applied to the analysis of clinical samples probably due to the lack of specific nature of the derivatised products, as the detection of PEth using immunoassays [Nissinen et al., 2008].

The electrophoretic methods based on non-aqueous capillary electrophoresis (NACE) connected to a UV or MS detector have also had a reduced clinical use. More recently, HPLC methods have been developed coupled to mass detectors (MS) or tandem mass spectrometry (MS/MS), the latter being carried out as of the year 2009. The majority use electrospray as a source of ionisation (ESI). This technique permits the identification and quantification of the individual species of PEth, an improvement in the sensitivity which allows us to identify PEth in social drinkers and shorter analysis times. As well as MS coupled to HPLC, some publications have been found in which HPLC connected to a time of flight detector (TOF) was used [Tolonen et al., 2005].

By observing Table 9, we can deduce that to determine PEth with LC it is necessary to work with negative polarity, as it would become a negatively charged species by losing its group proton -OH in basic means.

The volume of samples used has remained constant as of the year 2009, fluctuating between 0.3-0.1 mL of blood.

The columns used by all the authors have been those with non polar fillings. Different varieties have been used: Luna[®], Hypurity[™], Zorbax[®] XDB, etc. With regards to its configuration, all the columns used in the revised bibliography are short columns of 50 mm, which lead to a decrease in the analysis time. The column diameter fluctuates between 2 and 4.6 mm; the smaller the diameter, the greater the sensitivity provided by the chromatographic separation. The porous particle size fluctuates between 1.8 and 5 μm . The efficiency and resolution is improved with a smaller size.

The flows to which these columns were subject to have varied from 0.2 to 0.4 mL/min, with shorter flows predominating. The column temperature has fluctuated around 25-30°C.

In the revised bibliography variations have been observed regarding analysis time, going from 65 min in the year 1998 to fluctuating between 18-10 min since the year 2011.

As the stationary phase is non polar, a polar mobile phase will be used (reversed phase). The mobile phase used in the bibliography consists of the use of ammonium acetate of low concentration and basic pH together with a solvent or mixture of organic solvents in a gradient mode to, thus, improve the efficiency of the column and shorten the duration of the process.

The transitions used for the PEth have been the same for all the authors of the revised bibliography.

The validation of the analytical method includes the study of LOD, LLOQ, recovery, etc, as well as the setting of cut-off values.

Since the year 2009, the first time PEth analysis with LC-MS/MS was carried out, the detection limits and quantification have varied within some

reduced margins, except in the case of Nalesso et al. [2011], who managed to reduce them approximately 10 times with respect to the rest of the authors.

The values for ULOQ have been very inconsistent, from 0.3 µg/mL in the case of Gnann et al. [2012] to 5 µg/mL proposed by Faller et al. [2011]. The value set out in the method developed in this Doctoral Thesis has been 10 µg/mL due to the concentrations of the real cases previously published [Helander et. al., 2009B; Faller et. al., 2011; Cabarcos et al., 2013A].

Regarding recovery, not much data had been found about the performance of the extraction in the revised bibliography. The only reference being 33% obtained by Gnann et al. [2009] or 80% achieved by Nalesso et al. [2011].

The cut-off value set in the study presented has been 30 ng/mL, close to that used by Stewart et al. [2010].

The method developed has been applied to 50 blood samples from the different courts in Galicia. As well as PEth analysis, these samples were subject to the determination of ethanol via GC-FID, a routine analysis in our laboratory. A total of 28 positive cases and 22 negative ones were obtained in the analysis of PEth in blood. The positive results have fluctuated between 0.046 and 1.706 µg/mL [Cabarcos et al., 2013A].

By comparing the data obtained with these two techniques, an agreement close to 100% is obtained. There have only been discrepancies in two cases, showing positive results for ethanol but negative ones for PEth. This result is probably indicative of a sporadic and very recent consumption in these two cases, meaning that not only did not enough time go by for the formation of PEth, but the amount of alcohol was not sufficient for the formation of this molecule. According to Maenhout et al. [2013], PEth is a phospholipid needing

the presence of alcohol in large amounts for its metabolic formation and its presence is indicative of a heavy consumption of alcohol.

References

- Agius R.; Ferreira L.; Yegles M. Can ethyl glucuronide in hair be determined only in 3 cm hair strands? *Forensic Sci Int* 218:3–9 (2012).
- Agius R.; Nadulski T.; Kahl H.; Schräder J.; Dufaux B.; Yegles M.; Pragst F. Validation of a headspace solid-phase microextraction-GC-MS/MS for the determination of ethyl glucuronide in hair according to forensic guidelines. *Forensic Sci Int* 196:3-9 (2010).
- Albermann M.; Musshoff F.; Madea B. A fully validated high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair for the proof of strict alcohol abstinence. *Anal Bioanal Chem* 396:2441-2447 (2010).
- Albermann M.; Musshoff F.; Madea B. Comparison of ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEEs) concentrations in hair for testing abstinence. *Anal Bioanal Chem* 400 (1):175-181 (2011).
- Albermann M.E.; Musshoff F.; Aengenheister L.; Madea B. Investigations on the influence of different grinding procedures on measured ethyl glucuronide concentrations in hair determined with an optimized and validated LC-MS/MS method. *Anal Bioanal Chem* 403:769–776 (2012).
- Alt A.; Janda I.; Seidl S.; Wurst F. Determination of ethyl glucuronide in hair samples. *Alcohol Alcohol* 35 (3):313-314 (2000).
- Álvarez I.; Bermejo A.M.; Cid P.; Tabernero M.J.; Fernández P.; López P. Microwave assisted extraction for the determination of ethyl glucuronide

in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Appl Toxicol* 28:773-778 (2008).

Álvarez I.; Bermejo A.M.; Tabernero M.J.; Fernández P.; Cabarcos P.; López P. Microwave-assisted extraction: a simpler and faster method for the determination of ethyl glucuronide in hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 393:1345-1350 (2009).

Appenzeller B.; Schuman M.; Yegles M.; Wennig R. Ethyl glucuronide concentration in hair is not influence by pigmentation. *Alcohol Alcohol* 42 (4):326-327 (2007A).

Appenzeller B.; Agirman R.; Neuberg P.; Yegles M.; Wennig R. Segmental determination of ethyl glucuronide in hair: a pilot study. *Forensic Sci Int* 173 (2-3):87-92 (2007B).

Auwärter V.; Kiebling B.; Pragst F. Squalene in hair-a natural reference substance for the improved interpretation of fatty acid ethyl ester concentrations with respect to alcohol misuse. *Forensic Sci Int* 145:149-159 (2004).

Auwärter V.; Sporkert F.; Hartwig S.; Pragst F.; Vater H.; Diefenbacher A. Fatty acid ethyl esters in hair as markers of alcohol consumption. Segmental hair analysis of alcoholics, social drinkers and teetotalers. *Clin Chem* 47 (12):2114-2123 (2001).

Bakdash A.; Burger P.; Goecke T.; Fasching P.; Reulbach U.; Bleich S.; Hastedt M.; Rothe M.; Beckmann M.; Pragst F.; Kornhuber J. Quantification of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in meconium from newborns for detection of alcohol abuse in a maternal health evaluation study. *Anal Bioanal Chem* 396:2469-2477 (2010).

- Baricelli J.; Barrera G.; González J.; Leal M.; González D. Niveles de ésteres etil de ácidos grasos (FAEE) y perfil enzimático hepático en sangre cordonal de recién nacidos de madres consumidoras de alcohol. *Salus* 8 (1) (2004).
- Bean P. New findings with ethyl glucuronide testing in hair samples. *American Biotechnology Laboratory* 26 (7):20-21 (2008).
- Bearer C. Markers to detect drinking during pregnancy. *Alcohol Res Health* 25 (3):210-218 (2001).
- Bearer C.; Jacobson J.; Jacobson S.; Barr D.; Croxford J.; Molteno C. Validation of a new biomarker of fetal exposure to alcohol. *J Pediatr* 143:463-469 (2003).
- Bearer C.; Lee S.; Salvator A.; Minnes S.; Swick A.; Yamashita T.; Singer L. Ethyl linoleato in meconium. A biomarker for prenatal ethanol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 23 (3):487-493 (1999).
- Bearer C.; Santiago L.M.; O’Riordan M.; Buck K.; Lee S.; Singer L. Fatty acid ethyl esters: Quantitative biomarkers for maternal alcohol consumption. *J Pediatr* 146:824-830 (2005).
- Bendroth P.; Kronstrand R.; Helander A.; Greby J.; Stephanson N.; Krantz P. Comparison of ethyl glucuronide in hair with phosphatidylethanol in whole blood as post-mortem markers of alcohol abuse. *Forensic Sci Int* 176:76-81 (2008).
- Bernhardt T.; Cannistraro P.; Bird D.; Doyle K.; Laposata M. Purification of fatty acid ethyl esters by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 675:189-196 (1996).

Cabarcos P.; Álvarez I.; Bermejo A.M.; Tabernero M.J.; López P.; Fernández P. Analysis of fatty acid ethyl esters in hair by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Anal Lett* 42:2962-2977 (2009).

Cabarcos P.; Cocho J.A.; Moreda A.; Míguez M.; Tabernero M.J.; Fernández P.; Bermejo A.M. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of phosphatidylethanol in blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* 111:189-195 (2013A).

Cabarcos P.; Hassan H.; Tabernero M.J.; Scott K. Analysis of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). *J Appl Toxicol* 33 (7):638-643 (2013B).

Cabarcos P.; Tabernero M.J.; Álvarez I.; Míguez M.; Fernández P.; Bermejo A.M. A new method for quantifying prenatal exposure to ethanol by microwave-assisted extraction (MAE) of meconium followed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Anal Bioanal Chem* 404 (1):147-155 (2012).

Caprara D.; Brien J.F.; Iqbal U.; Reynolds J.N.; Klein J.; A Guinea pig model for the identification of in utero alcohol exposure using fatty acid ethyl esters in neonatal hair. *Pediatr Res* 58 (6):1158-1163 (2005B).

Caprara D.; Klein J.; Koren G. Baseline measures of fatty acid ethyl esters in hair of neonates born to abstaining or mild social drinking mothers. *Ther Drug Monit* 27 (6):811-815 (2005A).

Caprara D.; Klein J.; Koren G. Diagnosis of fetal alcohol spectrum disorder (FASD): fatty acid ethyl esters and neonatal hair analysis. *Ann Ist Super Sanità* 42 (1):39-45 (2006).

Caprara D.; Nash K.; Greenbaum R.; Rovet J.; Koren G. Novel approaches to the diagnosis of fetal alcohol spectrum disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 31:254-260 (2007).

Chan D.; Bar-Oz B.; Pellerin B.; Paciorek C.; Klein J.; Kapur B.; Farine D.; Koren G. Population baseline of meconium fatty acid ethyl esters among infants of nondrinking women in Jerusalem and Toronto. *Ther Drug Monit* 25:271-278 (2003).

Chan D.; Caprara D.; Blanchette P.; Klein J.; Koren G. Recent developments in meconium and hair testing methods for the confirmation of gestational exposures to alcohol and tobacco smoke. *Clin Biochem* 37:429-438 (2004B).

Chan D.; Knie B.; Boskovic R.; Koren G. Placental handling of fatty acid ethyl esters. Perfusion and subcellular studies. *J Pharmacol Exp Ther* 310 (1):75-82 (2004A).

Changsuek Y.; Han J. Analysis of trimethylsilyl derivatization products of phosphatidylethanol by gas chromatography-mass spectrometry. *Exp Mol Med* 32 (4):243-245 (2000).

Concheiro M.; Cruz A.; Mon M.; de Castro A.; Quintela O.; Lorenzo A.; López-Rivadulla M. Ethyl glucuronide determination in urine and hair from alcohol withdrawal patients. *J Anal Toxicol* 33 (3):155-161 (2009).

Consensus of the Society of Hair Testing (SoHT) on hair testing for chronic excessive alcohol consumption 2011.

<http://www.soht.org/pdf/Revised%20Alcohol%20marker%20Consensus.pdf>

Derauf C.; Katz A.; Easa D. Agreement between maternal self-reported ethanol intake and tobacco use during pregnancy and meconium assays for fatty acid ethyl esters and cotinine. *Am J Epidemiol* 158 (7):705-709 (2003).

Faller A.; Richter B.; Kluge M.; Koenig P.; Seitz H.; Thierauf A.; Gnann H.; Winkler M.; Mattern R.; Skopp G. LC-MS/MS analysis of phosphatidylethanol in dried blood spots versus conventional blood specimens. *Anal Bioanal Chem* 401:1163-1166 (2011).

Food and Drug Administration (FDA). Guidance for industry. Bioanalytical method validation. U.S. Department of health and human services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM) (2001).

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>

García-Algar O.; Kulaga V.; Gareri J.; Koren G.; Vall O.; Zuccaro P.; Pacifici R.; Pichini S. Alarming prevalence of fetal alcohol exposure in a mediterranean city. *Ther Drug Monit* 30 (2):249-254 (2008).

Gareri J.; Lynn H.; Handley M.; Rao C.; Koren G. Prevalence of fetal ethanol exposure in a regional population based sample by meconium analysis of fatty acid ethyl esters. *Ther Drug Monit* 30 (2):239-245 (2008).

Giovanni N.; Donadio G.; Chiarotti M. Ethanol contamination leads to fatty acid ethyl esters in hair samples. *J Anal Toxicol* 32:156-159 (2008).

Giovanni N.; Donadio G.; Chiarotti M. The reliability of fatty acid ethyl esters (FAEE) as biological markers for the diagnosis of alcohol abuse. *J Anal Toxicol* 31:93-97 (2007).

Gnann H.; Weinmann W.; Engelmann C.; Wurst F.; Skopp G.; Winkler M.; Thierauf A.; Auwärter V.; Dresen S.; Bourzas N. Selective detection of phosphatidylethanol homologues in blood as biomarkers for alcohol consumption by LC-ESI-MS/MS. *J Mass Spectrom* 44:1293-1299 (2009).

Gnann H.; Weinmann W.; Thierauf A. Formation of phosphatidylethanol and its subsequent elimination during an extensive drinking experiment over 5 days. *Alcohol Clin Exp Res* 36 (9):1507-1510 (2012).

Goh Y.; Hutson J.; Lum L.; Roukema H.; Gareri J.; Lynn H.; Koren G. Rates of fetal alcohol exposure among newborns in a high-risk obstetric unit. *Alcohol* 44:629-634 (2010).

Hartwig S.; Auwärter V.; Pragst F. Fatty acid ethyl esters in scalp, pubic, axillary, beard and body hair as markers for alcohol misuse. *Alcohol* 38 (2):163-167 (2003).

Hastedt M.; Bossers L.; Krumbiegel F.; Herre S.; Hartwig S. *Forensic Sci Med Pathol* 9(2):184-193 (2013).

Hastedt M.; Herre S.; Pragst F.; Rothe M.; Hartwig S. Workplace alcohol testing program by combined use of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters in hair. *Alcohol Alcohol* 47 (2):127-132 (2012).

Hastedt M.; Krumbiegel F.; Gapert R.; Tsokos M.; Hartwig S. *Forensic Sci Med Pathol* DOI 10.1007/s12024-012-9385-3.

Helander A.; Böttcher M.; Fehr C.; Dahmen N.; Beck O. Detection times for urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate in heavy drinkers during alcohol detoxification. *Alcohol Alcohol* 44 (1):55-61 (2009A).

Helander A.; Zheng Y. Molecular species of the alcohol biomarker phosphatidylethanol in human blood measured by LC-MS. *Clin Chem* 55 (7):1395-1405 (2009B).

Hutson J. Meconium fatty acid ethyl esters and prediction of fetal alcohol effects. *JFAS Int* 4:15 (2006).

Hutson J.; Aleksa K.; Pragst F.; Koren G. Detection and quantification of fatty acid ethyl esters in meconium by headspace-solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 877:8-12 (2009).

Hutson J.; Rao C.; Fulga N.; Aleksa K.; Koren G. An improved method for rapidly quantifying fatty acid ethyl esters in meconium suitable for prenatal alcohol screening. *Alcohol* 45:193-199 (2011).

Illán F.; Ojeda-Torres G.; Díaz-Vázquez L.; Rosario O. Detection of fatty acid ethyl esters in skin surface lipids as biomarkers of ethanol consumption in alcoholics, social drinkers, light drinkers and teetotalers using a methodology based on microwave-assisted extraction followed by solid-

phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 35:232-237 (2011).

Isaksson A.; Walther L.; Hansson T.; Andersson A.; Alling C. Phosphatidylethanol in blood (B-PEth): a marker for alcohol use and abuse. *Drug Test Analysis* 3:195-200 (2011).

Janda I.; Weinmann W.; Kuehnle T. Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC-MS/MS. *Forensic Sci Int* 128:59-65 (2002).

Jurado Montoro C. Análisis de drogas de abuse en muestras de pelo. *Diagnóstico del consumo crónico. Trastornos Adictivos* 9(3):172-83 (2007).

Kaphalia B.; Cai P.; Khan F.; Okorodudu A.; Ansari G. Fatty acid ethyl esters: markers of alcohol abuse and alcoholism. *Alcohol* 34:151-158 (2004).

Kerekes I.; Yegles M.; Grimm U.; Wennig R. Ethyl glucuronide determination. Head hair versus non-head hair. *Alcohol Alcohol* 44 (1):62-66 (2009).

Kharbouche H.; Sporkert F.; Troxler S.; Augsburger M.; Mangin P.; Christian C. Development and validation of a gas chromatography-negative chemical ionization tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair and its application to forensic toxicology. *J Chromatogr B* 877:2337-2343 (2009).

Kharbouche H.; Steiner N.; Morelato M.; Staub C.; Boutrel B.; Mangin P.; Sporkert F.; Augsburger M. Influence of ethanol dose and pigmentation on the incorporation of ethyl glucuronide into rat hair. *Alcohol* 44 (6):507-514 (2010).

- Kinnunen P.M.; Lange L.G. Identification and quantification of fatty acid ethyl esters in biological specimens. *Anal Biochem* 140 (2):567-576 (1984).
- Kintz P.; Villain M.; Vallet E.; Etter M.; Salquebre G.; Cirimele V. Ethyl glucuronide: unusual distribution between head hair and pubic hair. *Forensic Sci Int* 176:87-90 (2008).
- Kintz, P. Consensus of the Society of Hair Testing (SoHT) on hair testing for chronic excessive alcohol consumption 2009. *Forensic Sci Int* 196 (2) (2010).
- Klein J.; Karaskov T.; Gideon K. Fatty acid ethyl esters. A novel biologic marker for heavy in utero ethanol exposure. A case report. *Ther Drug Monit* 21 (6):644 (1999).
- Klys M.; Scislawski M.; Rojek S.; Kolodziej J. A fatal clomipramine intoxication case of a chronic alcoholic patient: Application of postmortem hair analysis method of clomipramine and ethyl glucuronide using LC-APCI/MS. *Legal Medicine* 7:319-325 (2005).
- Kronstrand R.; Brinkhagen L.; Nyström F. Ethyl glucuronide in human hair after daily consumption of 16 or 32 g of ethanol for 3 months. *Forensic Sci Int* 215:51-55 (2012).
- Kulaga V.; Caprara D.; Iqbal U.; Kapur B.; Klein J.; Reynolds J.; Brien J.; Koren G. Fatty acid ethyl esters (FAEE): comparative accumulation in human and guinea pig hair as a biomarker for prenatal alcohol exposure. *Alcohol* 41 (5):534-539 (2006).

- Kulaga V.; Velazquez-Armenta Y.; Aleksa K.; Vergee Z.; Koren G. The effect of hair pigment on the incorporation of fatty acid ethyl esters (FAEE). *Alcohol Alcohol* 44 (3):287-292 (2009).
- Kwak H.; Kang Y.; Han K.; Moon J.; Chung Y.; Choi J.; Han J.; Kim M.; Velázquez-Armenta Y.; Nava-Ocampo A. Quantitation of fatty acid ethyl esters in human meconium by an improved liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 878:1871-1874 (2010).
- Lamoureux F.; Gaulier J.M.; Sauvage F.L.; Mercerolle M.; Vallejo C. Determination of ethyl glucuronide in hair for heavy drinking detection using liquid-chromatography-tandem mass spectrometry following solid phase extraction. *Anal Bioanal Chem* 394:1895-1901 (2009).
- Liniger B.; Nguyen A.; Friedrich-Koch A.; Yegles M. Abstinence monitoring of suspected drinking drivers: ethyl glucuronide in hair versus CDT. *Traffic Injury Prevention* 11:123-126 (2010).
- Mac E.; Pacis M.; García G.; Ostrea E.M. A marker of fetal exposure to alcohol by meconium analysis. *Pediatr Res* 35:238A (1994).
- Maenhout T.; Buyzere M.; Delanghe J. Non-oxidative ethanol metabolites as a measure of alcohol intake. *Clin Chim Acta* 415:322-329 (2013).
- Malkowska A.; Szutowski M.; Dyr W. Deposition of ethyl glucuronide in WHP rat hair after chronic ethanol intake. *Pharmacol Rep* 64: 586-593 (2012).
- Moore C. Fatty acid ethyl esters in meconium. Biomarkers for the detection of alcohol exposure in neonates. *Clinica Chimica Acta* 312:235-237 (2001).

- Moore C.; Jones J.; Lewis D.; Buchi K. Prevalence of fatty acid ethyl esters in meconium specimens. *Clin Chem* 49 (1):133-136 (2003).
- Morini L.; Politi L.; Acito S.; Groppi A.; Poletini A. Comparison of ethyl glucuronide in hair with carbohydrate-deficient transferrin in serum as markers of chronic high levels of alcohol consumption. *Forensic Sci Int* 188:140-143 (2009).
- Morini L.; Zucchella A.; Poletini A.; Politi L.; Groppi A. Effect of bleaching on ethyl glucuronide in hair. An in vitro experiment. *Forensic Sci Int* 198:23-27 (2010).
- Musshoff F. Chromatographic methods for the determination of markers of chronic and acute alcohol consumption. *J Chromatogr B* 781:457-480 (2002).
- Nalesso A.; Viel G.; Cecchetto G.; Mioni D.; Pessa G.; Favretto D.; Ferrara S. Quantitative profiling of phosphatidylethanol molecular species in human blood by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1218:8423-8431 (2011).
- Nissinen A.; Mäkelä S.; Vuoristo J.; Liisanantti M.; Hannuksela M.; Hörkkö S.; Savolainen M. Immunological detection of in vitro formed phosphatidylethanol- An alcohol biomarker- with monoclonal antibodies. *Alcohol Clin Exp Res* 32 (6):921-928 (2008).
- Ostrea E.; Hernandez J.; Bielawski D.; Kan J.; Leonardo G.; Abela M.; Church M.; Hannigan J.; Janisse J.; Ager J.; Sokol R. Fatty acid ethyl esters in meconium. Are they biomarkers of fetal alcohol exposure and effect? *Alcohol Clin Exp Res* 30 (7):1152-1159 (2006).

- Peterson J.; Kirchner L.; Minnes S.; Singer L.; Bearer C. Fatty acid ethyl esters in meconium are associated with poorer neurodevelopmental outcomes to two years of age. *J Pediatr* 152 (6):788-792 (2008).
- Pianta A.; Liniger B.; Baumgartner M.R. Ethyl glucuronide in scalp and non-head hair: an intra-individual comparison. *Alcohol Alcohol* 1-8 (2013).
- Pichini S.; Pellegrini M.; Gareri J.; Koren G.; García-Algar O.; Vall O.; Vagnarelli F.; Zuccaro P.; Marchei E. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for fatty acid ethyl esters in meconium. Assessment of prenatal exposure to alcohol in two European cohorts. *J Pharmaceut Biomed Anal* 48:927-933 (2008).
- Politi L.; Mari F.; Furlanetto S.; Del Bravo E.; Bertol E. Determination of fatty acid ethyl esters in hair by GC-MS and application in a population of cocaine users. *J Pharmaceut Biomed Anal* 54:1192-1195 (2011).
- Politi L.; Morini L.; Leone F.; Poletini A. Ethyl glucuronide in hair: is it a reliable marker of chronic high levels of alcohol consumption? *Addiction* 101:1408-1412 (2006).
- Politi L.; Zucchella A.; Morini L.; Stramesi C.; Poletini A. Markers of chronic alcohol use in hair: comparison of ethyl glucuronide and cocaethylene in cocaine users. *Forensic Sci Int* 172:23-27 (2007).
- Pragst F.; Auwärter V.; Sporkert F.; Spiegel K. Analysis of fatty acid ethyl esters in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Forensic Sci Int* 121:76-88 (2001).

Pragst F.; Balikova M.A. State of the art in hair analysis for detection of drugs and alcohol abuse. *Clin Chim Acta* 370:17-49 (2006).

Pragst F.; Rothe M.; Moench B.; Hastedt M.; Herre S.; Simmert D. Combined use of fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide in hair for diagnosis of alcohol abuse: Interpretation and advantages. *Forensic Sci Int* 196:101-110 (2010).

Pragst F.; Spiegel K.; Sporkert F.; Bohnenkamp. Are there possibilities for the detection of chronically elevated alcohol consumption by hair analysis? A report about the state of investigation. *Forensic Sci Int* 107:201-223 (2000).

Pragst F.; Yegles M. Determination of fatty acid ethyl esters (FAEEs) and ethyl glucuronide (EtG) in hair. A promising way for retrospective detection of alcohol abuse during pregnancy? *Ther Drug Monit* 30 (2):255-263 (2008).

Rainio J.; De Giorgio F.; Bortolotti F.; Tagliaro F. Objective post-mortem diagnosis of chronic alcohol abuse. A review of studies on new markers. *Legal Medicine* 10:229-235 (2008).

Roehsig M.; Louzada de Paula D.; Moura S.; Albuquerque D.; Yonamine M. Determination of eight fatty acid ethyl esters in meconium samples by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Sep Sci* 33:2115-2122 (2010).

Schröder J.; Rothe M.; Pragst F. Ethyl glucuronide concentrations in beard hair after a single alcohol dose: evidence for incorporation in hair root. *Int J Legal Med* 126:791-799 (2012).

Shor S.; Nulman I.; Kulaga V.; Koren G. Heavy in utero ethanol exposure is associated with the use of other drugs of abuse in a high-risk population. *Alcohol* 44:623-627 (2010).

Skopp G.; Schmitt G.; Pötsch L.; Dröner P.; Aderjan R.; Mattern R. Ethyl glucuronide in human hair. *Alcohol* 35 (3):283-285 (2000).

Stewart S.; Law T.; Randall P.; Newman R. Phosphatidylethanol and alcohol consumption in reproductive age women. *Alcohol Clin Exp Res* 34 (3):488-492 (2010).

Suesse S.; Pragst F.; Mieczkowski T.; Selavka C.M.; Elian A.; Sachs H.; Hastedt M.; Rothe M.; Campbell J. Practical experiences in application of hair fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide for detection of chronic alcohol abuse in forensic cases. *Forensic Sci Int* 218 (1-3):82-91 (2012).

Sübe S.; Selavka C.; Mieczkowski T.; Pragst F. Fatty acid ethyl ester concentrations in hair and self-reported alcohol consumption in 644 cases from different origin. *Forensic Sci Int* 196:111-117 (2010).

Tarcomnicu I.; Van Nuijs A.; Aerts K.; De Doncher M.; Covaci A.; Neels H. Ethyl glucuronide determination in meconium and hair by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 196:121-127 (2010).

Tavakoli H.; Hull M.; Okasinski M. Review of current clinical biomarkers for the detection of alcohol dependence. *Innovations in Clinical Neuroscience* 8 (3):26-33 (2011).

Tolonen A.; Lehto T.; Hannuksela M.; Savolainen M. A method for determination of phosphatidylethanol from high density lipoproteins by reversed-phase HPLC with TOF-MS detection. *Anal Biochem* 341:83-88 (2005).

Use of alcohol markers in hair for abstinence assessment 2012. Consensus of the Society of Hair Testing.

<http://www.soht.org/pdf/Use%20of%20Alcohol%20Markers%20in%20Hair%20for%20Abstinence%20Assessment%202012.pdf>

Viel G.; Boscolo-Berto R.; Cecchetto G.; Fais P.; Nalesso A.; Ferrara S. Phosphatidylethanol in blood as a marker of chronic alcohol use: A systematic review and meta-analysis. *Int J Mol Sci* 13:14788-14812 (2012).

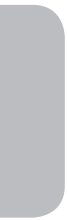
Wojcik M.; Hawthorne J. Sensitivity of commercial ethyl glucuronide (EtG) testing in screening for alcohol abstinence. *Alcohol Alcohol* 42 (4):317-320 (2007).

Wurst F.; Alexson S.; Wolfersdorf M.; Bechtel G.; Forster S.; Alling C.; Aradóttir S.; Jachau K.; Pragst F. Concentration of fatty acid ethyl esters in hair of alcoholics: comparison to other biological state markers and self reported ethanol intake. *Alcohol Alcohol* 39 (1):33-38 (2004).

Yegles M.; Labarthe A.; Auwärter V.; Hartwig S.; Vater H.; Wennig R.; Pragst F. Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters concentration in hair of alcoholics, social drinkers and teetotallers. *Forensic Sci Int* 145 (2-3):167-173 (2004).

Zelner I.; Hutson J.; Kapur B.; Feig D.; Koren G. False-positive meconium test results for fatty acid ethyl esters secondary to delayed sample collection. *Alcohol Clin Exp Res* 36 (9):1497-1505 (2012).

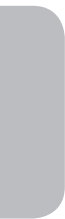
Zelner I.; Kenna K.; Brien J.; Bocking A.; Harding R.; Walker D.; Koren G.
Meconium fatty acid ethyl esters as biomarkers of late gestational ethanol exposure and indicator of ethanol-induced multi-organ injury in fetal sheep. PLOS ONE 8 (3):1-10 (2013).



SECCIÓN VI. CONCLUSIONES

SECTION VI. Conclusions





FIRST The high specific nature of the direct markers of the alcohol consumption studied (fatty acid ethyl esters, ethyl glucuronide and phosphatidylethanol) has been proved via the development of four sensitive and reproducible analytical methods, using blood, meconium and hair as biological matrices.

SECOND The extraction procedure used to determine the fatty acid ethyl esters in hair has been solid phase microextraction (SPME). The fibre used has been 65 µm polydimethylsiloxane/divinylbenzene, whose filling is appropriate for the adsorption of semi volatile lipophilic compounds. The main advantage of this technique lies in the greater concentration of the analyte, making it extremely useful when there is a small sample quantity. Furthermore, due to the low polarity of the compounds, gas chromatography coupled to mass spectrometry has been the best option in its determination. It has not been possible to determine ethyl oleate, palmitoleate and linoleate because of their instability.

THIRD The analytical method developed has been applied to 22 real samples from social drinkers, alcoholics and teetotallers to determine the fatty acid ethyl esters in hair. In general, greater concentrations of ethyl palmitate than the other two compounds analysed have been obtained. However, in the cases of an abusive consumption of alcohol, ethyl myristate was predominant. This data coincides with the data found by other authors.

FOURTH Microwave assisted extraction (MAE) has been used for the first time to determine the fatty acid ethyl esters in meconium, developing this technique for its extraction. MAE has proved to be simple, quick and economical, with great advantages compared to other techniques used to determine this complex sample. The subsequent analysis of the fatty acid ethyl esters in meconium has been carried out using gas chromatography coupled

with a mass spectrometry, ideal because of the low polarity of the compounds studied, thus obtaining a good resolution of the chromatographic peaks and high recovery of the analytes.

FIFTH This method has been applied to 81 samples of meconium, 30 of which were positive, with maximum concentrations of 20 µg/g. Out of the 81 newborns included in the study, 15 presented clinical perinatal alterations, of which premature birth was the most common. Ethyl palmitate has been the most frequent compound and of greater concentration detected, followed by ethyl myristate. Nevertheless, the latter has been the most repeated in non consumer mothers.

SIXTH Due to the variability of the concentrations of fatty acid ethyl esters separately, the cut-off value has been set as the sum of ethyl myristate, ethyl palmitate and ethyl stearate. To avoid the appearance of false positives or negatives, confirmation of the results through the study of the other direct markers of ethanol is recommended.

SEVENTH An extraction procedure to determine ethyl glucuronide in hair using solid phase extraction, with Oasis® MAX cartridges and a methanol/formic acid mixture (98:2) as eluent has been developed. The analysis method developed has used liquid chromatography multiple mass spectrometry (LC-MS/MS), which has allowed a good chromatographic resolution with high sensibility.

EIGHTH The method has been applied to 72 real hair samples, some belonging to individuals with known alcohol problems. Twenty-four percent of the cases were positive with concentrations reaching 653 pg/mg. Because of the possible influence of some capillary treatments that can lead to false negative results, we recommend contrasting the results with those of another

marker of alcohol consumption; the most recommended being fatty acid ethyl esters.

NINTH The extraction of phosphatidylethanol (PEth) has been carried out using dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME). An extraction technique used for the first time for this type of analysis, proving to be a quick technique, easy to use, low cost, low consumption of organic solvents and high recoveries. Its main advantage lies in the fact that the efficiency of the extraction does not depend on time. The liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry has been the most used technique, thus avoiding the need to derivatise the compound. The species of phosphatidylethanol analysed in the method proposed has been 16:0/18:1, which is considered the most abundant amongst abusive drinkers.

TENTH The method developed to determine phosphatidylethanol has been applied to 50 real samples of blood received in our laboratory for analysis. Fifty-six percent of the cases turned out positive, with concentrations fluctuating between 0.046 and 1.706 $\mu\text{g/mL}$.

ELEVENTH The validation parameters of the analytical methods developed to determine fatty acid ethyl esters, ethyl glucuronide and phosphatidylethanol have followed FDA recommendations.

TWELFTH The statistical analysis carried out on the data obtained from the analysis of the fatty acid ethyl esters in meconium samples has shown a different type of correlation between the three compounds studied. A strong linear correlation has been established between ethyl palmitate and ethyl stearate. To establish a relationship between ethyl myristate with ethyl palmitate and ethyl stearate, it has been observed that the goodness of fit improves by using a different model: quadratic or inverse relationship

respectively. However, the statistical correlation between these three compounds and ethyl glucuronide taken from the joint analysis of them in meconium samples shows a very weak rising tendency.

