



FACULTAD DE MEDICINA

**Departamento de Anatomía Patológica
y Ciencias Forenses**

**LA ENERGÍA DE MICROONDAS APLICADA A
LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS
BIOLÓGICAS. INVESTIGACIÓN DE DROGAS
DE ABUSO Y PSICOFÁRMACOS**



MARTA LAGO GONTAD

**Memoria para optar al Grado de Doctor
Santiago de Compostela, Abril de 2014**



FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias Forenses



LA ENERGÍA DE MICROONDAS APLICADA A LA
PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.
INVESTIGACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y
PSICOFÁRMACOS

MARTA LAGO GONTAD

Memoria para optar al Grado de Doctor

Santiago de Compostela, Abril de 2014



DÑA. PURIFICACIÓN FERNÁNDEZ GÓMEZ, CATEDRÁTICA DE TOXICOLOGÍA, **DÑA. ROSA ANTONIA LORENZO FERREIRA**, PROFESORA TITULAR DE QUÍMICA ANALÍTICA Y **DÑA. ANTONIA MARÍA CARRO DÍAZ**, PROFESORA TITULAR DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA,

Informan:

Que la presente memoria, titulada **“La energía de microondas aplicada a la preparación de muestras biológicas. Investigación de drogas de abuso y psicofármacos”**, que presenta la Licenciada en Química **Marta Lago Gontad** para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias Forenses de la Facultad de Medicina y, a su juicio, reúne todos los requisitos exigidos por la normativa vigente para ser presentada y juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman el presente informe en Santiago de Compostela, a 25 de Abril de 2014.

Purificación Fernández Gómez

Rosa Antonia Lorenzo Ferreira

Antonia María Carro Díaz



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las tres directoras de esta tesis doctoral, Purificación Fernández Gómez, Catedrática de Toxicología de la Universidad de Santiago de Compostela, Rosa Antonia Lorenzo Ferreira y Antonia María Carro Díaz, ambas Profesoras Titulares de Química Analítica de la misma Universidad, por haberme dado la oportunidad de realizar este estudio y sobre todo por sus ánimos, su ayuda y sus sabios consejos, sin los cuales no hubiera podido finalizar este trabajo. Ellas confiaron en mí en todo momento, me proporcionaron su valiosa experiencia y conocimientos y siempre han estado disponibles para todo cuanto necesité.

También me gustaría agradecer al Ministerio de Ciencia y Tecnología y a la Xunta de Galicia, por la concesión de sendos Proyectos de Investigación (Referencias: BFI2002-03385 y 10PXIB208089PR), que ayudaron a la financiación de este trabajo.

A las Profesoras Ana María Bermejo y María Jesús Taberero por sus aportaciones durante todos los años en los que llevé a cabo la etapa de investigación.

A mis compañeros de laboratorio Iván, Teresa, Patricia, Cathy, Daniel, Santi, Martha, Oscar, Marta y Ana, con los que compartí muchas horas durante la realización de mi trabajo experimental, por su ayuda desinteresada y por crear un agradable ambiente de trabajo.

A mis padres por su apoyo incondicional. Sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

A mi familia y amigos por animarme a continuar cuando más lo necesitaba.





A mis padres



ÍNDICE

ACRÓNIMOS.....	1
RESUMEN.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	7
I.1. OPIÁCEOS	9
I.1.1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	11
I.1.2. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS	12
I.1.3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS	16
I.1.4. TOXICIDAD, DEPENDENCIA Y ABUSO.....	18
I.1.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
I.2. COCAÍNA.....	23
I.2.1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	26
I.2.2. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS	27
I.2.3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS	28
I.2.4. TOXICIDAD, DEPENDENCIA Y ABUSO.....	30
I.2.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
I.3. BENZODIACEPINAS.....	34
I.3.1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	35
I.3.2. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS	37
I.3.3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS	38
I.3.4. TOXICIDAD, DEPENDENCIA Y ABUSO.....	41
I.3.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
I.4. MATRICES BIOLÓGICAS	44
I.4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA SANGRE/PLASMA.....	45
I.4.2. CARACTERÍSTICAS DE LA ORINA	47
I.4.3. CARACTERÍSTICAS DE LA SALIVA	48
I.4.4. CARACTERÍSTICAS DEL PELO.....	50
I.4.5. CARACTERÍSTICAS DEL HUMOR VÍTREO	52
I.4.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
I.5. METODOLOGÍA ANALÍTICA	59
I.5.1. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS	59
I.5.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA-DETECTOR DE RED DE DIODOS.....	63

I.5.3.	DISEÑOS EXPERIMENTALES	65
I.5.4.	VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS	70
I.5.5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
I.6.	DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y BENZODIACEPINAS EN MATRICES BIOLÓGICAS. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	75
I.6.1.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
II.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	115
III.	SECCIÓN EXPERIMENTAL. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	121
III.1.	DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	121
III.1.1.	Aplicación de la extracción asistida por microondas y la cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos (MAE/HPLC- DAD) para la determinación de drogas de abuso en plasma humano	123
III.1.2.	Análisis de drogas de abuso en orina por cromatografía líquida de alta resolución, previa optimización de su extracción asistida por microondas mediante diseño experimental	139
III.1.3.	Comparación de dos procedimientos de extracción (LLE y MAE) para la determinación de drogas de abuso en saliva usando cromatografía líquida de alta resolución	157
III.1.4.	Optimización de un método rápido de extracción asistida por microondas para la determinación cromatográfica de drogas ilegales en pelo	171
III.2.	DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PSICOFÁRMACOS EN MATRICES BIOLÓGICAS ..	193
III.2.1.	Determinación cromatográfica de benzodiazepinas en humor vítreo después de optimizar su extracción asistida por microondas usando diseño experimental	195
IV.	CONCLUSIONES	213
	ANEXO. Publicaciones Científicas derivadas de la Tesis Doctoral.....	217

ACRÓNIMOS

6AM: 6 acetilmorfina

ACN: Acetonitrilo

ADVP: Adictos a drogas por vía parenteral

ALP: Alprazolam

ANOVA: Analysis Of Variance (Análisis de varianza)

APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Ionización química a presión atmosférica)

API: Atmospheric Pressure Ionization (Ionización a presión atmosférica)

BEG: Benzoilecgonina

BZD: Benzodiazepinas

BRO: Bromacepam

CCD: Central Composite Design (Diseño central compuesto)

CET: Cocaetileno

COC: Cocaína

COD: Codeína

CV: Coeficiente de variación

DAD: Diode Array Detector (Detector de red de diodos)

DDZ: Desmetildiazepam

DZP: Diazepam

EDDP: 2-etil-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina

EMDP: 2-etil-5-metil-3,3-difenilpirrolidina

EME: Ecgonina metil éster

ESI: ElectroSpray Ionization (Ionización electrospray)

ETG: Etil glucurónido

FDA: Food and Drug Administration

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GC-MS: Gas Chromatography-Mass Spectrometry

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

ICH: International Conference of Harmonization

LC-MS: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry


LLE: Liquid-Liquid Extraction (Extracción líquido-líquido)

LLOQ: Lower Limit Of Quantification (Límite inferior de cuantificación)
LOD: Limit Of Detection (Límite de detección)
LOQ: Limit Of Quantification (Límite de cuantificación)
LOR: Loracepam
LORM: Lormetacepam
MAE: Microwave Assisted Extraction (Extracción asistida por microondas)
MET: Metadona
MHz: Megahercios
MRP: Morfina
MS: Mass Spectrometry (Espectrometría de masas)
MSTFA: N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida
OMS: Organización Mundial de la Salud
PDA: PhotoDiode Array detector (Detector de red de fotodiodos)
QP: Quality Pressure
RSD: Relative Standard Deviation (Desviación estándar relativa)
S/R: Relación señal-ruido
SAMHSA: Substance Abuse and Mental Health Services Administration
SEMFYC: Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria
SNC: Sistema nervioso central
SPE: Solid Phase Extraction (Extracción en fase sólida)
TETRA: Tetracepam
TFA: Ácido trifluoroacético
THC: Tetrahidrocannabinol
THF: Tetrahidrofurano
THCA: 11-nor-Delta9-tetrahidrocannabinol-9-ácido carboxílico
TOF: Time Of Flight (Tiempo de vuelo)
UHPLC: Ultra High Performance Liquid Chromatography
UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography
UV: Ultravioleta
VIS: Visible

RESUMEN

El objetivo de esta Tesis Doctoral es el desarrollo y la validación de metodologías analíticas eficaces, simples y de bajo coste para la determinación de sustancias psicoactivas en diferentes muestras biológicas utilizadas habitualmente en laboratorios de análisis toxicológico y clínico. Las sustancias que se estudian pertenecen a dos grandes grupos: *drogas de abuso* (morfina, 6-acetilmorfina, codeína, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metadona y EDDP) y *benzodiazepinas* (alprazolam, bromacepam, loracepam, lormetacepam, diacepam y tetracepam). Todas ellas actúan sobre el Sistema Nervioso Central como estimulantes o depresores. En la actualidad, el elevado e indiscriminado consumo de benzodiazepinas, unido a la ausencia de un correcto seguimiento de su prescripción, las convierte en drogas de abuso, con consecuencias negativas para la salud pública y el bienestar de la sociedad. La necesidad de disponer de métodos analíticos fiables para el control de estas drogas ha propiciado la investigación y puesta a punto de procedimientos de preparación de muestra, basados en la extracción asistida por microondas (MAE), y técnicas de determinación cromatográfica empleando la cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos (HPLC-DAD). Desde el punto de vista de la química verde, la MAE ofrece ventajas sobre las extracciones convencionales, tales como un menor consumo de disolventes y una breve manipulación, además de una reducción de la cantidad de muestra y del tiempo de extracción. La aplicación de estos métodos se ha realizado con éxito en numerosos casos de intoxicación, analizando diversos tipos de muestras biológicas: plasma, orina, pelo, saliva y humor vítreo. Cada una de ellas presenta sus propias características farmacocinéticas y de accesibilidad, aportando información sobre la detección y cuantificación de estas sustancias en los controles toxicológicos clínicos y forenses.



The image features a large, light blue watermark of the USC logo, which is a diamond shape containing the letters 'USC' and the text 'UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA'.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, cada cultura y cada sociedad ha desarrollado e integrado en el seno de su comunidad el consumo de sustancias tóxicas o semitóxicas con fines terapéuticos, mágicos, religiosos, recreativos, etc. Sin embargo, no ha sido hasta el siglo XX, por la confluencia de una serie de factores económicos y culturales, cuando han aparecido problemas derivados del consumo abusivo de sustancias tóxicas, alcanzando una importancia y una alarma social totalmente justificadas.

El consumo de drogas de abuso supone un problema importante para cualquier sociedad, ya que conlleva una serie de consecuencias negativas como son la pérdida de productividad, el aumento de la criminalidad y los problemas en materia de salud, debido al contagio de enfermedades infecciosas como el sida y la hepatitis B y a los costes derivados de los tratamientos de deshabituación a las drogas. Además, al contrario de lo que se podría pensar, el abuso de drogas no está restringido a un solo sector de la población sino que abarca a todos los niveles de la sociedad constituyendo una grave problemática sobre la que se debe hacer hincapié tanto a nivel político como social.

Recientemente, la OMS declaró como droga de abuso toda sustancia que introducida en un organismo vivo es capaz de actuar sobre el sistema nervioso central, provocando una alteración física y/o psicológica, la experimentación de nuevas sensaciones o la modificación de un estado psíquico, es decir, capaz de cambiar el comportamiento de la persona, y que posee la capacidad de generar dependencia y tolerancia en sus consumidores.

Sin embargo, la vía de administración de la droga es un elemento muy importante porque tiene una consecuencia directa sobre la rapidez con que se instaura la dependencia:

- Vía parenteral (intravenosa, intramuscular y subcutánea): es la vía que produce efectos más inmediatos. La intravenosa es la preferida para consumir *heroína*.
- Vía pulmonar: usada para la nicotina, cannabis y *cocaína crack*.
- Vía intranasal: usada para la *cocaína*.
- Vía oral: usada para *benzodicepinas*, anfetaminas, drogas de diseño y alcohol.

Las Figuras 1 y 2 muestran la evolución de la proporción de muertes y/o de urgencias relacionadas con el consumo de drogas y/o sustancias psicoactivas.

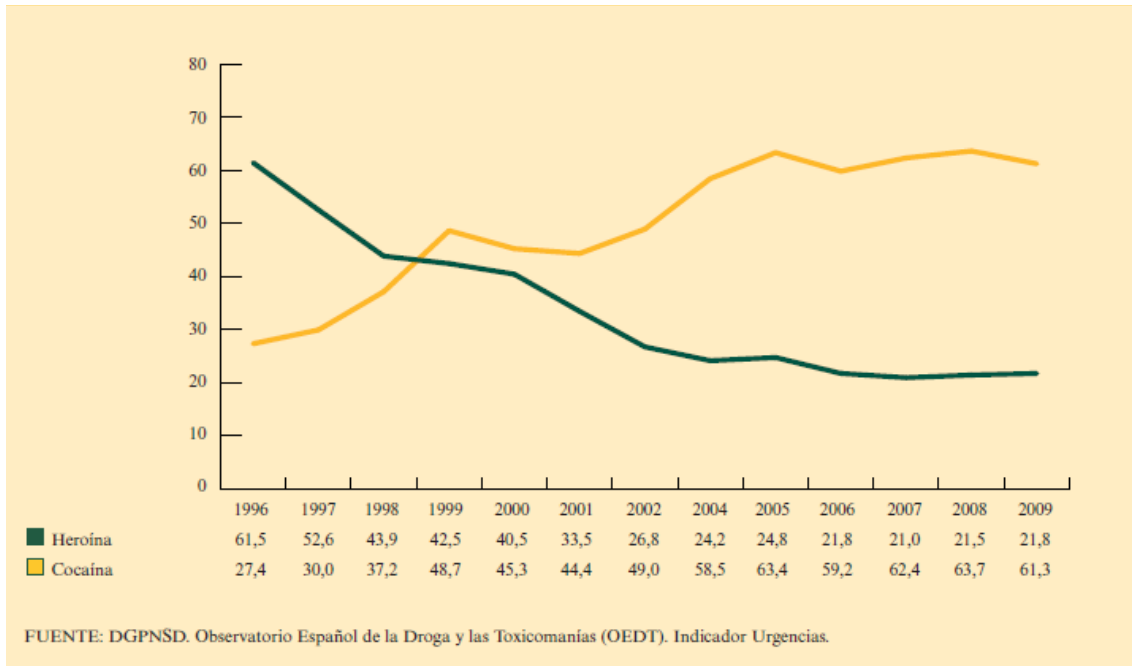


Figura 1. Evolución de la proporción de urgencias relacionadas con el consumo de drogas (%). España, 1996-2009.

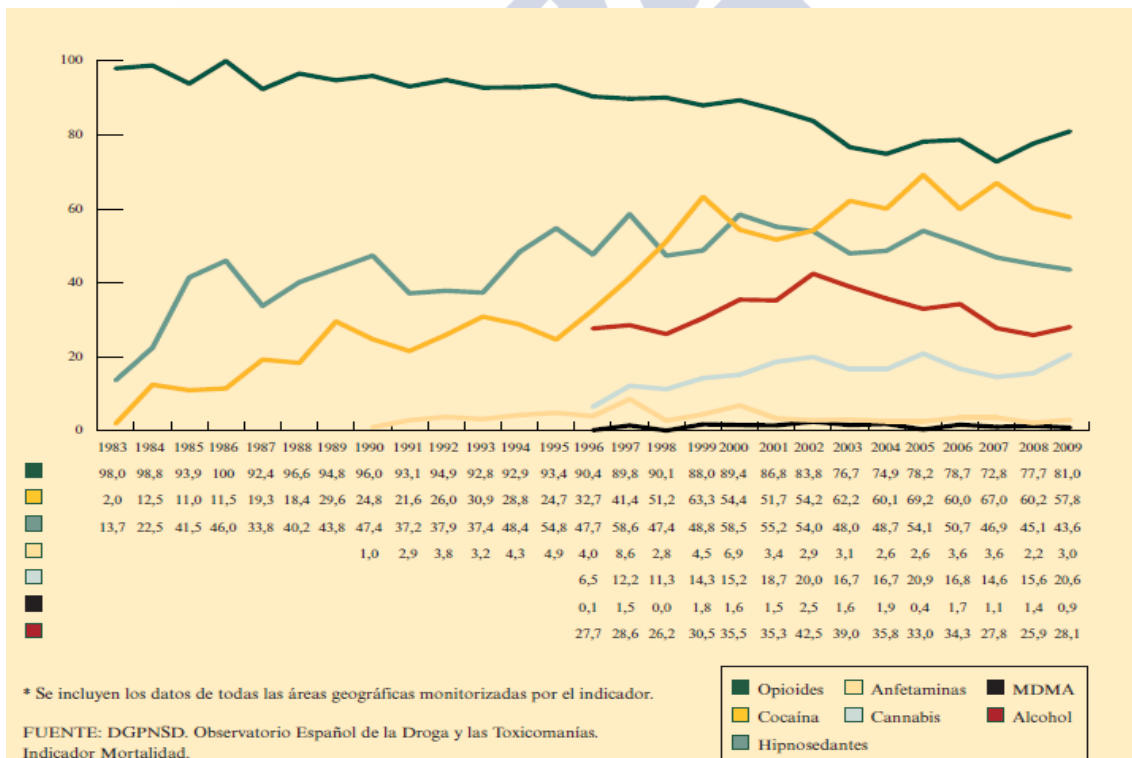


Figura 2. Evolución de la proporción de muertes por reacción aguda tras el consumo de sustancias psicoactivas según el tipo de sustancia detectada en el análisis toxicológico. España, 1983-2009.

I.1. OPIÁCEOS

Actualmente el número de europeos consumidores de opiáceos que son considerados problemáticos está entre 1.2 y 1.5 millones (edades comprendidas entre los 15-64 años). Además, el número de muertes inducidas por el consumo de drogas representan el 4% de todas las defunciones de europeos de 15 a 39 años de edad, habiéndose encontrado opiáceos en unas tres cuartas partes de las mismas. La heroína es la droga principal de consumo en el 50% de las solicitudes de tratamiento [Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, 2011].

La heroína es sin duda el opiáceo más consumido en España, destacando en los últimos años un descenso de su consumo (Figura 3). En efecto, el número de urgencias directamente relacionadas con drogas en las que se mencionó el uso de heroína pasó de 61.5% en 1996 a 24.2% en 2004. Sin embargo, este descenso se ha estabilizado en los años posteriores, observándose un aumento en el número de estudiantes de 14-18 años que han consumido heroína alguna vez en la vida (0.5% en 1994 a 1.0% en 2006). Estos datos parecen indicar que el problema está tocando fondo, pero es necesario estar alerta porque el consumo de estas drogas puede volver a aumentar, ocasionando situaciones peligrosas para la salud humana [Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías, 2011].

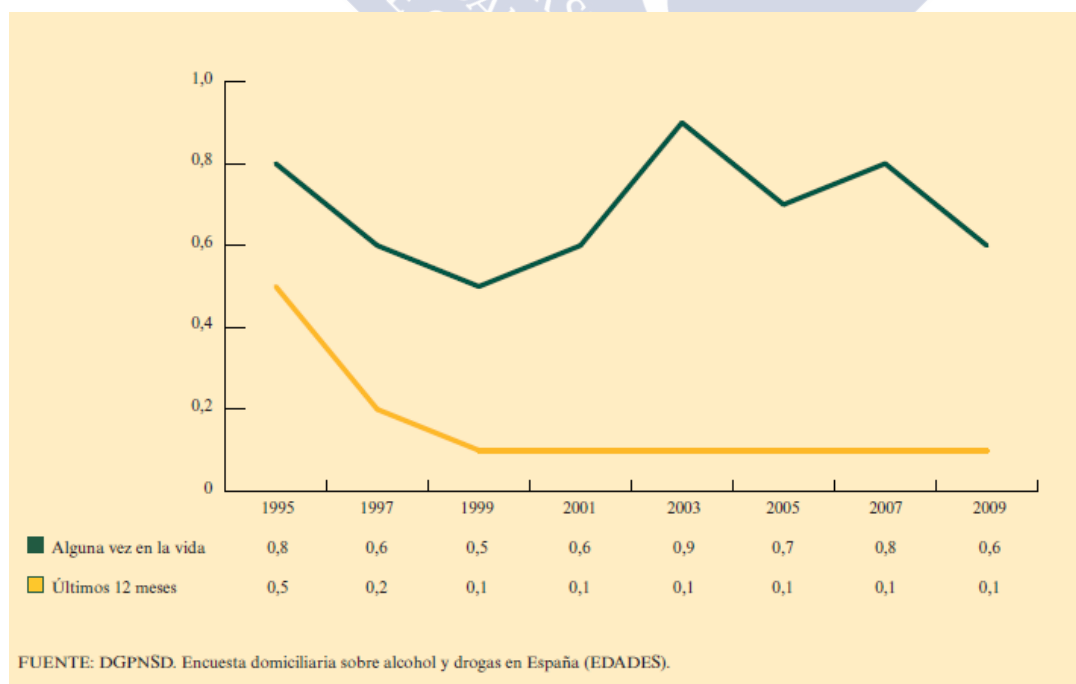


Figura 3. Evolución de las prevalencias de consumo de heroína alguna vez en la vida y últimos doce meses en la población de 15-64 años. España, 1995-2009.

Los opiáceos son las drogas terapéuticas más antiguas que se conocen pues ya existen referencias de los efectos beneficiosos del opio en el año 1500 a.C. El opio es una resina que se obtiene de los frutos de la adormidera (*papaver somniferum*) (Figuras 4 y 5) y contiene más de veinte alcaloides, aunque solo tres están presentes en una cantidad significativa: morfina, codeína y tebaína. El más abundante es la morfina (10%), la principal responsable de sus efectos y a partir del cual se obtienen codeína, heroína y 6acetilmorfina. Aunque el cultivo de esta planta para usos legales se produce principalmente en Australia y los países mediterráneos, la adormidera se cultiva principalmente en terrenos montañosos tropicales como el sudeste, centro y sur de Asia, México y Colombia [Brunton y col, 2006; Levine, 2003].



Figura 4. Cápsula de adormidera.



Figura 5. Papaver somniferum.

En sus orígenes las drogas se obtenían por extracción del opio de la planta, y sus usos eran únicamente terapéuticos para el tratamiento del dolor, la ansiedad, tos, etc. No fue hasta principios del siglo XIX cuando se comenzó a experimentar con el opio intentando separar sus componentes activos. En 1806 se aisló la morfina, que se comercializó pronto debido a su gran utilidad médica [Gómez, 2006]. Pero a finales del mismo siglo comenzaron los problemas relacionados con la adicción y el abuso de esta sustancia. En 1874, Wright logró sintetizar una serie de derivados acetilados de la morfina, entre ellos la heroína. Rápidamente se descubrieron lo que se creían propiedades beneficiosas de esta sustancia, ya que, al igual que la morfina, disminuía el ritmo respiratorio y la presión sanguínea, pero carecía de su efecto adictivo. Por ello, en 1898 la empresa alemana Bayer comenzó a producir la heroína comercialmente; sin embargo en 1920 empezaron las prohibiciones de esta sustancia en USA

y en la mayoría de los países, debido a su carácter adictivo [De la Fuente y col, 1996; De la Fuente y col, 1998; UNODC, 2004]. Posteriores avances dieron lugar a otras sustancias totalmente sintéticas como la metadona que, aunque pueden presentar o no similitudes estructurales con los opiáceos, poseen efectos similares a éstos. Por ello se incluyen dentro de los denominados opioides [Dart, 2004].

La heroína rara vez se consume pura; la administración en forma de preparaciones ilícitas o papelinas (Figura 6) es la más frecuente, con una pureza variable (10-20%), excipientes tales como azúcares, y adulterantes como la quinina, cafeína, analgésicos y/o anestésicos locales [Domínguez y col, 1991; Kaa, 1994]. Las formas de abuso varían según los distintos opiáceos [Lorenzo y col, 1999]: en un tratamiento médico, obteniendo la droga por cauces legales; uso experimental o recreativo en jóvenes, por vía parenteral; consumo de metadona por vía oral en tratamientos de deshabituación a la heroína [Warner-Smith y col, 2001].



Figura 6. Heroína en distintas formas: marrón, blanca, papelinas.

I.1.1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Los opiáceos que presentan un mayor interés debido a su incidencia son los derivados de la morfina. Éstos se clasifican como alcaloides y su estructura química básica está formada por el grupo fenantreno, el cual está constituido por tres anillos bencénicos condensados, unido a un anillo piperidina. Si se sustituyen las posiciones 3 y 6 de los anillos con sendos grupos hidroxilo se obtiene la molécula de la morfina, a partir de la modificación de estas dos posiciones se obtienen muchos de los opiáceos conocidos.

La *morfina* se presenta como un polvo blanco cristalino. Su fórmula estructural es $C_{17}H_{19}NO_3$ y su peso molecular es 285.4 g/mol. Su punto de fusión es 254-256°C y su pK_a es 8.0 a 20°C. Se puede encontrar en forma de sal, como acetato, tartrato, sulfato o clorhidrato.

La *codeína* es un polvo blanco cristalino que fluoresce débilmente y al que afecta la luz. Su fórmula estructural es $C_{18}H_{21}NO_3$ y su peso molecular es 299.4 g/mol. Tiene un punto de fusión de 154-156°C y su pK_a es 8.2 a 20°C. Se puede encontrar en forma de sal, como sulfato, fosfato o clorhidrato.

La *heroína* o diacetilmorfina es sintetizada a partir de la morfina por acetilación en las posiciones 3 y 6 sobre los hidroxilos. Se presenta en forma de cristales blancos. Su fórmula estructural es $C_{21}H_{23}NO_3$ y su peso molecular es 369.4 g/mol. Su punto de fusión es aproximadamente 170°C y su pK_a es 7.6 a 23°C. Se hidroliza rápidamente en presencia de álcalis. Si se encuentra en forma de sal como clorhidrato de heroína tiene un punto de fusión de 229°C a 233°C.

La *metadona* deriva de la difenilpropilamina. Su fórmula estructural es $C_{21}H_{27}NO$ y su peso molecular es 309.4 g/mol. Su punto de fusión es 78°C. El clorhidrato de metadona es un cristal incoloro o polvo blanco cristalino, con un punto de fusión de 235°C y un pK_a de 8.3 a 20°C. La molécula de metadona (6-dimetilamino-4,4-difenilheptan-3-ona) presenta un único átomo quiral de carbono (C6) que justifica la existencia de un par de estereoisómeros, aunque casi toda la actividad opioide se debe al isómero L [Moffat y col, 2004; Karch y Drummer, 2009].

I.1.2. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS

Morfina: Se puede administrar por todas las vías excepto la dérmica y la sublingual. Su biodisponibilidad oral es baja (20-30%) y la concentración plasmática máxima se alcanza 1 hora después de la dosis. Por vía intramuscular su acción se inicia a los 20 minutos y el efecto máximo se obtiene al cabo de 1 hora. La morfina se distribuye rápidamente (volumen de distribución: 3-5 L/Kg) y su unión a proteínas plasmáticas es de 20-40%. Aproximadamente un 5% de la dosis es N-desmetilada a normorfina, la cual es menos activa como analgésico. La mayor parte de la droga es inactivada por su conversión a morfina-3-glucurónido, y un 10% se transforma en morfina-6-glucurónido [Osborne y col, 1990] (Figura 7). La excreción es renal, principalmente como derivados conjugados, eliminándose por heces

un 5-10% [Lorenzo y col, 1999]. La vida media de eliminación es de 2-3 horas, y pueden detectarse en orina todos los metabolitos, así como pequeñas cantidades de morfina inalterada [Glare y Walsh, 1991; Ladrón de Guevara y Moya Pueyo, 1995; Baselt, 2011].

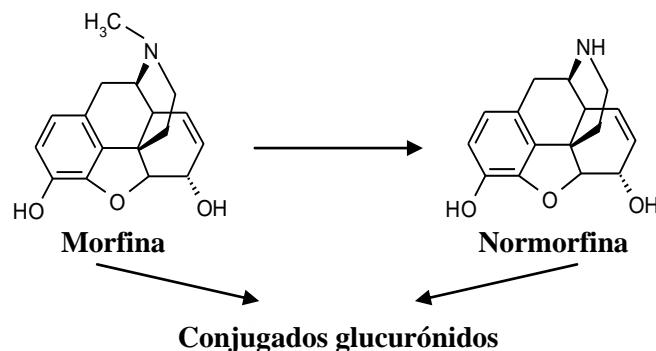


Figura 7. Metabolismo de la morfina.

Codeína: Su vía de administración preferente es la oral. La potencia por vía parenteral es 10 veces menor que la de la morfina. Sin embargo, por vía oral tiene el 60% de la eficacia de la vía parenteral, a diferencia de la morfina. La administración intravenosa puede desencadenar hipotensión grave, lo que no debe confundirse con la intoxicación típica por opiáceos. El metabolismo de la codeína tiene lugar por O-desmetilación a morfina (10% de la dosis), su metabolito activo al que debe su efecto analgésico, y por N-desmetilación a norcodeína (Figura 8). Un 95% de la dosis se excreta en la orina de las primeras 24 horas [Baselt, 2011; Lotsch y col, 2004].

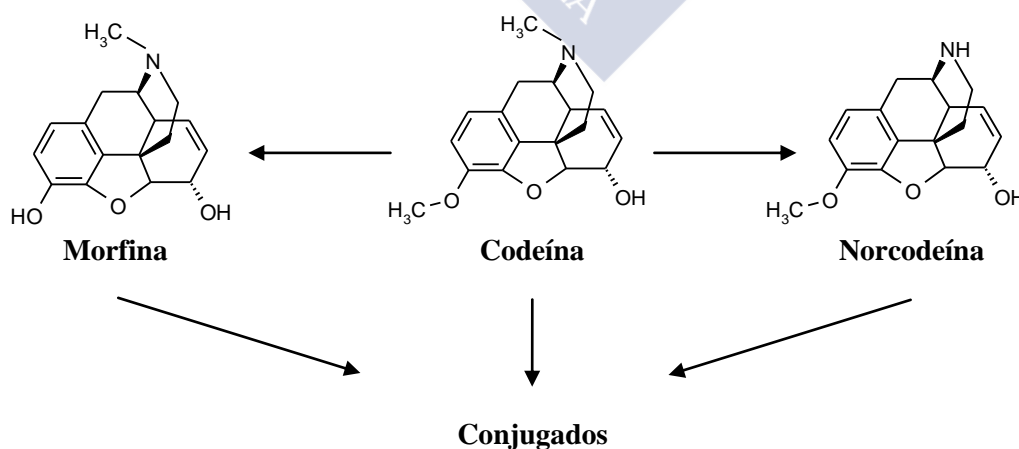


Figura 8. Metabolismo de la codeína.

Heroína: Es susceptible de administrarse por las mismas vías que la morfina pero además puede fumarse, alcanzando una biodisponibilidad entre 40% (inhhalada) y 90% (fumada), y un efecto máximo después de 2-15 minutos. Su biodisponibilidad por vía oral es inferior a la de la morfina y no se detecta ni heroína ni 6acetilmorfina (6AM) en plasma, solo aparece morfina. Después de su administración parenteral, la heroína como tal persiste en el cerebro solo unos minutos; sin embargo tras 30 minutos se encuentran altas concentraciones de 6AM y morfina, que son las responsables de la mayor parte de la actividad narcótica de la heroína. Esta droga se desacetila rápidamente a 6AM y ésta a morfina (Figura 9), por lo que su detección en sangre y orina es difícil, de forma que un 70% de la dosis excretada por vía renal se elimina en forma de glucurónidos: un 45% de una dosis intravenosa se recupera como metabolitos en la orina de 24 horas. Las vidas medias de heroína y 6AM son de 3 y 40 min, respectivamente [Gyr y col, 2000; Girardin y col, 2003; Bencharit y col, 2003; Rook y col, 2006].

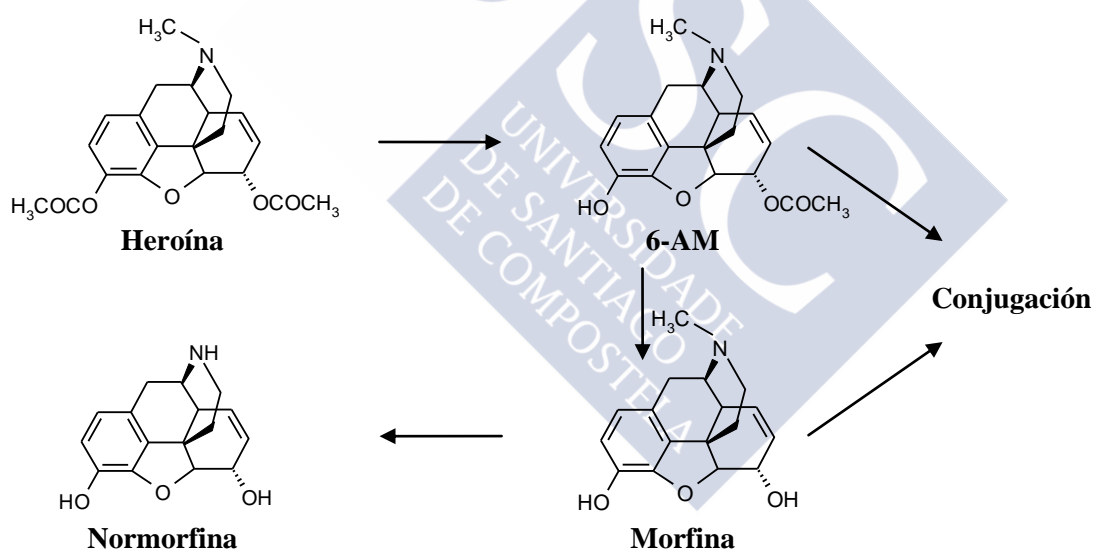


Figura 9. Metabolismo de la heroína.

El abuso de heroína es inequívocamente identificado por su metabolito desacetilado, la 6-acetilmorfina, pero su corta vida media de eliminación (40 min) limita el tiempo de detección a 2-8 horas, pues se transforma rápidamente a morfina, que está presente en orina durante varios días después del consumo.

La presencia de codeína en orina está relacionada con la contaminación de las muestras ilícitas de heroína. Una fracción pequeña (10%) se transforma en morfina, de la cual se pueden encontrar fracciones tanto libre como conjugada. Por esta razón algunas veces no es posible distinguir entre consumo de heroína, morfina o codeína. La presencia de morfina sola en orina indica exposición a heroína o morfina, mientras que la detección de codeína con bajas concentraciones de morfina indica consumo de codeína.

Metadona: Su biodisponibilidad oral es del 80%, se detecta en plasma después de 30 minutos y la concentración plasmática máxima se alcanza a las 2-4 horas postconsumo. Es lipófila y está muy unida a proteínas plasmáticas (90%) y tisulares, de forma que alcanza una concentración de equilibrio en el plasma, prolongando sus efectos en pacientes que reciben una dosis diaria. Es metabolizada mediante N-desmetilación, seguida de ciclación espontánea, resultado de la inestabilidad de los metabolitos: 2-etilen-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP) y 2-etil-5-metil-3,3-difenilpirrolidina (EMDP). Los tres compuestos son hidroxilados en la posición para de uno de los anillos fenilo con la consiguiente conjugación glucurónida (Figura 10). La cantidad de metadona excretada es mayor en orinas ácidas, y se ha demostrado que la vida media de la droga puede pasar de 18 a 40 horas cuando un pH muy ácido pasa a un pH muy alcalino. Metadona y EDDP son los principales productos excretados en la orina de las primeras 24 horas, representando un 5% de la dosis administrada [Seidenberg y Honegger, 2000; Eap y col, 2002; Leikin y Paloucek, 2008].

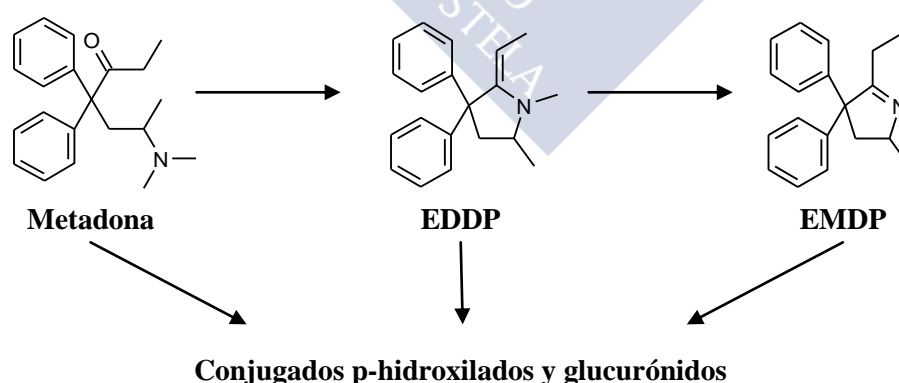


Figura 10. Metabolismo de la metadona.

I.1.3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Normalmente los opiáceos se utilizan como anestésicos primarios en la cirugía cardiovascular para minimizar la depresión cardíaca. Debido a su acción directa sobre la medula espinal, los opiáceos también se usan como anestésicos locales mediante su inyección directa en la columna. Aunque existen numerosos opiáceos en el mercado farmacéutico la morfina sigue siendo uno de los analgésicos de elección en el tratamiento del dolor intenso, tanto agudo como crónico, y si se administra por vía oral puede llevar a un largo periodo de actuación porque el mecanismo de acción es más lento cuando se usa esta vía. Una dosis de 10 mg suprime el dolor, reduce las sensaciones desagradables y produce sedación con sensación de bienestar y euforia; si se aumenta la dosis pueden aparecer sopor y sueño. Los opiáceos afectan tanto a la componente sensorial como a la afectiva del dolor y también pueden producir sedación, apatía, reducción de la agudeza visual y de la actividad física, y letargo. Sin embargo, existe una componente de excitación [Ladrón de Guevara y Moya Pueyo, 1995; Levine, 2003; Moffat y col, 2004].

La codeína se emplea como antitusígeno y analgésico y crea menos dependencia que la morfina y la heroína. Su uso como sustancia de abuso es restringido, aunque la mayor facilidad para obtenerla en los circuitos legales y su asociación con otras sustancias hace que la codeína sea uno de los opiáceos potencialmente implicados en cuadros de abuso.

La heroína fue introducida en terapéutica como un antitusígeno y analgésico supuestamente desprovisto de la acción adictiva, lo que la haría útil como alternativa a la morfina. Es evidente que en este último aspecto el descubrimiento de la heroína constituyó un fracaso terapéutico. La heroína y su metabolito activo la 6-acetilmorfina son muy liposolubles, por lo que penetran en el cerebro más fácilmente que la morfina; a esto se debe su intenso efecto analgésico.

La metadona es un analgésico opiáceo de origen sintético y fue desarrollada como sustituto de la morfina. Aunque químicamente difieren, la potencia analgésica y otras propiedades son muy similares (miosis, depresión respiratoria). Suprime los síntomas de abstinencia en sujetos dependientes de opiáceos [Rang y col, 2012].

Los términos opiáceo y opioide se suelen utilizar de forma indistinta, pero desde el punto de vista farmacológico, opiáceo se refiere a los productos derivados del opio (morfina, codeína, tebaína, papaverina, etc.), mientras que la terminología opioide se utiliza para

designar aquellas sustancias endógenas o exógenas, con afinidad por receptores opioides, que tienen un efecto análogo al de la morfina (heroína, metadona, buprenorfina) [Seidenberg y Honegger, 2000]. Los opiáceos actúan sobre el sistema nervioso central (SNC) mediante la interacción con lugares de unión específicos situados principalmente en la región del cerebro, la médula espinal y sistema gastrointestinal. Esto da lugar a la mayoría de los efectos farmacológicos de la morfina y análogos. Estas drogas actúan de forma similar a ciertas sustancias endógenas que son analgésicos naturales, ubicados en la parte del cerebro donde están los receptores opioides específicos, liberándose al resto del cuerpo para modular el dolor. Cuando los opiáceos se unen a receptores específicos de la médula espinal inhiben la liberación de neurotransmisores excitatorios y de otros relacionados con el dolor en los nervios de la médula espinal, por tanto el efecto de estas sustancias sobre el sistema nervioso central es el de un potente analgésico [Levine, 2003].

Existen tres tipos principales de receptores opioides según su situación y su función, éstos se clasifican en receptores μ , receptores δ y receptores κ . Los *receptores μ* son los responsables de las acciones analgésicas y de otros efectos no deseados, como la depresión respiratoria, miosis, reducción de la actividad gastrointestinal, efectos euforizantes, sedación y dependencia psicológica. Los *receptores δ* propician también efectos, como analgesia, depresión respiratoria, euforia y dependencia; los opiáceos más significativos tienen una actividad muy débil sobre estos receptores. Los *receptores κ* actúan sobre la médula espinal, por tanto son mediadores de la analgesia espinal y la sedación, y producen una pequeña dependencia física [Zinder y Pasternak, 2003; Waldhoer y col, 2004; Ward y col, 2006]. Según su afinidad con los receptores mencionados, los opiáceos se dividen en:

Agonistas puros, que se comportan como agonistas preferentes y, en ocasiones, selectivos sobre los receptores μ . Son la morfina, heroína y metadona.

Agonistas-antagonistas, son capaces de actuar sobre más de un tipo de receptor opioide, en concreto los receptores μ y κ . Sobre el receptor κ se comportan como agonistas, mientras que sobre el receptor μ lo hacen como antagonistas. Entre ellos se encuentran la pentazocina, butorfanol y nalorfina.

Antagonistas puros, muestran afinidad por los receptores opioides principales μ , δ y κ , pero carecen de actividad sobre los mismos. Son la naloxona y naltrexona [Schumacher y col, 2004; Rang y col, 2012].

I.1.4. TOXICIDAD, DEPENDENCIA Y ABUSO

La intoxicación por opioides presenta una tríada clásica de signos: alteración del nivel de conciencia, miosis intensa y depresión respiratoria. También puede darse bradicardia, hipotensión, náuseas, vómitos, cambios en la motilidad intestinal, hipo e hipertermia, y cianosis en la fase tardía de la sobredosis. Las complicaciones más frecuentes son el edema agudo de pulmón no cardiogénico, convulsiones, rabdomiolisis, arritmias e infecciones (neumonía, endocarditis). El uso concomitante con otras drogas de abuso puede provocar síntomas distintos y de mayor gravedad. La sintomatología de la intoxicación por heroína es similar a la que produce cualquier otro opiáceo pero se desarrolla de una forma más rápida y con mayores efectos a nivel del SNC. El pronóstico de la intoxicación por heroína es malo, con baja tasa de deshabituación y alta mortalidad a corto plazo. La causa de la muerte suele estar mediada por tres efectos: patología respiratoria, problemas cardiacos y fracaso renal, y en la mayoría de los casos fatales se han detectado 6AM, y morfina libre y/o conjugada, indicando las dos últimas el tiempo transcurrido desde la inyección de heroína [Ehret y col, 2006; Fano y col, 2007; Hussain y Ewer, 2007].

La dosis letal mínima de heroína es de 20 mg, pero sujetos adictos pueden tolerar cantidades 10 veces mayores. La morfina, en dosis superiores a 0.5 mg/Kg por vía oral ó 0.2 mg/Kg por vía parenteral, puede producir parada respiratoria. Las intoxicaciones por codeína son bastante raras en nuestro ámbito ya que la depresión del SNC es mucho menor y no ocasiona dependencia; se puede establecer la dosis letal de codeína en 0.5 - 1 g. En el caso de la metadona, es difícil predecir cuál es la dosis mortal [Karch y Drummer, 2009], puesto que la droga se redistribuye antes y después de la muerte y suele consumirse junto con otras drogas [Mushoff y col, 2004; Corkery y col, 2004; Drummer, 2007]. Se considera que, en sujetos no habituados la dosis letal de metadona es de 50 mg en adultos.

Las primeras experiencias con opioides pueden ser desagradables por la presencia de náuseas y vómitos, pero con rapidez se desarrolla tolerancia a la sensación emética, dando paso a la euforia. La inyección intravenosa produce efectos muy placenteros, seguidos de euforia lo que propicia la aparición de dependencia y rápidamente un fenómeno de tolerancia. Con el tiempo, los períodos entre las sucesivas administraciones cursan con una sintomatología cada vez más intensa, que explica la necesidad de una nueva dosis. La adicción a opiáceos se caracteriza por el desarrollo de tolerancia, dependencia y una

sensibilización que induce vulnerabilidad frente a las recaídas. Esta situación tiene lugar particularmente con aquellos compuestos que presentan actividad sobre receptores μ , tales como la heroína, morfina, meperidina, fentanilo y metadona.

En general, los opiáceos desarrollan tolerancia con relativa rapidez para los efectos depresores y mucho menos para la miosis y la actividad gastrointestinal. El desarrollo de la adicción a opiáceos implica una serie de cambios adaptativos en los receptores opioides del cerebro, lo que induce una alteración de diversos sistemas neuroquímicos en regiones específicas del cerebro [Simonato, 1996; Williams y col, 2001; Nestler, 2001 y 2002; Crowley y col, 2003; Law y Nutt, 2003]. La tolerancia a estas sustancias se desarrolla a sus efectos analgésico, euforizante, sedante y depresor de la respiración, pero no a la miosis y el estreñimiento. El mecanismo por el que se produce la tolerancia y la dependencia a las drogas se cree que es debido a una reducción en el número de receptores μ y en la eficiencia del acoplamiento entre el receptor y sus respuestas bioquímicas. La tolerancia a los opiáceos puede tener lugar muy rápidamente y ser muy relevante, de modo que una dosis intravenosa de 20 mg de morfina podría ser letal para un paciente no habituado a su consumo. Sin embargo, 2 g de esta sustancia podrían ser tolerados por una persona que desarrolló tolerancia. Se ha observado que también se desarrolla tolerancia a los efectos de la metadona, pero el síndrome de abstinencia es más prolongado y más suave que el provocado por otros opiáceos [Levine, 2003; Olson, 2004].

El *síndrome de abstinencia*, generado por la supresión brusca de la droga, se caracteriza por un conjunto de signos y síntomas: ansiedad, irritabilidad, calambres musculares, deseo intenso de consumir la droga, disforia, náuseas o vómitos, midriasis, escalofríos, fiebre, embotamiento mental e hiperactividad motora. Es un síndrome que se percibe como insufrible por muchos heroinómanos pero no reviste gravedad y puede superarse sin riesgo vital. Los primeros síntomas suelen aparecer entre las 8-12 horas de la última dosis; el máximo se alcanza entre las 36-72 horas y la duración es de 7 a 10 días. En el tratamiento del síndrome de abstinencia se suele utilizar la metadona, un agonista de receptores μ , de vida media larga, que se administra por vía oral. Disminuyen los deseos de consumir, los efectos de la inyección de heroína y permite el restablecimiento de los ritmos neuroendocrinos, así como el desarrollo de una actividad laboral o social normal. El tratamiento es complejo por su duración y exige un control adecuado de la dosis para evitar la

aparición de dependencia. Su uso clínico se regula a través de los llamados programas de mantenimiento con metadona [Flórez y col, 2008].

I.1.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baselt RC. *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*. 9th Ed, Biomedical Publications, Seal Beach, CA, 2011.

Bencharit S, Morton CL, Xue Y, Potter PM, Redinbo MR. *Structural basis of heroin and cocaine metabolism by a promiscuous human drug-processing enzyme*. Nat Struct Biol, 10 (2003) 349-56.

Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Goodman&Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 11^a Ed, McGraw-Hill Interamericana, Atlanta, 2006.

Corkery JM, Schifano F, Ghodse AH, Oyefeso A. *The effects of methadone and its role in fatalities*. Human Psychopharmacol Clin Exp, 19 (2004) 565-576.

Crowley JJ, Oslin DW, Patkar AA, Gottheil E, De Maria PA Jr, O'Brien CP, Berrettini WH, Grice DE. *A genetic association study of the μ opioid receptor and severe opioid dependence*. Psychiatric Genet, 13 (2003) 169-173.

Dart RC. *Medical toxicology*. 3rd Ed, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 2004.

De la Fuente L, Barrio G, Bravo MJ, Royuela L. *Heroin smoking by "chasing the dragon": its evolution in Spain*. Addiction, 93 (1998) 444-446.

De la Fuente I, Saavedra P, Barrio G, Royuela L, Vicente J. *Temporal and geographic variations in the characteristics of heroin seized in Spain and their relation with the route of administration*. Spanish Group for the Study of the Purity of Seized Drugs. Drug Alcohol Depend, 40 (1996) 185-194.

Domínguez E, Infante F, Luna, A. *Microcontamination of illicit samples of heroin and cocaine as indicator of adulteration*. J Forensic Sci, 36 (1991) 844-856.

Drummer OH. *Postmortem toxicology*. Forensic Sci Int, 165 (2007) 199-203.

Eap CB, Buclin T, Baumann P. *Interindividual variability of the clinical pharmacokinetics of methadone: implications for the treatment of opioid dependence*. Clin Pharmacokinet, 41 (2002) 1153-1193.

Ehret GB, Voide C, Gex-Fabry M, Chabert J, Shah D, Broers B, Piguet V, Musset T, Gaspoz JM, Perrier A, Dayer P, Desmeules JA. *Drug induced long QT syndrome in injection drug users receiving methadone: high frequency in hospitalized patients and risk factors*. Arch Intern Med, 166 (2006) 1280-1287.

Fanoë S, Hvidt C, Ege P, Jensen GB. *Syncope and QT prolongation among patients treated with methadone in Copenhagen*. Heart, 93 (2007) 1051-1055.

Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. *Farmacología humana*. 5^a Ed, Elsevier Masson, Barcelona, 2008.

- Girardin F, Rentsch KM, Schwab MA, Maggiorini M, Pauli-Magnus C, Kullak-Ublick GA, Meier PJ, Fattinger K. *Pharmacokinetics of high doses of intramuscular and oral heroin in narcotic addicts*. Clin Pharmacol Ther, 74 (2003) 341-52.
- Glare PA, Walsh TD. *Clinical pharmacokinetics of morphine*. Ther Drug Monit, 13 (1991) 1-23.
- Gómez R. *Aislamiento de la morfina: 200 años de un descubrimiento fundamental para la química moderna*. An Quím, 102 (2006) 45-53.
- Gyr E, Brenneisen T, Bourquin D, Lehmann T, Vonlanthen D, Hug I. *Pharmacodynamics and pharmacokinetics of intravenously, orally and rectally administered diacetylmorphine in opioid dependents, a two-patient pilot study within a heroin-assisted treatment program*. Int J Clin Pharmacol Ther, 38 (2000) 486-491.
- Hussain T, Ewer AK. *Maternal methadone may cause arrhythmias in neonates*. Acta Paediatr, 96 (2007) 768-769.
- Kaa E. *Impurities, adulterants and diluents of illicit heroin. Changes during a 12-year period*. Forensic Sci Int, 64 (1994) 171-179.
- Karch SB, Drummer O. *Karch's Pathology of drug abuse*. 4th Ed, CRC Press, Boca Raton, FL, 2009.
- Ladrón de Guevara J, Moya Pueyo V. *Toxicología médica, clínica y laboral*. McGraw-Hill-Interamericana de España, Madrid, 1995.
- Law FD, Nutt JD. *Maintenance buprenorphine for opioid users*. Lancet, 361 (2003) 364-365.
- Leikin J, Paloucek F. *Poisoning and Toxicology Handbook*. CRC Press, New York, 2008.
- Levine B. *Principles of Forensic Toxicology*. 2nd Ed, AACC Press, Washington DC, 2003.
- Lorenzo P, Ladero JM, Leza JC, Lizasoain I. *Drogodependencias: Farmacología, Patología, Psicología, Legislación*. 3^a Ed, Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 1999.
- Lotsch J; Skarke C, Liefhold J; Geisslinger G. *Genetic predictors of the clinical response to opioid analgesics: clinical utility and future perspectives*. Clin Pharmacokinet, 43 (2004) 983-1013.
- Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. Pharmaceutical Press, London, 2004.
- Mussoff F, Padosch S, Steinborn S, Madea B. *Fatal blood and tissue concentrations of more than 200 drugs*. Forensic Sci Int, 142 (2004) 161-210.
- Nestler EJ. *Common molecular and cellular substrates of addiction and memory*. Neurobiol Learn Mem, 78 (2002) 637-647.
- Nestler EJ. *Molecular neurobiology of addiction*. Am J Addict, 10 (2001) 201-217.
- Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías. Informe 2011. Secretaría General de Política Social y Consumo. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Madrid, 2011.
- Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías. Informe anual 2011. Oficina de Publicaciones de la Unión Europea. Luxemburgo, 2011.

Olson KR. *Poisoning and drug overdose*. Lange Medical Books&McGraw-Hill, New York, 2004.

Osborne R, Joel S, Trew D, Slevin M. *Morphine and metabolite behaviour after different routes of morphine administration: Demonstration of the importance of active metabolite morphine-6-glucuronide*. Clin Pharmacol Ther, 47 (1990) 12-19.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. *Rang y Dale Farmacología*. 7ª Ed, Elsevier España SL, Barcelona, 2012.

Rook EJ, Huitema AD, Van den Brink W, Van Ree JM, Beijnen JH. *Pharmacokinetics and pharmacokinetic variability of heroin and its metabolites: review of the literature*. Curr Clin Pharmacol, 1 (2006) 109-118.

Schumacher MA, Basbaum AI, Way WL. *Opioid analgesic and antagonists*. In: Katzung BG (Ed). Basic and Clinical Pharmacology. 9th Ed, Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York, 2004, pp 497-516.

Seidenberg A, Honegger U. *Metadona, Heroína y otros opioides*. Ed. Díaz de Santos, Madrid, 2000.

Simonato M. *The neurochemistry of morphine addiction in the neocortex*. Trends Pharmacol Sci, 17 (1996) 410-415.

UNODC. United Nations Office of Drug and Crime. *World Drug Report*. Vienna: United Nations Publications, 2004.

Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. *Opioid receptors*. Annu Rev Biochem, 73 (2004) 953-990.

Ward HG, Nicklous DM, Aloyo VJ, Simansky KJ. *Mu-opioid receptor cellular function in the nucleus accumbens is essential for hedonically driven eating*. Eur J Neurosci, 23 (2006) 1605-1613.

Warner-Smith M, Darke S, Lynskey M, Hall W. *Heroin overdose: causes and consequences*. Addiction, 96 (2001) 1113-1125.

Williams JT, Christie MJ, Manzoni O. *Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence*. Physiol Rev, 81 (2001) 299-343.

Zinder SH, Pasternak GW. *Historical review: Opioid receptors*. Trends Pharmacol Sci, 24 (2003) 198-205.

I.2. COCAÍNA

La cocaína es la segunda droga ilegal más consumida en Europa después del cannabis, aunque los distintos países presentan grandes diferencias en términos de niveles de consumo. Se estima que alrededor de 13 millones de europeos la han consumido al menos una vez en la vida, lo cual equivale a una media del 3.9 % de los adultos de 15 a 64. Se estima que alrededor de 4 millones de europeos han consumido esta droga en el último año (una media del 1.2 %), aunque nuevamente se observan variaciones en los distintos países. El consumo de cocaína parece concentrarse en unos pocos países, como Dinamarca, España, Italia, Irlanda y el Reino Unido, mientras que sigue siendo relativamente bajo en los demás países europeos. Durante el último decenio se ha observado un aumento general del consumo y la incautación de cocaína en la Unión Europea. Los que se limitan a experimentar con la sustancia en una o varias ocasiones componen el grupo de consumidores más amplio. Un segundo grupo es el de los consumidores habituales socialmente integrados, entre los cuales algunos intensificarán su consumo, con los consiguientes problemas sociales y de salud de carácter crónico. Un tercer conjunto de consumidores es el formado por integrantes de grupos socialmente excluidos, como los consumidores y ex consumidores de opiáceos. Las tendencias del consumo de cocaína en Europa han seguido pautas diferentes (Figura 11): en los dos países con la mayor prevalencia del consumo de cocaína (España y Reino Unido), el consumo de la droga aumentó enormemente en los últimos años de la década de los noventa, antes de evolucionar hacia una tendencia más estable, aunque todavía está al alza [Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, 2011].

En la actualidad, la cocaína es la droga ilegal que genera más problemas en España. En los últimos años ha aumentado mucho tanto el consumo como los problemas asociados a esta sustancia. Por otra parte, la oferta de cocaína durante el mismo período se mantuvo estabilizada o aumentó. De hecho, el indicador precio-pureza de los pequeños decomisos de esta droga se mantuvo bastante estable; sin embargo, la disponibilidad percibida de esta droga mostró un aumento sostenido tanto entre la población de 15-64 años, como entre los estudiantes de 14-18 años. Frente a este panorama negativo, recientemente han aparecido algunas evidencias que hacen pensar que puede estar iniciándose un cambio positivo en la evolución temporal del consumo y los problemas por cocaína en España. Por ejemplo, entre los estudiantes se han observado descensos tanto de la prevalencia anual de consumo de cocaína (que ha pasado de 7.2% en 2004 a 4.1% en 2006) como de la disponibilidad percibida

de esta droga. Además, se ha ralentizado el crecimiento del número de admisiones a tratamiento por cocaína, y de la proporción de urgencias hospitalarias directamente relacionadas con drogas ilegales en que se menciona cocaína [Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías, 2011].

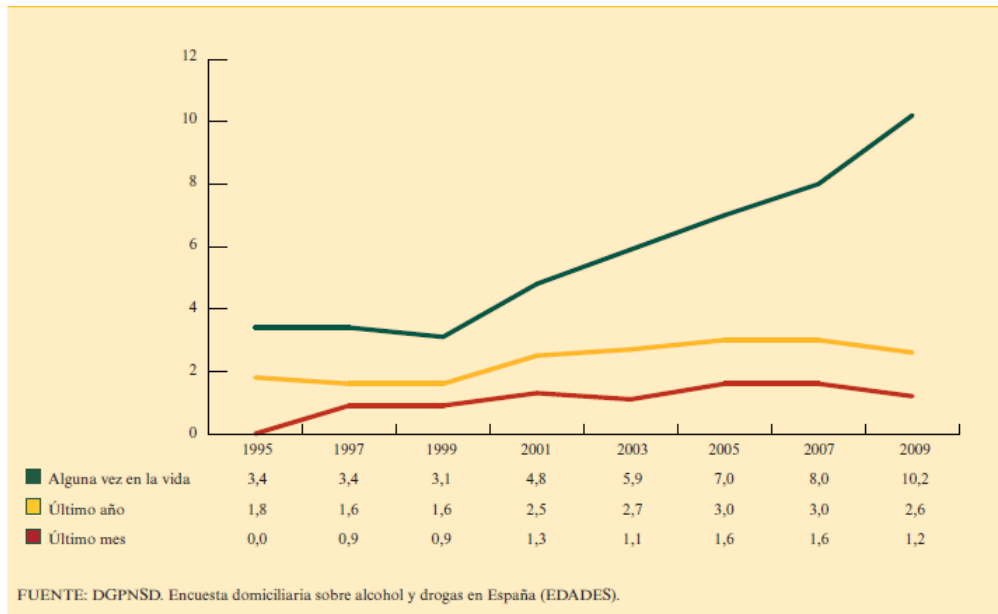


Figura 11. Evolución de las prevalencias de consumo de cocaína base en la población española de 15-64 años (%). España, 1995-2009.

La cocaína fue utilizada por los indios peruanos durante siglos debido a la sensación de bienestar y a la disminución de la sensación de fatiga que producía el consumo de las hojas de la planta *Erythroxylon coca* y otras especies similares. Dicha planta se desarrolla en condiciones de humedad y calor elevados a una altitud moderada. Las hojas de la planta se recogían y se dejaban secar al sol antes de su consumo. La combinación de las hojas de coca con piedra caliza incrementan su absorción y su efecto, esto se debe a que se produce la liberación de la cocaína libre.

La cocaína se identificó como el alcaloide activo en las hojas de coca en 1857, y fue aislada por primera vez en 1859 por Niemann. Esta sustancia también fue utilizada como anestésico local pues descubrieron que provocaba insensibilidad en la zona aplicada. En 1905 se sintetizó el primer análogo de la cocaína, la procaína, para su uso como anestésico. Este compuesto se continúa utilizando en la actualidad, al igual que la lidocaína también análoga

de la cocaína. A finales del siglo XIX la cocaína era utilizada en la composición de diversas bebidas y productos de consumo. También se le atribuían propiedades curativas para el dolor de cabeza, la fatiga, el asma, etc. Pero en 1914 se prohibió su libre distribución y solo podía ser usada bajo prescripción médica [Levine, 2003]. La cocaína que llega al consumidor tiene una pureza que oscila entre 15 y 90%. Los adulterantes y/o diluyentes más comunes son anestésicos locales (lidocaína, procaína, benzocaína, etc.), azúcares (manitol, lactosa, glucosa, etc.), cafeína, quinina y anfetamina.

Las formas de abuso de cocaína son de gran interés toxicológico, ya que condicionan la farmacocinética, la actividad farmacológica, la toxicidad y el grado de adicción a la droga:

Hojas de coca: es la forma de consumo habitual en Sudamérica, masticándolas con sustancias alcalinizantes. Contienen 0.5-1.5% de cocaína, y se suelen masticar una media de 12-15 g de hoja, 3 o 4 veces al día, siendo la cantidad total consumida una sola vez inferior a 75 mg (Figura 12).

Pasta de coca, basuco o pasta base: se obtiene macerando las hojas de coca con ácido sulfúrico, álcalis, disolventes orgánicos y/o amoníaco. Contiene 40-85% de cocaína y se consume fumada con tabaco y/o marihuana (Figura 13).

Clorhidrato de cocaína: se obtiene tratando la pasta de coca con ácido clorhídrico; es la forma habitual de consumo en España, a concentraciones variables del 12-75% [Luna y Osuna, 2004]. Se consume por vía intranasal o intravenosa, mezclada con heroína para evitar los efectos rebote (Figura 14).

Cocaína base ó crack: Se obtiene mezclando el clorhidrato de cocaína con una disolución básica, extracción posterior con éter, evaporación y obtención de un precipitado en forma de cristales. El crack es la segunda forma de consumo y es una mezcla de cocaína, bicarbonato de sodio y amoníaco; contiene 30-90% de cocaína y se inhala en recipientes calentados o se fuma en pipas de cristal mezclado con tabaco, marihuana y/o fenciclidina (Figura 15).

Estas formas de abuso pueden contener estimulantes (anfetaminas, cafeína), anestésicos locales (lidocaína, benzocaína), azúcares (lactosa, glucosa) y otras sustancias inertes.



Figura 12. Hojas de coca.



Figura 13. Pasta de coca.



Figura 14. Clorhidrato de cocaína.



Figura 15. Cocaína-Crack.

I.2.1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

La cocaína o benzoilmetilecgonina se presenta en forma de cristales solubles en disolventes orgánicos que cristalizan en un sistema monocíclico o en forma de escamas blancas lustrosas con olor débil.

Esta droga es un alcaloide de estructura inusual que se relaciona con los alcaloides tropánicos. Su fórmula estructural es $C_{17}H_{21}NO_4$ y su peso molecular es 303.4 g/mol. Su punto de fusión es 96-98°C y su pK_a es 8.6 a 20°C. En forma de base libre es muy volátil a 90°C, pero su punto de ebullición es más elevado, 187-188°C. Por el contrario, las sales son poco volátiles y su punto de ebullición no se alcanza hasta los 190-195°C. Antes de alcanzar el punto de ebullición, la mayor parte de la sal se piroliza. Es altamente lipofílica [Moffat y col, 2004].

I.2.2. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS

La cocaína se absorbe por todas las vías de administración. Si la droga es esnifada pasa directamente a la sangre a través de las membranas nasales, mientras que la inyección intravenosa (sola o con heroína) libera la droga directamente al torrente sanguíneo, aumentando así la intensidad de su efecto [Cone y col, 1994]. Por ambas vías se encuentran niveles de cocaína en el cerebro en 30 segundos, mientras que fumada la droga pasa rápidamente desde los pulmones a la sangre y se manifiestan efectos centrales sólo cinco segundos después del consumo. Por vía oral su absorción es lenta y la biodisponibilidad está en torno a 50-60%. Sus efectos comienzan a los 20 minutos, encontrándose la concentración plasmática máxima 60 minutos después de la administración. La base libre puede absorberse por inhalación, en una cantidad aproximada al 100% de la dosis, si bien se estima que el 20-30% se piroliza durante el calentamiento [Ladrón de Guevara y Moya Pueyo, 1995; Dart, 2004].

Se distribuye por todo el organismo, atravesando las membranas celulares y la barrera placentaria, por lo que puede provocar daños en el feto o incluso abortos espontáneos. Estudios experimentales han identificado receptores de cocaína en cerebro, hígado, corazón, pulmón, intestino y riñón. El volumen de distribución varía entre 1.5 y 2 L/Kg, y la unión a proteínas plasmáticas es del 90% [Hernández y col, 1994; Evans y col, 1996; Esmer y col, 2000; Leikin y Paloucek, 2008].

La cocaína es rápidamente inactivada por la hidrólisis de una o las dos uniones éster realizada por colinesterasas plasmáticas y hepáticas que hidrolizan cada uno de sus dos grupos ésteres para producir benzoilecgonina (BEG) y ecgonina metil éster (EME). Estos metabolitos son altamente polares y, cuando se forman fuera del sistema nervioso central, no tienen actividad farmacológica. Por desmetilación se transforma en norcocaína que es un metabolito activo. El alcohol induce la activación de la enzima carboxilesterasa que convierte la cocaína en cocaetileno, un metabolito activo que puede aumentar la cardiotoxicidad (Figura 16) [De la Torre y col, 1991; Jatlow y col, 1991; Hearn y col, 1991; Sukbuntherng y col, 1995].

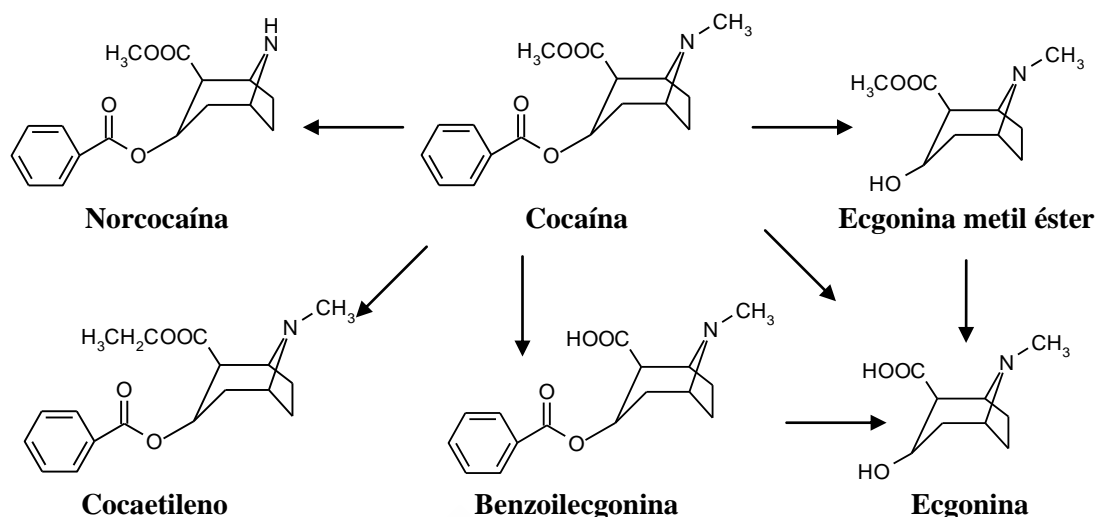


Figura 16. Metabolismo de la cocaína.

La vida media de eliminación de la cocaína es de una hora aproximadamente, aunque es posible detectar benzoilecgonina y ecgonina metil éster en orina hasta 96-144 horas después de la última dosis. Aproximadamente el 10% de la dosis absorbida se elimina como cocaína, el 35-54% como benzoilecgonina y el 32-49% como ecgonina metil éster. Las concentraciones medias de cocaína presentes en 19 muertes atribuidas al consumo de esta droga son: 5.3 mg/L en sangre y 42.0 mg/L en orina [Drummer y Odell, 2001; Baselt, 2011]. Mientras que la cocaína solo es detectada en la orina de las primeras 24 horas, su metabolito benzoilecgonina (BEG) se puede detectar hasta 3-5 días postconsumo, dependiendo de la dosis, la frecuencia de consumo y el pH de la orina.

1.2.3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

La cocaína posee a la vez efectos estimulantes y anestésicos. Esta sustancia actúa de forma reversible sobre el sistema nervioso central y realiza acciones periféricas. El efecto anestésico tiene lugar mediante el bloqueo de las conducciones nerviosas produciéndose anestesia local, y también es capaz de inducir vasoconstricción local. Su uso está muy limitado debido a su alta toxicidad [Pascual y col, 2001]. La cocaína evita la recaptación de los neurotransmisores, tales como dopamina, noradrenalina y serotonina, en las terminaciones nerviosas. Estas sustancias están directamente relacionadas con el humor y el comportamiento. Dichos compuestos deberían ser reabsorbidos al finalizar la acción de transmisión, ya que este proceso hace posible que el número de neurotransmisores presentes

sea el suficiente para la siguiente acción transmisora. Esta inhibición de neurotransmisores que produce la cocaína da lugar a un aumento en la duración de los impulsos nerviosos, e incluso podría conllevar una interrupción de la propia transmisión. Es más, podría producir una señal en otra terminación nerviosa o muscular (Figura 17, en *psicologia.isipedia.com*).

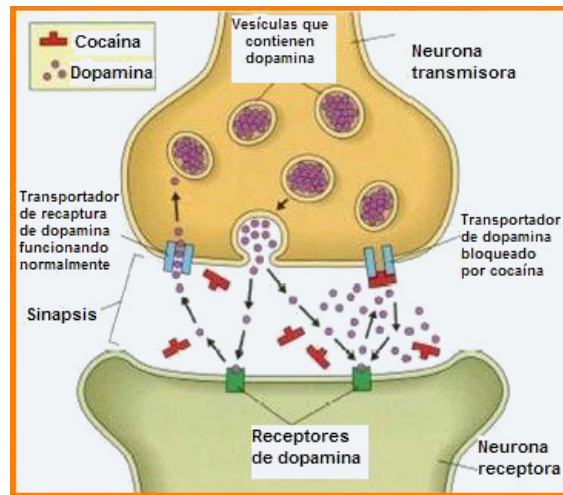


Figura 17. Mecanismo de acción de la cocaína.

La cocaína actúa principalmente sobre los receptores de dopamina prolongando la acción de este neurotransmisor. Existe un número bastante elevado de receptores de dopamina sobre los cuales produce diversos efectos. Entre ellos está el receptor D2, cuya activación parece ser la responsable de la mayoría de los efectos de la droga sobre el comportamiento, tales como la estimulación de la actividad locomotora, la generación del comportamiento estereotipado para los consumidores de esta sustancia o efectos de refuerzo positivo. La cocaína también afecta a la transmisión neuronal bloqueando el movimiento del ión sodio a través de las neuronas sensoriales, lo que produce un efecto anestésico. Esto puede ser peligroso si afecta a las conducciones musculares del corazón, ya que puede provocar arritmias cardíacas e incluso la muerte [Klaassen, 2008]. El consumo de esta sustancia también produce un incremento en la respuesta de los neurotransmisores relacionados con la noradrenalina. El repentino *subidón* que se experimenta tras una inyección intravenosa o tras fumar la cocaína, es causado por el repentino aumento de noradrenalina y otras aminas en las terminaciones nerviosas [Levine, 2003].

I.2.4. TOXICIDAD, DEPENDENCIA Y ABUSO

Fuera de los usos médicos, no existe una forma segura de usar cocaína. Cualquier tipo de consumo puede llevar a que se absorban cantidades tóxicas de la droga, causando una emergencia cardiovascular o cerebral grave que puede resultar en la muerte súbita [Mouhaffel y col, 1995; Lobl y Carbone, 1992; Wang y col, 2001]. Los efectos de la cocaína se presentan casi inmediatamente después de una sola dosis y desaparecen en cuestión de minutos u horas.

Los que consumen cocaína en pequeñas cantidades (hasta 100 mg) generalmente se sienten eufóricos, conversadores y más alerta, particularmente con relación a las sensaciones visuales, auditivas y del tacto. Algunos consumidores sienten que la droga los ayuda a realizar algunas tareas físicas e intelectuales más rápido, mientras que a otros les produce el efecto contrario. La dosis letal mínima estimada es de 1.2 g, pero personas susceptibles han muerto con dosis tan bajas como 30 mg y personas adictas han tolerado hasta 5 g/día [Moffat y col, 2004].

La forma en que se administra la cocaína determina el tiempo que dura el efecto inmediato de euforia. Los efectos fisiológicos a corto plazo son: vasoconstricción, midriasis y aumento de la temperatura corporal, el ritmo cardíaco y la presión arterial. Los usuarios pueden experimentar temblores, espasmos musculares y, con dosis consecutivas, una reacción tóxica muy similar al envenenamiento por anfetamina. Las muertes por cocaína suelen resultar por paros cardíacos o convulsiones seguidas de un paro respiratorio [Quin y col, 1997; Blanco y col, 1999; Muniz y Evans, 2001].

En resumen, las intoxicaciones agudas por cocaína se relacionan frecuentemente con manifestaciones cardíacas (hipertensión, arritmias, infarto de miocardio), neurológicas (cefalea, hemorragia cerebral, convulsiones), psiquiátricas (ansiedad, confusión, euforia), respiratorias (taquipnea, edema pulmonar), gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarreas) y otras (midriasis).

Algunos autores [Green y col, 1994; Ditton y Hammersley, 1994] reconocen tres estilos de consumo: el consumidor elitista que se mueve en el mundo de los negocios; el consumidor recreativo que lo hace por diversión, y el policonsumidor cuya vida gira en torno a las drogas.

Después del uso repetido por cualquier vía de administración, la cocaína puede causar adicción o tener otras consecuencias adversas para la salud. Se cree que los efectos adictivos y estimulantes de la cocaína son principalmente el resultado de su habilidad para impedir la reabsorción de la dopamina por las células nerviosas. El cerebro libera la dopamina como parte de su sistema de gratificación, y la misma está directa o indirectamente involucrada en las propiedades adictivas de todas las principales drogas de abuso [Washton, 1995]. Se puede desarrollar una tolerancia considerable a la droga; de hecho muchos de los adictos a esta sustancia nunca logran obtener el mismo placer que la primera vez que la consumieron. Por ello algunos usuarios a menudo aumentan la dosis para intensificar y prolongar la euforia. Además de la tolerancia, los usuarios también pueden desarrollar una mayor sensibilidad a los efectos anestésicos y convulsivos de la cocaína, sin tener que aumentar la dosis. Esto explicaría porque algunas muertes ocurren después del uso de dosis de cocaína aparentemente pequeñas. Cuando la cocaína se usa repetidamente y en dosis cada vez mayores, puede conducir a un estado de irritabilidad, inquietud y paranoia, en el que la persona pierde el sentido de la realidad y sufre alucinaciones auditivas [Gawin y Kleber, 1986]. Si se interrumpe bruscamente la administración de la droga aparece un síndrome de abstinencia que sigue un modelo de tres fases:

1. Crash o fase de bajada (9 horas a 8 días), en donde predomina la depresión, anorexia, insomnio y deseo compulsivo de consumir, seguidos de agotamiento y somnolencia,
2. Abstinencia (1 a 10 semanas), que comienza con una normalización del ritmo del sueño y del estado de ánimo, seguida de hiperactividad,
3. Extinción (meses), en donde el deseo se repite episódicamente según estímulos condicionados y disminuye gradualmente, si se mantiene la abstinencia.

I.2.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baselt RC. *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*. 9th Ed, Biomedical Publications, Seal Beach, CA, 2011.

Blanco M, Díez-Tejedor E, Vivancos F, Barreiro O. *Cocaine and cerebrovascular disease in young adults*. Rev Neurol, 29 (1999) 796-800.

Cone EJ, Hillsgrove M, Darwin WD. *Simultaneous measurement of cocaine, cocaethylene, their metabolites and crack pyrolysis products by gas chromatography-mass spectrometry*. Clin Chem, 40 (1994) 1299-1305.

Dart RC. *Medical toxicology*. 3rd Ed, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 2004.

- De la Torre R, Farré M, Ortuño J, Camí J, Segura J. *The relevance of urinary cocaethylene as a metabolite of cocaine under the simultaneous administration of alcohol*. J Anal Toxicol, 15 (1991) 223.
- Ditton J, Hammersley R. *The typical cocaine user*. Druglink, 9 (1994) 11-14.
- Drummer OH, Odell M. *The forensic pharmacology of drugs of abuse*. Arnold Ed, London, 2001.
- Esmer MC, Rodriguez-Soto G, Carrasco-Daza D, Iracheta ML, Del Castillo V. *Cloverleaf skull and multiple congenital anomalies in a girl exposed to cocaine in utero: case report and review of the literature*. Childs Nerv Syst, 16 (2000) 176-179.
- Evans SM, Cone EJ, Henningfield JE. *Arterial and venous cocaine plasma concentrations in humans: relationship to route of administration, cardiovascular effects and subjective effects*. J Pharmacol Exp Ther, 279 (1996) 1345-1356.
- Gawin FH, Kleber HD. *Abstinence symptomatology and psychiatric diagnosis in cocaine abusers: clinical observations*. Arch Gen Psychiatry, 43 (1986) 107-113.
- Green A, Pickering H, Foster R, Power R, Stimson GV. *Who uses cocaine? Social profiles of cocaine users*. Addiction Research, 2 (1994) 141-154.
- Hearn WL, Rose S, Wagner J, Ciarleglio A, Mash DC. *Cocaethylene is more potent than cocaine in mediating lethality*. Pharmacol Biochem Behav, 39 (1991) 531-533.
- Hernández A, Andollo W, Hearn L. *Analysis of cocaine and metabolites in brain using solid phase extraction and full-scanning gas chromatography / ion trap mass spectrometry*. Forensic Sci Int, 65 (1994) 149-156.
- Jatlow P, Elsworth JD, Bradberry C, Winger G, Taylor JR, Russell R, Roth RH. *Cocaethylene: a neuropharmacologically active metabolite associated with concurrent cocaine-ethanol ingestion*. Life Sci, 48 (1991) 1787-1794.
- Klaassen CD. *Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons*. 7th Ed, McGraw-Hill Co, New York, 2008.
- Ladrón de Guevara J, Moya Pueyo V. *Toxicología médica, clínica y laboral*. Interamericana McGraw-Hill, Nueva York, 1995.
- Leikin J, Paloucek F. *Poisoning and Toxicology Handbook*. CRC Press, New York, 2008.
- Levine B. *Principles of Forensic Toxicology*. 2nd Ed, AACC Press, Washington DC, 2003.
- Lobl JK, Carbone LD. *Emergency management of cocaine intoxication. Counteracting the effects of today's favourite drug*. Postgrad Med, 91 (1992) 161-166.
- Luna A, Osuna E. *Drogas de abuso*. En: Villanueva E (Ed). *Medicina Legal y Toxicología*. 6^a Ed, Masson, Barcelona, 2004, pp 1014-1034.
- Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material*. Pharmaceutical Press, London, 2004.
- Mouhaffel AH, Madu EC, Satmary WA, Fraker TD Jr. *Cardiovascular complications of cocaine*. Chest, 107 (1995) 1426-1434.
- Muniz AE, Evans T. *Acute gastrointestinal manifestations associated with use of crack*. Am J Emerg Med, 19 (2001) 61-63.

Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías. Informe 2011. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Madrid, 2011.

Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías. Informe anual 2011. Oficina de Publicaciones de la Unión Europea. Luxemburgo, 2011.

Pascual F, Torres M, Calafat A (Eds). *Monografía Cocaína*. Adicciones, Vol. 13(2), 2001.

Quin DI, Wodak A, Day RO. *Pharmacokinetic and pharmacodynamic principles of illicit drug use and treatment of illicit drug users*. Clin Pharmacokinet, 33 (1997) 344-400.

Sukbuntherng J, Walters A, Chow HH, Mayerson M. *Quantitative determination of cocaine, cocaethylene (ethylcocaine), and metabolites in plasma and urine by high performance liquid chromatography*. J Pharm Sci, 84 (1995) 799-804.

Wang JF, Ren X, DeAngelis J, Min J, Zhang Y, Hampton TG, Amende I, Morgan JP. *Differential patterns of cocaine-induced organ toxicity in murine heart versus liver*. Exp Biol Med, 226 (2001) 52-60.

Washton AM. *La adicción a la cocaína. Tratamiento, recuperación y prevención*. Ed. Paidós, Barcelona, 1995.



I.3. BENZODIACEPINAS

En 1955 los laboratorios Roche sintetizaron el clordiacepóxido, la primera benzodiacepina que fue comercializada como *Librium*[®] en 1960. A partir de entonces se probaron distintas modificaciones estructurales, sintetizándose un compuesto 5 a 10 veces más potente que el clordiacepóxido, que se comercializó en 1963 con el nombre de *Valium*[®] (diacepam). El diacepam fue la primera benzodiacepina potente que no contenía un grupo amino básico, el cuál constituía la hipótesis de partida para la síntesis de la serie [Foye, 1991]. Pero fue en los años 80 cuando la aparición de las benzodiacepinas como fármacos supuso una alternativa al uso de los barbitúricos. Las triazolo [4,3a][1,4]-benzodiacepinas (alprazolam) fueron descubiertas y estudiadas casi simultáneamente a comienzos de los años 70 por científicos japoneses y estadounidenses, al fusionar un heterociclo como imidazol o triazol sobre la función lactama de la benzodiacepin-2-ona. Posteriormente y hasta la actualidad salieron al mercado gran cantidad de derivados benzodiacepínicos.

Las benzodiacepinas forman un grupo farmacológico relativamente extenso, con variedad de efectos e indicaciones; son agentes ansiolíticos eficaces en el tratamiento de trastornos de la ansiedad; hipnóticos usados en el tratamiento del insomnio; anticonvulsivantes útiles en el tratamiento de la epilepsia, y miorelajantes empleados como pre-anestésicos. Son los psicofármacos más ampliamente utilizados en el planeta y quizás los de mayores ventas entre la amplia diversidad de opciones terapéuticas de cualquier índole (Informe de la Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes correspondiente a 2010. Naciones Unidas). Su capacidad para generar dependencia y los fenómenos asociados a su uso en poblaciones de riesgo, como drogodependientes, ancianos o pacientes con enfermedades respiratorias, han limitado su empleo y hoy existen importantes condicionamientos para su utilización continuada [Neutel, 1995; Herings y col, 1995; Calonge y col, 1997; Hemmelgarn y col, 1997; Barbone y col, 1998].

Las ventajas en cuanto a su eficacia, fácil administración, reducidos precios, bajo potencial de adicción, menores efectos secundarios y principalmente su gran margen de seguridad terapéutica, han contribuido a una enorme prescripción de las benzodiacepinas en España [Rayón y col, 1997; García del Pozo y col, 2004] y una mayor implicación en intoxicaciones voluntarias, accidentales e incluso homicidas y como medio de cometer delitos previa administración a víctimas incautas [Cabrera y col, 1993]. Según la Sociedad Española

de Medicina de Familia y Comunitaria (SEMFYC), un 15-20% de los pacientes que acuden a las consultas de Atención Primaria consumen algún psicofármaco, de los que un 75% son benzodiazepinas. Afortunadamente, la intoxicación mortal por benzodiazepinas requiere la administración de dosis masivas, por lo que los suicidios consumados con estos fármacos son muy escasos.

I.3.1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Las benzodiazepinas poseen una estructura común compuesta por un anillo de benceno, unido a otro de diazepina de siete miembros. Sobre esta estructura genérica se han introducido multitud de variantes, que originan modificaciones en la actividad principal e incluso en la mayor o menor potencia del fármaco (Figura 18). Así, los grupos aceptores de electrones en posición 2 en el segundo anillo bencénico aumentan la potencia, mientras que los sustituyentes en cualquier otro lugar disminuyen la actividad [Cabrera y col, 1993]. En general, todas las benzodiazepinas tienen un marcado carácter liposoluble, aunque esta propiedad varía notablemente de unos fármacos a otros del grupo.

Alprazolam: 8-cloro-1-metil-6-fenil-4H-1,2,4-triazolo(4,3-a)-(1,4)-benzodiazepina. Fórmula empírica: $C_{17}H_{13}ClN_4$. Peso molecular: 308.77 g/mol. pK_a : 2.4. Nombre comercial: Trankimazin[®]. Es un polvo cristalino, de color blanco. Punto de fusión: 228°C. Es insoluble en agua, parcialmente soluble en alcohol y acetona, y soluble en cloroformo y diclorometano.

Bromacepam: 7-bromo-1,3-dihidro-5-(2-piridil)-2H-1,4-benzodiazepina. Fórmula empírica: $C_{14}H_{10}BrN_3O$. Peso molecular: 316.18 g/mol. pK_a : 2.9; 11.0. Nombre comercial: Lexatin[®]. Es un polvo cristalino de color amarillento, e inodoro. Punto de fusión: 237-238°C. Es prácticamente insoluble en agua y parcialmente soluble en alcohol y diclorometano.

Diazepam: 7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona. Fórmula empírica: $C_{16}H_{13}ClN_2O$. Peso molecular: 284.74 g/mol. pK_a : 3.3 (20°C). Nombre comercial: Valium[®]. Es un polvo cristalino de color blanquecino o ligeramente amarillento, prácticamente inodoro. Punto de fusión: 131-135°C. Es ligeramente soluble en agua, soluble 1 en 39 de éter, 1 en 25 de etanol, y 1 en 2 de cloroformo.

Loracepam: 7-cloro-5-(2-clorofenil)-1,3-dihidro-3-hidroxi-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona. Fórmula empírica: $C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$. Peso molecular: 321.16 g/mol. pK_a : 1.3 ; 11.5 (20°C). Nombre comercial: Orfidal®. Es un polvo cristalino de color casi blanco. Punto de fusión: 166-168°C. Es prácticamente insoluble en agua, y más soluble en cloroformo y en alcohol.

Lormetacepam: 7-cloro-5-(2-clorofenil)-1,3-dihidro-3-hidroxi-1-metil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona. Fórmula empírica: $C_{16}H_{12}Cl_2N_2O_2$. Peso molecular: 335.19 g/mol. Nombre comercial: Noctamid®. Es un polvo cristalino de color blanco. Punto de fusión: 209-211°C. Prácticamente insoluble en agua, ligeramente soluble en etanol y metanol, y muy soluble en cloroformo.

Tetracepam: 7-cloro-5-(1-ciclohexen-1-il)-1,3-dihidro-1-metil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona. Fórmula empírica: $C_{16}H_{17}ClN_2O$. Peso molecular: 288.78 g/mol. Nombre comercial: Myolastan®. Es un polvo cristalino de color amarillento a marrón. Punto de fusión: 144°C [Moffat y col, 2004].

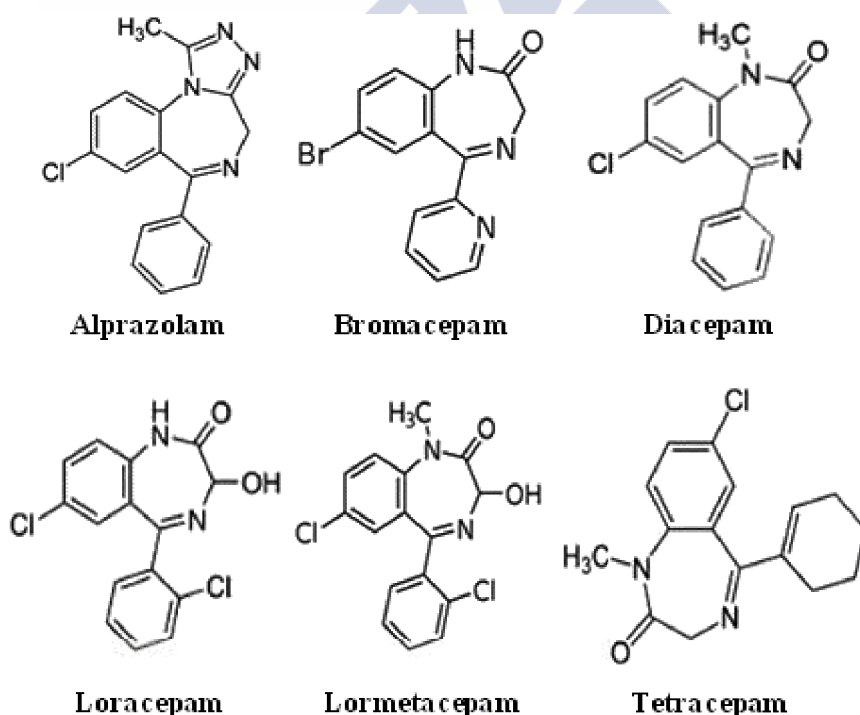


Figura 18. Estructuras químicas de las seis benzodiazepinas estudiadas.

I.3.2. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS

Los datos farmacocinéticos pueden ser la base racional para el uso terapéutico de las benzodiazepinas, pero también para las interpretaciones forenses. Hay que señalar que la duración de acción de ciertas benzodiazepinas no depende sólo de la vida media sino también de su índice de metabolización y su distribución dentro y fuera del cerebro [Brenneisen y Raymond, 2001; Dart, 2004].

Las BZDs se absorben muy bien por vía oral. La velocidad de absorción aumenta con la liposolubilidad, alcanzándose concentraciones plasmáticas máximas después de 30-90 minutos (diazepam) o después de 1 a 6 horas (alprazolam, bromazepam, lorazepam, lormetazepam). Por vía intramuscular la absorción es lenta e irregular. En situaciones de emergencia (convulsiones) puede utilizarse la vía intravenosa. El tiempo de absorción marca el inicio de la acción. De esta manera, podremos elegir la molécula más adecuada teniendo en cuenta el efecto principal que queremos lograr. Como las benzodiazepinas son muy liposolubles, se distribuyen rápidamente por todo el organismo, siendo transportadas por las proteínas plasmáticas, a las que se unen en una proporción importante (Tabla 1).

Tabla 1. Datos de distribución de las benzodiazepinas.

Fármaco	Metabolitos activos	Vd (L/Kg)	Unión a p.p. (%)	Tiempo Cp máx. (h)
Acción larga				
Diazepam	<i>N-desmetildiazepam;</i> <i>oxazepam;</i> <i>temazepam</i>	1-2	98-99	0.5-1.5
Acción intermedia				
Bromazepam	----	1.4	70	1-4
Tetrazepam	<i>N-desmetiltetrazepam</i>	1.1-1.7	80-90	0.5-2
Acción corta				
Alprazolam	<i>1-hydroxyalprazolam;</i> <i>4-hydroxyalprazolam</i>	1-1.5	70-80	1-2
Lorazepam	----	0.7-1	85	2
Lormetazepam	----	4.6	85	0.8-1.2

Las benzodiazepinas se metabolizan a través del sistema microsomal hepático donde sufren procesos de desmetilación e hidroxilación para formar productos farmacológicamente activos. Estos a su vez son posteriormente conjugados con ácido glucurónico para formar metabolitos más hidrosolubles e inactivos. Además, la velocidad de eliminación se ralentiza con la edad [Morán y col, 2011].

Las benzodiazepinas se excretan preferentemente por vía renal, en forma de metabolitos (>75% de la dosis). Los derivados glucuronidos se excretan fácilmente por filtración glomerular. La vida media de eliminación está condicionada por la liposolubilidad del fármaco, la biotransformación hepática, la presencia de metabolitos activos y la proporción de grasa corporal del individuo. Se ha establecido una división entre benzodiazepinas de acción ultracorta, corta, intermedia y larga, según su vida media y la de sus metabolitos activos, y se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Vidas medias de eliminación de las BZDs.

Tipo	Vida media	Benzodiazepinas
BZDs de acción larga	> 24 h	Diazepam
BZDs de acción intermedia	12 - 24 h	Bromacepam, Tetracepam
BZDs de acción corta	6 - 12 h	Alprazolam, Loracepam, Lormetacepam
BZDs de acción ultracorta	< 6 h	Midazolam

I.3.3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Las benzodiazepinas habituales poseen varias acciones farmacológicas que amplían el campo de sus posibilidades terapéuticas. De este modo, aunque comenzaron siendo principalmente sedantes y ansiolíticos menores, en la actualidad algunos fármacos del grupo son hipnóticos de elevada eficacia, anticonvulsivantes aceptables o inductores anestésicos de utilidad. Junto con estas acciones hay que destacar fármacos como el diazepam que desde su comienzo se ha utilizado como relajante muscular eficaz. No todas estas funciones se presentan habitualmente en un mismo fármaco, pues las distintas estructuras químicas van a condicionar su mayor o menor potencia en determinadas acciones pero sí es frecuente que una misma benzodiazepina tenga más de una función, aunque sólo se manifieste una de ellas, a dosis terapéutica. De esto se deduce que las principales indicaciones de las benzodiazepinas

podrían girar en torno a los estados de ansiedad, excitación, euforia o agitación de distinta intensidad, contracturas musculares, alteraciones del sueño, estados maníacos leves o cuadros convulsivos de distinta etiología. En ciertas personas, además pueden aumentar los signos de irritabilidad y hostilidad [Cabrera y col, 1993].

Las benzodiacepinas de corta duración de acción son utilizadas preferentemente como hipnóticos y como suplementos de la inducción de la anestesia, mientras que las benzodiacepinas de larga duración de acción se prescriben como ansiolíticos o tranquilizantes menores [Drummer y Odel, 2001]. La tabla 3 muestra las cinco acciones terapéuticas principales [Rang y col, 2012].

Tabla 3. Acciones terapéuticas de las benzodiacepinas (en tratamientos breves).

Acción	Uso clínico
Ansiolítico	Ansiedad y trastornos de pánico, fobias
Hipnótico	Insomnio
Miorrelajante	Espasmos musculares, trastornos espásticos
Anticonvulsivante	Ataques causados por ingestión de drogas, algunas formas de epilepsia
Amnesia	Premedicación quirúrgica, sedación en intervenciones de cirugía menor

Las benzodiacepinas son fármacos depresores selectivos del SNC, actuando preferentemente sobre algunas estructuras como el sistema límbico. En función de la dosis administrada provocarán un grado mayor o menor de depresión del mismo. Todas las benzodiacepinas potencian los efectos de los neurotransmisores, facilitando la acción inhibitoria del neurotransmisor GABA (ácido gamma-aminobutírico), tanto a nivel pre como post sináptico en todas las zonas del sistema nervioso central. El GABA origina una apertura de los canales de cloro, por tanto la conductividad del cloro en las membranas nerviosas aumenta, y esto hace que disminuya la acción a estímulos polarizantes (Figura 19, en *farmaconetumsa.blogspot.com*). Esto viene avalado por la evidencia de que la utilización previa de antagonistas del GABA reduce notablemente el efecto de las benzodiacepinas.

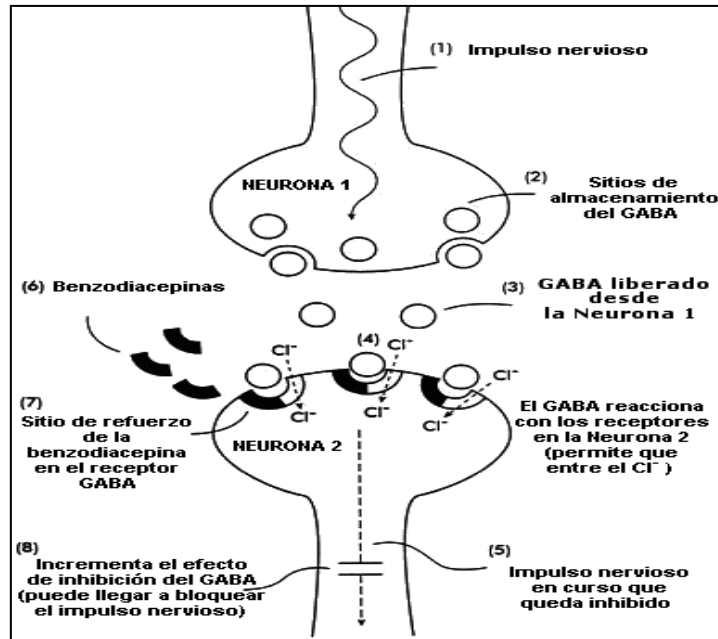


Figura 19. Diagrama del mecanismo de acción del neurotransmisor natural GABA y de las benzodiacepinas en las células del sistema nervioso, en el cerebro. (1,2) El impulso nervioso hace que el GABA sea liberado de los lugares en los que se encuentra almacenado en la neurona 1. (3) Es liberado en el espacio interneuronal. (4) El GABA reacciona con los receptores de la neurona 2; la reacción permite la entrada de los iones cloruro (Cl^-) en la neurona. (5) Este efecto inhibe o detiene el progreso del impulso nervioso. (6,7) Las benzodiacepinas reaccionan con el sitio de refuerzo de los receptores GABA. (8) Esta acción aumenta los efectos inhibidores del GABA; el impulso nervioso en curso puede quedar bloqueado completamente.

Como resultado de este incremento de la actividad inhibidora del GABA, se disminuye la producción general de neurotransmisores excitadores, tales como noradrenalina, serotonina, acetilcolina y dopamina, que son necesarios para las funciones involucradas en el estado normal de vigilia y alerta, memoria, tono muscular y coordinación, respuestas emocionales, secreciones de las glándulas endocrinas, control del ritmo cardíaco y de la tensión sanguínea y para muchas otras funciones, todas las cuales pueden ser perjudicadas por las benzodiacepinas [Malcolm, 2005]. Se han encontrado inhibidores del GABA, como el flumaceniil, que se emplea como antídoto en sobredosis de benzodiacepinas o para despertar en el postoperatorio a un paciente previamente sedado con benzodiacepinas [Lüllman, 1992; Cabrera y col, 1993; Tan y col, 2010; Riegel y Kalivas, 2010].

I.3.4. TOXICIDAD, DEPENDENCIA Y ABUSO

Los efectos de una sobredosis por vía oral son leves o moderados, pero la administración intravenosa rápida, aún en dosis terapéuticas, puede inducir un paro respiratorio, además de hipotensión, ataxia, letargo, habla farfullante y depresión grave del SNC. La co-ingestión de benzodiacepinas con otras sustancias sedantes, hipnóticas, etanol o anti-psicóticos, potencia el efecto depresor sobre la respiración y la consciencia. Su empleo indiscriminado no está exento de riesgos debido a sus efectos adversos y a su capacidad de producir tolerancia a los efectos sedantes. Usando la vía oral, las dosis terapéuticas están entre 0.5 y 20 mg, y las dosis tóxicas son superiores a 500 mg [Gisbert Calabuig y Gisbert Grifols, 2004]. La tabla 4 muestra las concentraciones de las benzodiacepinas estudiadas en sangre.

Tabla 4. Niveles de benzodiacepinas en sangre [Moffat y col, 2004].

Compuesto	Niveles terapéuticos (µg/mL)	Niveles tóxicos (µg/mL)	Niveles letales (µg/mL)
Alprazolam	0.02-0.10	0.10-0.40	0.21 (1 caso)
Bromacepam	0.11-0.17	0.25-0.50	7.70 (1 caso)
Diacepam	0.10-1.00	>1.50	>5.00
Loracepam	0.05-0.24	0.30-0.60	---
Lormetacepam	0.01-0.02 (2casos)	---	---
Tetracepam	0.49-0.63 (2 casos)	---	---

Las benzodiacepinas se prestan al uso lúdico y generan cuadros de adicción, en los que intervienen factores psicológicos y puramente tóxicos. Los compuestos de mayor potencia farmacológica y con perfiles de eliminación rápida, como el alprazolam o el loracepam, son más adictógenos que los que no reúnen estas características. La adicción se produce en pacientes que inician un tratamiento ansiolítico o hipnoinductor con benzodiacepinas, bajo control médico, pero posteriormente continúan consumiéndolas períodos largos (>4 meses), sin ningún tipo de control especializado. La falta de motivación del paciente, que no se considera toxicómano, y la presencia de una inestabilidad psíquica refuerzan el empleo de estas sustancias, justificando que las recaídas sean muy frecuentes. La supresión brusca de la benzodiacepina induce un síndrome de abstinencia, caracterizado por ansiedad, irritabilidad,

taquicardia, insomnio y cefaleas. Este síndrome se corrige instaurando la dosis inicial y disminuyéndola progresivamente en semanas. En tratamientos prolongados se evita anulando la dosis 1 semana cada 2 ó 3 meses [Ladrón de Guevara y Moya Pueyo, 1995; Calonge y col, 1997; O'Brien, 2005; Autier y col, 2009].

I.3.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Authier N, Balayssac D, Sautereau M, Zangarelli A, Courty P, Somogyi AA, Vennat B et al. *Benzodiazepine dependence: focus on withdrawal syndrome*. Ann Pharm Fr, 67 (2009) 408–13.

Barbone F, McMahon AD, Davey PG, Morris AD, Reid IC, McDevitt DG, McDonald TM. *Association of road-traffic accidents with benzodiazepine use*. Lancet, 352 (1998) 1331-1336.

Brenneisen R, Raymond L. *Pharmacology of flunitrazepam and other benzodiazepines* In: Salamone SJ (Ed). Benzodiazepines and GHB. Detection and pharmacology. Human Express, Totowa, New Jersey, 2001.

Cabrera R, Mencías E, Cabrera J. *Toxicología de los psicofármacos*. Mosby Doyma, Madrid, 1993.

Calonge ME, Prieto M, De Alba C. *Dependencia de las benzodiazepinas*. Atención Primaria, 19 (1997) 57-58.

Dart RC. *Medical toxicology*. 3rd Ed, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 2004.

Drummer OH. *Requirements for bioanalytical procedures in postmortem toxicology*. Anal Bioanal Chem, 388 (2007) 1495-1503.

Drummer OH, Odel M. *Benzodiazepines and related drugs*. In: Drummer OH, Odel M (Eds). The forensic pharmacology of drugs of abuse. Ed. Arnold, Londres, 2001.

Foye WO. *Principios de Química Farmacéutica*. Ed. Reverté SA, Barcelona, 1991.

García del Pozo J, Abajo Iglesias F, Carbajal García-Pando A, Montero Corominas D, Madurga Sanz M, García del Pozo V. *The Use of ansiolytic and hypnotic drugs in Spain (1995-2002)*. Rev Esp Salud Pública, 78 (2004) 379-87.

Gisbert Calabuig JA, Gisbert Grifols MS. *Intoxicaciones por medicamentos* En: Villanueva Cañadas E (Ed). Medicina legal y toxicología. Ed. Masson, Barcelona, 2004, pp 905-918.

Harris CR. *Manual de toxicología para médicos*. Elsevier Masson, Barcelona, 2008.

Hemmelgarn B, Suissa S, Huang A, Boivin JF, Pinard GG. *Benzodiazepine use and the risk of motor vehicle crash in the elderly*. JAMA, 278 (1997) 27-31.

Herings RM, Stricker BH, De Boer A, Bakker A, Sturmans F. *Benzodiazepines and the risk of falling leading to femur fractures. Dosage more important than elimination half-life*. Arch Int Medicine, 155 (1995) 1801-1807.

Ladrón de Guevara J, Moya Pueyo V. *Toxicología médica*. McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid, 1995.

Lüllmann H. *Atlas de farmacología*. 1^a Ed, Masson-Salvat, Stuttgart, 1992.

Malcolm RJ. *GABA systems, benzodiazepines, and substance dependence*. J Clin Psychiatry, 64 (2005) 36-40.

Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Galichet LY. *Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceutical, body fluids and post-mortem material*. Ed. Pharmaceutical Press, London, 2004.

Morán I, Baldirá J, Marruecos L, Nogué S. *Toxicología Clínica*. Grupo Difusión, Madrid, 2011.

Neutel CI. *Risk of traffic accident injury after a prescription for a benzodiazepine*. Annals Epidemiol, 5 (1995) 239-44.

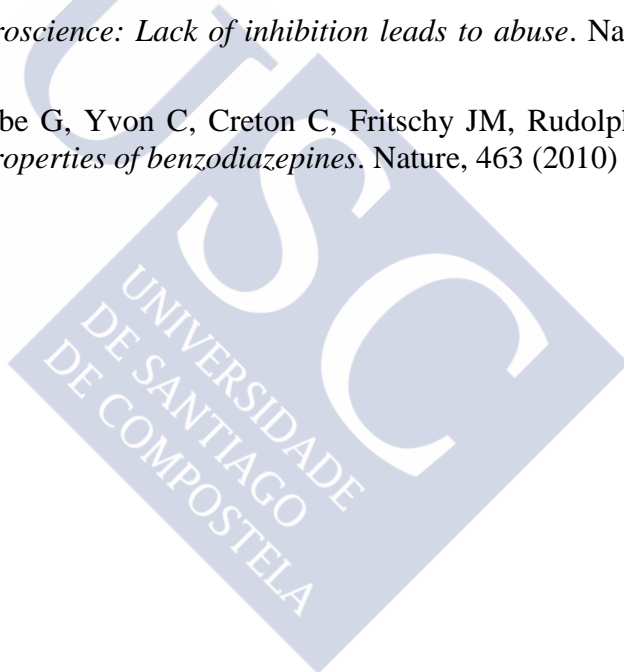
O'Brien CP. *Benzodiazepine use, abuse and dependence*. J Clin Psychiatry, 66 (2005) 28-33.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. *Rang y Dale Farmacología*. 7ª Ed, Elsevier España SL, Barcelona, 2012.

Rayon P, Montero D, Santamaría B. *Benzodiazepine consumption in Spain*. Eur J Clin Pharmacol, 52 (1997) 321-323.

Riegel A, Kalivas PW. *Neuroscience: Lack of inhibition leads to abuse*. Nature, 463 (2010) 743-744.

Tan KR, Brown M, Labouèbe G, Yvon C, Creton C, Fritschy JM, Rudolph U, Lüscher C. *Neural bases for addictive properties of benzodiazepines*. Nature, 463 (2010) 769-774.



I.4. MATRICES BIOLÓGICAS

La toxicología forense es la responsable del análisis de psicofármacos y drogas susceptibles de causar dependencia y abuso, así como de la interpretación de los resultados obtenidos en ellos. Los test toxicológicos son frecuentemente presentados en los juzgados como pruebas en los juicios de modo que las conclusiones obtenidas dependen en muchas ocasiones de la correcta interpretación de los análisis realizados. Por ello cobran gran importancia tanto las técnicas utilizadas, como la matriz biológica seleccionada para llevar a cabo los ensayos.

Tradicionalmente las muestras más utilizadas en el análisis de drogas son la sangre o el plasma y la orina. Los resultados en sangre y/o plasma muestran de modo dinámico la distribución de la droga en el cuerpo, es decir, se puede conocer la concentración real de droga que en un determinado momento está afectando al individuo, y por tanto las condiciones farmacológicas del sujeto. Por el contrario, las concentraciones encontradas en orina normalmente no se correlacionan con los efectos farmacológicos que se producen en el individuo; no obstante, los elevados niveles de droga y metabolitos presentes en ella demuestran un consumo previo de la misma. Esto, junto con la accesibilidad de las muestras y el amplio conocimiento de la farmacocinética de las drogas, convierte a estos fluidos biológicos en los más utilizados por los toxicólogos para la determinación de sustancias de abuso. Así, hasta los años ochenta, la presencia y distribución de las drogas en el cuerpo humano y sus posibles consecuencias en general se obtuvieron a través de los análisis de plasma y orina.

Sin embargo, en las últimas décadas se han comenzado a realizar determinaciones de drogas en otras matrices y fluidos diferentes, no convencionales, como humor vítreo, pelo, saliva y/o sudor. Esta nueva situación se debe a los avances tecnológicos que han permitido medir cantidades mínimas de sustancias y sus metabolitos en estas muestras complejas, suponiendo una gran ayuda para el estudio de la farmacocinética de psicofármacos y drogas de abuso. Estos nuevos medios biológicos surgieron como alternativa, pero también como complemento de las matrices utilizadas hasta el momento, ya que cada una de ellas posee características especiales que proporcionan una información diferente, presentando por lo tanto ventajas e inconvenientes [Kintz y col, 2007]. Cada una de estas matrices biológicas

tiene unas características diferentes (concentraciones de droga y metabolitos, ventanas de detección, cantidad de muestra disponible), lo que hace que tengan distinta utilidad.

La concentración de las drogas en la sangre y otras matrices se utiliza habitualmente para interpretar posibles intervalos en los que se ha producido la ingestión o exposición a una sustancia, y como ayuda para determinar los posibles efectos farmacológicos. Por todas estas razones, en este trabajo se han desarrollado nuevos métodos analíticos para determinar opiáceos y cocaína en plasma, orina, pelo y saliva, así como benzodiazepinas en humor vítreo.

I.4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA SANGRE/PLASMA

La sangre es un líquido viscoso que fluye a través del organismo por un circuito cerrado de vasos llamados arterias, venas y capilares. Sus principales funciones se centran en su capacidad de disolver o mantener en suspensión sustancias y por tanto transportarlas por todo el cuerpo. Está compuesta por los elementos formes (glóbulos rojos o eritrocitos, glóbulos blancos o leucocitos, plaquetas) y el *plasma*, un líquido amarillento sin células [Hall, 2011]. La fase líquida de la sangre coagulada se denomina *suero*, que se diferencia del plasma por la ausencia de fibrinógeno y otras proteínas que se consumieron durante la coagulación.

El plasma es una mezcla compleja cuyo principal componente es el agua (91%). Además contiene proteínas (8%), aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, sales, hormonas, enzimas, anticuerpos, gases en disolución y productos de degradación como urea y creatinina. Es ligeramente alcalino con un pH=7.4. El plasma contiene varias clases de proteínas: fibrinógeno, globulinas alfa, beta y gamma, albúminas y lipoproteínas. La albúmina es la proteína plasmática más abundante y es capaz de fijar diversos fármacos y determinar la proporción de fármaco libre presente en plasma. La presencia de estas proteínas hace que la sangre sea unas seis veces más viscosa que el agua [Martínez-Liarte, 1995]. Un adulto normal de 70 Kg de peso tiene aproximadamente 5 litros de sangre, un 7% del peso corporal. Las funciones de sus componentes están en la tabla 5.

Tabla 5. Funciones de los componentes de la sangre.

Componentes	Funciones
Agua	Disolvente para transportar sustancias
Sales	Balance osmótico, regulación pH (Na, Ca, Mg, Cl), permeabilidad de membranas
Proteínas plasmáticas	Balance osmótico, coagulación (albumina, fibrinógeno, inmunoglobulinas), defensa
Eritrocitos	Transporte de O ₂ y CO ₂
Leucocitos	Producción de anticuerpos, contra infecciones
Plaquetas	Coagulación
Glucosa, ácidos grasos, vitaminas, hormonas, productos metabólicos	Nutrientes

Centrifugando una muestra de sangre con anticoagulante se obtendrán tres capas: una masa celular que queda en el fondo del tubo y un sobrenadante que es el plasma propiamente dicho. Entre estas dos capas hay una tercera más pequeña de color grisáceo-rosado, llamada “crema de leucocitos”, cuyo principal componente son los leucocitos, pero además contiene plaquetas [Hall, 2011].

La sangre proporciona una estimación de la concentración actual circulante de los analitos de interés, por tanto es la muestra que mejor correlaciona sus niveles con el efecto farmacológico o tóxico, indicando si el individuo se encuentra bajo la influencia de una determinada sustancia. De todas formas, el tiempo de detección de las drogas es muy corto (24-48 horas), por tanto es muy útil solo cuando se trata de demostrar un consumo reciente. La muestra es recogida por personal especializado, por lo que es difícil su adulteración por parte del paciente.

Una limitación del uso de la sangre como muestra biológica es que requiere la adición de conservantes [Levine, 2003]. Además, su análisis toxicológico debe ser considerado bajo un triple aspecto: la presencia del agente absorbido, su distribución por todo el organismo y su paso a las vías de excreción. Puesto que ocupa un lugar intermedio entre el medio externo e interno, puede ejercer a la vez una doble función de ser vehículo y tejido, lo que le

proporciona un carácter excepcional. En la práctica, la determinación de sustancias en este tipo de muestra se ve limitada por la mayor o menor facilidad de su aislamiento: destrucción de materia orgánica, previa al estudio de compuestos minerales; separación a partir de las proteínas, previa al análisis de compuestos orgánicos, etc.

I.4.2. CARACTERÍSTICAS DE LA ORINA

La orina se produce en el riñón, cuya unidad funcional es la nefrona (Figura 20, en recursos.cnice-mec.es/.../contenidos/14.htm). Cada riñón posee aproximadamente un millón de nefronas que contienen los glomérulos, en donde la sangre que llega es filtrada. El volumen y composición de la orina se modifica a medida que atraviesa los túbulos proximal y distal, en donde puede darse secreción activa de los componentes desde la sangre o reabsorción pasiva desde el ultrafiltrado hacia la sangre. Solo las moléculas con un peso inferior a 50.000 unidades de masa atómica son filtradas en los glomérulos, lo que significa que las proteínas no son filtradas y por tanto tampoco lo serán las drogas unidas a las proteínas plasmáticas. La filtración y la secreción aumentan la concentración de la sustancia en el fluido tubular, mientras que la reabsorción la disminuye.

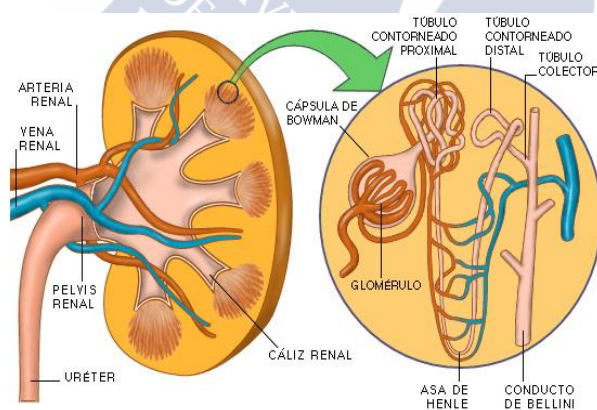


Figura 20. Unidad funcional del riñón: Nefrona.

La orina está constituida por un 98% de agua y un 2% de urea, ácido úrico, minerales y materiales fisiológicos regeneradores (hormonas, enzimas). Se trata de un fluido cuya composición química asegura el mantenimiento del balance hídrico entre los electrolitos, y la acidez del líquido extracelular corporal hacia la vejiga; esto quiere decir que la orina es tan sólo un filtrado de los componentes químicos de nuestro propio suero, no es tóxica y tampoco

es un simple desecho de sustancias no necesarias para nuestro cuerpo. Su densidad oscila entre 1.01 a 1.03 g/mL y su pH normal está entre 4.5 y 7.5. Como el pK_a de ácidos débiles está entre 3 y 7.5 y el pK_a de bases débiles está entre 7.5 y 10, ciertas drogas pueden estar presentes en diferentes proporciones dependiendo del pH urinario. Las drogas básicas se excretarán mejor en orinas ácidas, mientras que las drogas ácidas ven favorecida su excreción en orinas básicas [Levine, 2003].

La orina es la matriz de elección para realizar el cribado cualitativo en los laboratorios de toxicología, debido a una serie de ventajas: la concentración de las drogas puede llegar a ser 100 veces mayor que en la sangre; es posible la detección de sustancias durante varios días postconsumo; no contiene proteínas, por lo que las interferencias son mínimas; se obtiene fácilmente y en cantidad suficiente, en contraposición con la sangre por el mal estado de las venas en sujetos adictos a drogas por vía parenteral (ADVPs); y no necesita adición de conservantes, solo debe conservarse en frío hasta su análisis. Pero si la muerte se produce rápidamente, la detección de la droga o sus metabolitos en orina será difícil [Skopp, 2004; Pla Martínez y Hernández Jerez, 2004]. Además, su recogida implica una potencial intrusión en la privacidad del sujeto, ya que es necesaria la observación directa para evitar adulteraciones o sustituciones de la muestra.

Los análisis cuantitativos de orina permiten medir la concentración acumulada de las drogas desde el último vaciamiento de la vejiga, pero puede variar sustancialmente pues va a depender de la cantidad de líquido ingerido. De todas formas se ha de destacar que los estudios en orina proporcionan un mayor tiempo de diagnóstico ya que para la mayoría de las drogas el tiempo de detectabilidad alcanza hasta varios días después del consumo, frente a 8-24 horas en el caso de la sangre. Por estas razones, los análisis urinarios con frecuencia son de ayuda para determinar los efectos fisiológicos del agente tóxico, si bien la correlación existente entre ambos es pobre debido a varios factores que influyen en la velocidad de excreción y en el volumen urinario.

I.4.3. CARACTERÍSTICAS DE LA SALIVA

La saliva es un fluido incoloro y de baja viscosidad, cuyo componente principal es el agua (>97%), aunque también contiene electrolitos (sodio, potasio, cloruro y bicarbonato), proteínas (inmunoglobulinas, amilasa, lipasa, lisozima, mucina) y sustancias transportadas

desde la sangre [Aps y Martens, 2005; Lee y col, 2007]. La saliva es secretada dentro de la cavidad oral por diversos tipos de glándulas, principalmente las submandibulares situadas debajo de la lengua (65%), las parótidas que están en la parte superior de la boca (23%), y las sublinguales que se encuentran a ambos lados de la boca (4%), además de muchas otras glándulas pequeñas distribuidas en la cavidad oral (8%) [Haeckel y Hänecke, 1996; Vining y McGinley, 1985; Veerman y col, 1996; Caddy, 1984]. La unidad básica de las glándulas salivares es el salivón, que está formado por ácinos, conductos intercalares, conductos estriados y el conducto excretor. Los ácinos son sacos formados por células serosas y mucosas que segregan ptilina o amilasa, y mucina, respectivamente. (Figura 21, en perfilembriologicobucodental.blogspot.com).

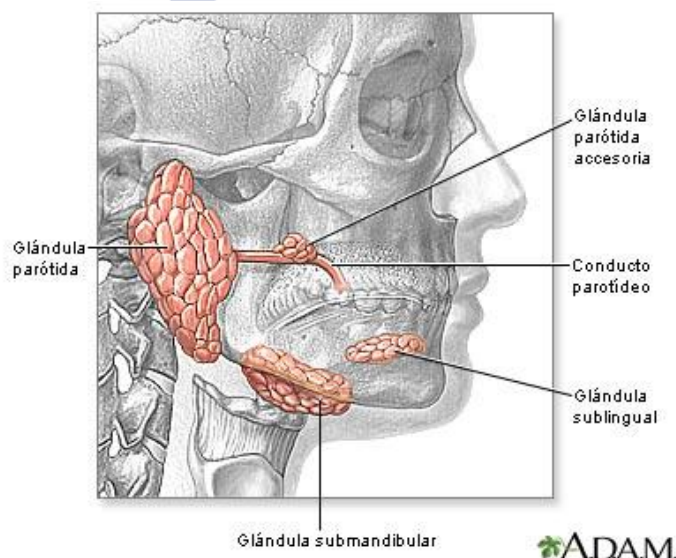


Figura 21. Glándulas salivales.

La salivación puede ser estimulada o reducida por varios factores (ritmo circadiano, medicamentos), y su pH (5.5-7.9), volumen y composición pueden variar a lo largo del día, por lo que la recogida de muestra debe ser estandarizada [O'Neal y col, 2000]. En condiciones basales, el volumen producido de saliva es de 0.5 mL/min, pero puede aumentar hasta 5-6 mL/min. Crouch [2005] demuestra que cuando el pH disminuye, una porción mayor de fármacos básicos se ioniza y su concentración en saliva aumenta.

Una delgada capa de células entre los conductos salivares y la circulación sistémica permite el paso de sustancias hidrosolubles y liposolubles por difusión pasiva, ultrafiltración o

transporte activo [Kidwell y col, 1998; Li y col, 2007]; sin embargo, dado que no está del todo claro el mecanismo de incorporación de ciertas sustancias a la saliva, no siempre se puede establecer una correlación constante entre ésta y la sangre, lo que dificulta en la práctica una correcta interpretación de los resultados analíticos obtenidos.

El primero en utilizar esta muestra biológica con fines analíticos fue Rasmussen [1964] que estudió la secreción de sulfonamidas a través de la saliva en animales, y a partir de sus trabajos se ha ido extendiendo su aplicación a numerosos compuestos de naturaleza orgánica, incluyendo distintos fármacos, alcohol y drogas de abuso [Schramm y col, 1992; Cone, 1993; Cone, 1997; Jones y col, 2002]. En ocasiones la presencia de drogas y/o fármacos en fluido oral solo permite demostrar el consumo reciente de las sustancias detectadas. De todas formas, existen algunas organizaciones (FDA, SAMHSA, etc.) que han establecido unas directrices indicativas de valores para cada grupo de drogas de abuso, por encima de los cuales se considera que la sustancia ha sido consumida con fines no terapéuticos. En ocasiones, aunque la sangre es la muestra biológica más empleada para proporcionar información valiosa sobre un consumo de sustancias, la saliva o fluido oral constituye una buena alternativa [Kadehjian, 2005; Drummer, 2006; Samyn y col, 2007; De Giovanni, 2008], sobre todo debido a su fácil recogida en relación con los fluidos biológicos tradicionales.

I.4.4. CARACTERÍSTICAS DEL PELO

El pelo es una matriz alternativa y complementaria a las anteriores dado que el periodo de detectabilidad de las drogas comienza varios días después de su administración, momento en el que habitualmente dejan de detectarse en la orina. Se utiliza para demostrar un consumo anterior (semanas o meses antes de la recogida de la muestra). La presencia de drogas en el pelo también puede deberse a una contaminación externa, por lo que es necesario realizar un lavado previo al tratamiento de la muestra, pero la presencia de metabolitos de las drogas se considera una prueba de consumo. Debido a que el pelo crece como media 1 cm/mes, un análisis segmentado permite determinar el historial de abuso, siendo la zona occipital del cuero cabelludo la más adecuada para recoger el pelo porque la velocidad de crecimiento del mismo es más constante. La toma de muestra se debe hacer en un ambiente no contaminado, indicando sus extremos proximal y distal.

Para poder interpretar adecuadamente los resultados derivados del análisis, es necesario conocer su biología. El folículo piloso es una invaginación tubular de la epidermis que se extiende por la dermis a 3-4 mm de profundidad [Hashimoto y Shibazaku, 1976]. Está rodeado por dos densas redes de capilares y glándulas sebáceas, apocrinas y sudoríparas, lo que permite la incorporación al pelo, no solo de los xenobióticos, sino también de aquellas sustancias endógenas presentes en los tejidos situados bajo el folículo. Los principales componentes son: cutícula o capa más externa del pelo, córtex o zona intermedia del pelo, médula o núcleo del pelo, y membrana celular, que aparece en pelo totalmente queratinizado. A lo largo de su eje, el pelo se divide en tres zonas: la más interna, en donde se sintetizan las células del pelo; la zona queratogénica, en donde se fortalece y solidifica, y la zona final o región del pelo definitivo, formada por células deshidratadas y cornificadas (Figura 22) [Harkey, 1993].

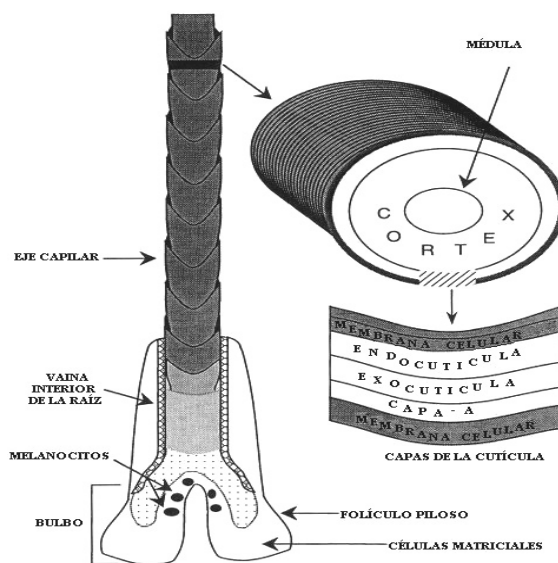


Figura 22. Anatomía de un folículo piloso y su eje capilar.

El pelo es un entramado polimérico parcialmente cristalino, que contiene numerosos grupos funcionales y permite, por tanto, la incorporación de moléculas pequeñas. Está formado por proteínas (65-95%), agua (15-35%), lípidos (1-9%), minerales (0.25-0.95%) y melanina, de concentración variable según el color y el tipo de pelo.

El análisis del pelo se basa en el hecho de que muchas drogas son atrapadas y permanecen estables en la matriz de queratina del pelo [Wang y Cone, 1995]. Varios autores [Blank y Kidwell, 1995; Cone, 1996] han descrito diferentes mecanismos de incorporación de drogas al pelo, aunque todos incluyen:

- *Difusión pasiva de las drogas desde la sangre* a las células del pelo en crecimiento situadas en la base del folículo [Pötsch y col, 1997].
- *Transferencia de las drogas desde el sudor y las glándulas sebáceas y apocrinas*, una vez formado el pelo definitivo [Henderson y col, 1996].
- *Contaminación externa*, en ambientes en donde se fuman drogas o se realizan análisis de grandes cantidades de las mismas (laboratorios).
- *Difusión en la piel desde la sangre y el sudor*, La piel actúa como un reservorio para fármacos lipófilos [Schaefer y col, 1982; Rougier y Lotte, 1987]. Cuando se da contaminación externa, las sustancias pasan lentamente a la dermis y posteriormente a la sangre.

Una vez incorporadas las drogas en el pelo, éstas quedan retenidas formando complejos estables que pueden ser detectados durante largos períodos de tiempo [Kintz y col, 2007]. Hay varios lugares de unión de las drogas al pelo: proteínas, melanina y lípidos. La afinidad por la queratina es sustancialmente mayor para las drogas básicas, tales como cocaína, nicotina y morfina. Con respecto a la melanina, se piensa que ocurre un fenómeno de intercambio iónico, donde esta sustancia sería el receptor de electrones; esto explicaría por qué especies aniónicas (aspirina, THC) no son bien retenidas en el pelo, mientras que sustancias catiónicas (cocaína, opiáceos) están en altas concentraciones. Por último, y aunque puede darse esta unión con algunos fármacos [Wertz y Downing, 1988; Wertz y Downing, 1989], los lípidos no juegan un papel muy importante en la retención de drogas en pelo, por encontrarse en una pequeña proporción en esta muestra [Joseph, 1996].

I.4.5. CARACTERÍSTICAS DEL HUMOR VÍTREO

El humor vítreo es una sustancia gelatinosa transparente, que facilita la difusión de diferentes sustancias químicas desde el cuerpo ciliar hacia la retina. Su pH está entre 7 y 7.8 y se localiza entre el cristalino y la retina, ocupando la porción central del ojo. Su volumen aproximado es de 4 mL y constituye el 80% del globo ocular, siendo, por tanto, la mayor estructura interna del ojo (Figura 23, en <http://anatomiadelojohumano.blogspot.mx/>). El 99%

de su composición es agua, aparte de la cual, sus dos componentes principales son el colágeno y el ácido hialurónico, a los que se deben sus propiedades viscoelásticas. Otros componentes son: aminoácidos, glucoproteínas, ácido ascórbico, ácido láctico, lípidos y sustancias de bajo peso molecular (iones sodio, potasio, cloruro, calcio y fosforo) [Comper y Laurent, 1978; Swann, 1980; Xu y col, 2000].

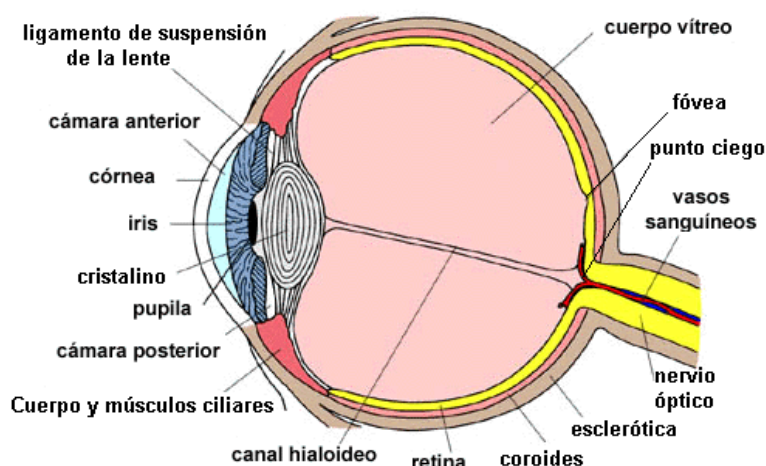


Figura 23. Esquema del ojo.

El humor vítreo desempeña un importante papel en el movimiento de solutos y disolventes dentro del ojo [Vogel y Hodnett, 1981; Logan y Stafford, 1990; Bermejo y col, 1992; Lin y col, 1997]. El movimiento del agua en el interior del vítreo es muy activo, con el 50% de la misma circulando cada 10-15 minutos. Sus funciones fisiológicas normales son: soporte de la retina y función de relleno de la cavidad vítrea, barrera de difusión entre los segmentos anterior y posterior del ojo, amortiguación metabólica, y establecimiento de una vía para el paso de la luz sin restricciones [Sebag y Ophyh, 1994; Pla Martínez y Hernández Jerez, 2004; Repetto Jiménez y Repetto Kuhn, 2009]. Las sustancias que llegan al vítreo desde la circulación general lo hacen a partir de la arteria oftálmica, difundiendo sólo la droga libre. El equilibrio entre la concentración en sangre y humor vítreo depende de los siguientes factores: solubilidad de la droga en humor vítreo, liposolubilidad y pK_a de la droga, y pH de los dos fluidos [Ziminski y col, 1984].

Ante la imposibilidad de disponer de otro tipo de muestras (orina, plasma, sangre) en numerosas ocasiones (cuerpos que hayan sufrido shocks hemorrágicos o procesos de descomposición, quemados, embalsamados, etc), las investigaciones se han dirigido hacia

otros fluidos corporales, que se encuentran en lugares cerrados y por tanto protegidos de la contaminación. De todos ellos, el humor vítreo es el que ofrece indudablemente más ventajas para determinar diferentes tipos de drogas; porque su acceso es sumamente fácil, su volumen es suficiente, posee un bajo contenido de proteínas y células, no está muy influido por los procesos agónicos y postmortem, y no permite neoformación de alcohol por fermentación porque no contiene glucosa. Estas características la convierten en una muestra extremadamente útil para la detección de drogas de abuso [Fernández y col, 2011] y benzodiazepinas [Fernández y col, 2013].

Por otra parte, a la hora de interpretar los resultados de los análisis toxicológicos llevados a cabo hay que tener en cuenta el tiempo transcurrido desde la muerte del sujeto, la vía de administración de la droga consumida, los hábitos de consumo del individuo y la redistribución postmortem [Fernández y col, 2006]. Wyman y Bultman [2004] comprobaron que el vítreo es una muestra adecuada para el análisis de drogas de abuso, llegando a discernir si la morfina presente en la muestra deriva de un consumo de heroína o del metabolismo de la codeína; si la relación codeína/morfina es mucho menor que 1 se trataría de morfina proveniente del consumo de heroína. En general, los resultados en humor vítreo deben servir para confirmar la presencia de drogas de abuso, especialmente en el caso de 6AM, para certificar el consumo de heroína debido a su mayor permanencia en vítreo [Fucci y col, 2006; Antonides y col, 2007] pero extrapolar estos resultados para evaluar niveles sanguíneos en el momento de la muerte puede dar error [Drummer y Gerostamoulos, 2002].

La tabla 6 recoge las ventajas y desventajas de las cinco matrices biológicas estudiadas.

Tabla 6. Características de las matrices biológicas estudiadas.

	Sangre/ Plasma	Orina	Saliva	Pelo	Humor vítreo
Recogida	Invasiva	Intrusiva	Fácil acceso	Fácil acceso	Fácil acceso
Adecuación	Diagnóstico intoxicación	Inadecuada en muertes rápidas	En consumos recientes	En consumos anteriores	En casos de putrefacción
Deterioro	Si	No	A veces hay contaminación oral	No	Resistente a contaminación bacteriana
Adulteración	No	Posible	Difícil	No	No
Disponibilidad	1-5 mL	>50 mL	1-5 mL	Variable	1-2 mL
Ventana detección	desde: min hasta: 24-48h	desde: 3-9h hasta: 1-3 días	desde: min hasta: 24h	desde: 10 días hasta: 1 año	----
Concentración	Baja	Alta (varía con pH)	Muy baja (es la fracción libre de drogas)	Baja	Baja
Preparación previa	Si	Si	Si	Si	Si
Interpretación resultados	Correlación con estado clínico	Un negativo no es excluyente	Correlación con niveles plasma (pH-dependiente)	Demuestra consumo	Demuestra consumo

I.4.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antonides HM, Kiely ER, Marinetti LJ. *Vitreous fluid quantification of opiates, cocaine and benzoylecgonine: comparison of calibration curves in both blood and vitreous matrices with corresponding concentrations in blood.* J Anal Toxicol, 31 (2007) 469-476.

Aps JKM, Martens LC. *Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva.* Forensic Sci Int, 150 (2005) 119-131.

Bermejo AM, Ramos I, Fernández P, López-Rivadulla M, Cruz A, Chiarotti M, Fucci N, Marsilli R *Morphine Determination by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy in Human Vitreous Humor and Comparison with Radioimmunoassay.* J Anal Toxicol, 16 (1992) 372-374.

Blank DL, Kidwell DA. *Decontamination procedures for drugs of abuse in hair: are they sufficient?* Forensic Sci Int, 70 (1995) 13-38.

Caddy B. *Saliva as a specimen for drug analysis.* In: Baselt RC (Ed). *Advances in Analytical Toxicology Vol.1.* Biomedical Publications, Foster City, CA, 1984, pp 198-254.

Comper WD, Laurent TC. *Physiological function of connective tissue polysaccharides.* Physiol Rev, 58(1) (1978) 255-315.

- Cone EJ. *Cocaine disposition in saliva following intravenous, intranasal and smoked administration*. J Anal Toxicol, 21 (1997) 465–475.
- Cone EJ. *Mechanisms of drug incorporation into hair*. Ther Drug Monit, 148 (1996) 438-443.
- Cone EJ. *Saliva testing for drugs of abuse*. Ann New York Acad Sci, 694 (1993) 91–127.
- Crouch DJ. *Oral fluid collection: The neglected variable in oral fluid testing*. Forensic Sci Int, 150 (2005) 165-173.
- De Giovanni N, Fucci N. *The state of the art on the use of oral fluid as alternative specimen in Forensic Toxicology*. Current Pharmaceutical Analysis, 4 (2008) 258-273.
- Drummer OH. *Drug testing in oral fluid*. Clin Biochem Rev, 27 (2006) 147-159.
- Drummer OH, Gerostamoulos J. *Postmortem drug analysis: Analytical and toxicological aspects*. Ther Drug Monitor, 24 (2002) 199-209.
- Fernández P, Aldonza M, Bouzas A, Lema M, Bermejo AM, Taberero MJ. *GC-FID determination of cocaine and its metabolites in human bile and vitreous humor*. J Appl Toxicol, 26 (2006) 253-257.
- Fernández P, Lago M, Álvarez I, Carro AM, Lorenzo RA. *Chromatographic Determination of six Benzodiazepines in Vitreous Humor after Microwave-Assisted Extraction*. Anal Methods, 5 (2013) 4999-5004.
- Fernández P, Seoane S, Vázquez C, Bermejo AM, Carro AM, Lorenzo RA. *A rapid analytical method based on microwave-assisted extraction for the determination of drugs of abuse in vitreous humor*. Anal Bioanal Chem, 401 (2011) 2177-2186.
- Fucci N, De Giovanni N, De Giorgio F, Liddi R, Chiarotti M. *An evaluation of the cozart[®] rapiscan system as an on-site screening tool for drugs of abuse in a non-conventional biological matrix: vitreous humor*. Forensic Sci Int, 156 (2006) 102-105.
- Haeckel R, Hänecke P. *Application of saliva for drug monitoring. An in vivo model for transmembrane transport*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 34 (1996) 171-191.
- Hall JE. *Guyton & Hall. Tratado de Fisiología Médica*. 12^a Ed, Elsevier España SL, Barcelona, 2011.
- Harkey MR. *Anatomy and physiology of hair*. Forensic Sci Int, 63 (1993) 9-18.
- Hashimoto K, Shibazaku S. *Ultrastructural study of differentiation and function of hair*. In: Kobori T, Montagna W (Eds). *Biology and diseases of the hair*. Tokyo University Press, Tokyo, 1976, pp 23-57.
- Henderson GL, Harkey MR, Zhou CH, Jones RT, Peyton J III. *Incorporation of isotopically labeled cocaine and metabolites into human hair: 1. Dose-response relationships*. J Anal Toxicol, 22 (1996) 156-165.
- Jones J, Tomlinson K, Moore C. *The simultaneous determination of codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, 6-acetylmorphine, and oxycodone in hair and oral fluid*. J Anal Toxicol, 26 (2002) 171-175.
- Joseph RE Jr, Su T-P, Cone EJ. *In vitro bindings of drugs to hair: influence of melanin and lipids on cocaine binding to caucasoid and africoid hair*. J Anal Toxicol, 20 (1996) 338-344.
- Kadehjian L. *Legal issues in oral fluid testing*. Forensic Sci Int, 150 (2005) 151-160.

- Kidwell DA, Holland JC, Athanaselis S. *Testing for drugs of abuse in saliva and sweat*. J Chromatogr B, 713 (1998) 111-135.
- Kintz P, Ginet M, Marques N, Cirimele V. *Arsenic speciation of two specimens of Napoleon's hair*. Forensic Sci Int, 170 (2007) 204-206.
- Lee JY, Chung JW, Kim YK, Chung SC, Kho HS. *Comparison of the composition of oral mucosal residual saliva with whole saliva*. Oral Dis, 13 (2007) 550-554.
- Levine B. *Principles of forensic toxicology*. 2nd Ed, AACC, Washington DC, 2003.
- Li PW, Wang YJ, Liu JF. *Analysis on the abused drugs in saliva and correlation of saliva drugs concentrations with blood concentrations*. Fa Yi Xue Za Zhi, 315 (2007) 309-311.
- Lin DL, Chen CY, Havier R, Lin RL. *Distribution of codeine, morphine, and 6-acetylmorphine in vitreous humor*. J Anal Toxicol, 21 (1997) 258-261.
- Logan BK, Stafford DT. *High Performance Liquid Chromatography with column switching for the determination of cocaine and benzoylecgonine concentrations in vitreous humor*. J Forensic Sci, 35 (1990) 1303-1309.
- Martínez-Liarte JH. *Proteínas de la sangre*. En: Lozano JA (Ed). Bioquímica para las ciencias de la salud. Ed. McGraw-Hill, Madrid, 1995.
- O'Neal CL, Crouch DJ, Rollins DE, Fatah A. *The effects of collection methods on oral fluid codeine concentrations*. J Anal Toxicol, 24 (2000) 536-542.
- Pla Martínez A, Hernández Jerez AF. *Investigación toxicológica*. En: Villanueva E (Ed). Medicina Legal y Toxicología. 6^a Ed, Masson, Barcelona, 2004, pp 778-811.
- Pötsch L, Skopp G, Moeller MR. *Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation*. Forensic Sci Int, 84 (1997) 25-35.
- Rasmussen F. *Salivary excretion of sulphonamides and barbiturates by cows and goats*. Acta Pharmacol Toxicol, 21 (1964) 11-19.
- Repetto Jiménez M, Repetto Kuhn G. *Toxicología Fundamental*. 4^a Ed, Díaz de Santos, Madrid, 2009.
- Rougier A, Lotte C. *Correlations between horny layer concentration and percutaneous absorption*. In: Shroot B, Schaefer H (Eds). Skin Pharmacokinetics. Pharmacology and the skin Vol. 1. Karger, Basel, 1987, pp 81-102.
- Samyn N, Laloup M, de Boeck G. *Bioanalytical procedures for determination of drugs of abuse in oral fluid*. Anal Bioanal Chem, 388 (2007) 1437-1453.
- Schaefer H, Zesch A, Stuttgen G. *Skin permeability*. Springer-Verlag, Berlin, 1982.
- Schramm W, Smith RH, Craig PA. *Drugs of abuse in saliva: A review*. J Anal Toxicol, 16 (1992) 1-9.
- Sebag J, Ophych FC. *El Vítreo*. En: Hart WK (Ed.). Fisiología del ojo. 9^a Ed, Mosby/Doyma, Madrid, 1994, pp 270-349.
- Skopp G. *Preanalytic aspects in post-mortem toxicology*. Forensic Sci Int, 142 (2004) 75-100.
- Swann DA. *Chemistry and Biology of Vitreous Body*. Int Rev Exp Pathol, 22 (1980) 118.

- Veerman ECI, Van den Keijbus PAM, Vissink A, Van Nieuw Amerongen A. *Human glandular salivas: their separate collection and analysis*. Eur J Oral Sci, 104 (1996) 346-352.
- Vining RF, McGinley RA. *Hormones in saliva*. Crit Rev Clin Lab Sci, 23 (1986) 95-146.
- Vogel J, Hodnett CN. *Detection of Drugs in Vitreous Humor with an Enzyme Immunoassay Technique*. J Anal Toxicol, 5 (1981) 307-309.
- Wang W, Cone E. *Testing human hair for drugs of abuse. IV. Environmental cocaine contamination and washing effects*. Forensic Sci Int, 70 (1995) 39-51.
- Wertz PW, Downing DT. *Integral lipids of human hair*. Lipids, 23 (1988) 878-881.
- Wertz PW, Downing DT. *Integral lipids of mammalian hair*, Comp Biochem Physiol, 92B (1989) 759-61.
- Wyman J, Bultman S. *Postmortem distribution of heroin metabolites in femoral blood, liver, cerebrospinal fluid, and vitreous humor*. J Anal Toxicol, 28 (2004) 260-263.
- Xu J, Heys JJ, Barocas VH, Randolph TW. *Permeability and diffusion in vitreous humor: implications for drug delivery*. Pharm Research, 17 (2000) 664-669.
- Ziminski KR, Wemyss CT, Bidanset JH, Manning TJ, Lukash L. *Comparative study of post-mortem barbiturates, methadone and morphine in vitreous humor, blood and tissue*. J Forensic Sci, 29 (1984) 903-909.



I.5. METODOLOGÍA ANALÍTICA

I.5.1. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS

La extracción asistida por microondas es una técnica de preparación de muestra que proporciona recuperaciones mejores o similares a las obtenidas en los procesos de extracción convencionales. Además, ofrece otras ventajas como un menor consumo de energía, menor tiempo invertido, menores volúmenes de disolvente y menor cantidad de residuos, por eso se puede considerar una *técnica limpia* [Kingston y Haswell, 1997; Ericsson y Colmsjö, 2000].

Las microondas son ondas electromagnéticas de alta frecuencia con un intervalo de longitud de onda que abarca desde 1 mm a 1 m (frecuencia de 300 a 3000000 MHz). La frecuencia máxima a la que pueden actuar la mayoría de microondas industriales y domésticos es 2450 MHz (o a una longitud de onda de 12.2 cm), para evitar la interferencia con las ondas de radio frecuencia. Las microondas constan de un componente eléctrico y un componente magnético; éstas poseen una variación sinusoidal y son perpendiculares entre sí, al igual que sus direcciones de propagación. La energía de microondas se absorbe en forma de fotones. La capacidad de absorber energía de microondas varía con la naturaleza química de la especie sometida a la radiación. Si las moléculas polares o partículas cargadas son libres para moverse causan una corriente en el material, en caso contrario, las partículas sufren una reorientación para colocarse en la dirección del campo eléctrico. Esto se conoce como polarización dieléctrica [Jacob y Boey, 1995]. La polarizabilidad se representa por la constante dieléctrica (ϵ'), que es una medida de la capacidad de la muestra para obstruir el paso de la energía de microondas a través de ella. De modo que a mayor valor de ϵ' mayor es la energía electromagnética que puede ser almacenada en el material. En presencia de un campo eléctrico los dipolos se orientan absorbiendo energía y una vez eliminado el campo eléctrico se restaura el desorden molecular debido a la agitación térmica, liberándose o disipándose la energía absorbida en forma de calor pero no de forma inmediata, sino en un corto intervalo de tiempo, que es el tiempo de relajación. La eficacia del calentamiento depende del tiempo de relajación dieléctrica que depende de la temperatura y de la viscosidad de la muestra. Por tanto el calentamiento de una muestra sometida a radiación de microondas dependerá también de la capacidad de la muestra para transformar la energía en calor. Por eso se define la

siguiente ecuación [Caddick, 1995] que permite saber la capacidad de un disolvente para transmitir energía a los otros:

$$\mathbf{Tan \delta = \epsilon''/\epsilon'}$$

donde δ es el factor de disipación, ϵ'' es la pérdida dieléctrica (una medida de la eficacia de conversión de la energía de microondas en energía calorífica), y ϵ' es la constante dieléctrica.

La ecuación anterior muestra que a una determinada frecuencia no hay una relación entre la constante dieléctrica y el factor de pérdida dieléctrica y que no todos los materiales con alta permitividad dieléctrica presentan un factor de pérdida elevado o alta absorción de energía de microondas. Así, cuando la energía de microondas penetra en una muestra, es absorbida en una proporción dependiente del factor de disipación. La penetración es considerada infinita en materiales transparentes a la energía de microondas y cero en materiales reflectivos como los metales [Letellier y Budzinski, 1999].

En la extracción asistida por microondas (MAE) el calentamiento de la muestra ocurre por distintos mecanismos según se utilice como disolvente: una mezcla de disolventes con alta y baja pérdida dieléctrica, un disolvente con pérdida dieléctrica baja con una muestra de pérdida dieléctrica alta o una mezcla de disolventes polares con pérdida dieléctrica alta [Dean y col, 1999]. Los parámetros que influyen en un proceso de extracción asistida por microondas son:

Disolvente: los disolventes polares absorben la energía de microondas fácilmente y se calientan mientras están sometidos a la radiación. Durante el proceso de extracción en recipientes cerrados, el disolvente elegido puede ser calentado por encima de su punto de ebullición, reduciéndose el tiempo requerido para la extracción. El volumen del disolvente debe ser suficiente para asegurar que todo el analito está en él; normalmente es 10-30 mL [Eskilsson y Björklund, 2000; Cela y col, 2002].

Temperatura: afecta a los dos mecanismos de conversión de energía: rotación dipolar y conducción iónica. La contribución de cada uno de estos dos mecanismos de calentamiento dependerá de la molécula, de la concentración de los iones en la muestra y de su tiempo de relajación. El agua exhibe una reducción del factor de disipación cuando aumenta la temperatura, mientras que la mayoría de los disolventes orgánicos se comportan de modo contrario. La estabilización de la temperatura es posible sólo si el calor se puede eliminar en

proporción suficientemente alta o si se limita la potencia del microondas. Si se trabaja a una temperatura superior al punto de ebullición del disolvente la eficacia de la extracción aumenta porque aumenta la desorción de analitos de la matriz y la capacidad de solubilización de los disolventes, mientras que disminuye la tensión superficial y la viscosidad del disolvente [Ericsson y Colmsjö, 2000].

Potencia: se selecciona según el número de vasos introducidos en el aparato. Debe ser elegida correctamente para evitar excesivas temperaturas, que provoquen la degradación del soluto o sobrepresión dentro de los vasos.

Tiempo de extracción: un aumento del tiempo puede llevar a recuperaciones mayores, pero si es demasiado largo se pueden degradar los analitos termolábiles.

Naturaleza de la matriz: el contenido en agua de la matriz es de gran importancia porque absorbe fuertemente la radiación de microondas. Como consecuencia obtener resultados reproducibles requiere el control del contenido en agua de la matriz [Camel, 2000].

Los sistemas de microondas constan de dos componentes principales, unidos mediante la guía de ondas: 1) *el generador de microondas o magnetrón*, que es un tubo de vacío que convierte la energía eléctrica continua en energía de microondas. La energía de los electrones se convierte en energía de radiofrecuencia en una serie de cavidades resonantes; y 2) *el aplicador de microondas*, que asegura la transferencia de energía electromagnética desde la línea de transmisión hasta el material a tratar. Las paredes metálicas absorben una pequeña cantidad de energía, pero la mayor parte es reflejada volviendo al magnetrón, disminuyendo su eficacia y su vida. Para evitar esto se usa un circulador que dirige y refleja la potencia lejos del magnetrón [Cela y col, 2002].

Actualmente están comercializados dos tipos de sistemas analíticos de calentamiento por microondas: el sistema de recipiente abierto y el sistema de recipiente cerrado.

Sistema de recipiente abierto: la extracción tiene lugar a presión atmosférica, por tanto la máxima temperatura posible viene determinada por el punto de ebullición del disolvente a esa presión. El sistema utiliza microondas enfocadas, siendo el calentamiento de la muestra muy homogéneo y eficaz.

Sistema de recipiente cerrado: el disolvente puede calentarse a temperaturas superiores a su punto de ebullición a presión atmosférica, proporcionando mayor eficiencia y rapidez de extracción y permitiendo varias extracciones simultáneas. Como el campo eléctrico no es homogéneo en la cavidad, los recipientes se colocan en un soporte giratorio [Camel, 2000]. Un sistema comercial de este tipo es el ETHOS PLUS MPR-300/12S de media presión (Milestone), que permite trabajar con 12 vasos de extracción irradiados simultáneamente hasta alcanzar 1000 W de energía de microondas al 100% de potencia. El sistema está formado por los siguientes componentes:

Vasos de extracción: son vasos de teflón con una capacidad de 100 mL, que resisten temperaturas máximas de trabajo de 260°C (períodos largos) o 300°C (períodos cortos) y una presión máxima de 35 bar (500 psi). Están contenidos en un cuerpo rígido, que evita deformaciones laterales y se utilizan sellados con una tapa también de teflón, transparente a la energía de microondas e inerte a los disolventes empleados. Durante la extracción se encuentran presurizados y por ello incorporan un mecanismo de cierre que es al mismo tiempo un sistema de alivio de presión (“tapa muelle”). Así, se permite que los vasos se abran eliminando el exceso de presión y rápidamente se vuelvan a cerrar para evitar pérdidas de componentes de la muestra. En este sistema se puede trabajar con agitación constante que mejora el rendimiento de la extracción.

Sistemas de control de presión y temperatura: el control de temperatura se lleva a cabo con una sonda colocada en el interior del vaso de referencia. La temperatura máxima de trabajo de la sonda es 300°C. La fibra está conectada a un sistema de control que permite variar la potencia del microondas para mantener la temperatura fijada para la extracción. Un sistema regula la presión permitiendo como máximo 35 bares. El microondas posee además un sensor QP (Quality Pressure) que detecta la presencia de productos de reacción dentro de la cavidad, de forma que envía una respuesta si la concentración de dichos productos sobrepasa un límite definido. El sensor QP también puede actuar como un sistema adicional de seguridad, ya que controla el calentamiento evitando una sobrepresión y como consecuencia la apertura de los vasos. Cuando el sensor QP detecta gases que han difundido a través de los vasos rápidamente regula la potencia del microondas (Figura 24).



Figura 24. Microondas utilizado en este trabajo.

I.5.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA-DETECTOR DE RED DE DIODOS

Actualmente el método estándar para el análisis de drogas es la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) debido a su elevada sensibilidad y especificidad. Sin embargo, los compuestos no volátiles no pueden ser analizados por esta técnica a no ser que sean volatilizadas por derivatización; otro de sus inconvenientes es su elevado coste. Ambos aspectos han ido restringiendo su aplicabilidad. Por otro lado surge la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como una técnica que puede separar un amplio rango de analitos sin necesidad de tratamientos previos. Además la cromatografía líquida presenta otras ventajas respecto a la cromatografía de gases porque separaciones complicadas, frecuentemente son llevadas a cabo de forma más eficaz en cromatografía líquida. Las separaciones cromatográficas son el resultado de la interacción específica entre los analitos y las fases estacionaria y móvil. Estas interacciones no existen en la fase móvil gaseosa de la cromatografía de gases, pero si en la de la líquida, lo que origina otra variable que controlar y optimizar en la separación. Existe una gran variedad de fases estacionarias diferentes útiles en cromatografía líquida, que permiten un amplio rango de interacciones selectivas y aumentan las posibilidades de separación. Por último, las separaciones cromatográficas son mejores cuanto menor es la temperatura, porque las interacciones moleculares son más efectivas, esto favorece a la cromatografía líquida que normalmente tiene lugar a temperatura ambiente [Snyder y Kirkland, 1979].

La cromatografía líquida de alta resolución es importante por 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 aplicabilidad a sustancias como las que nos ocupan.

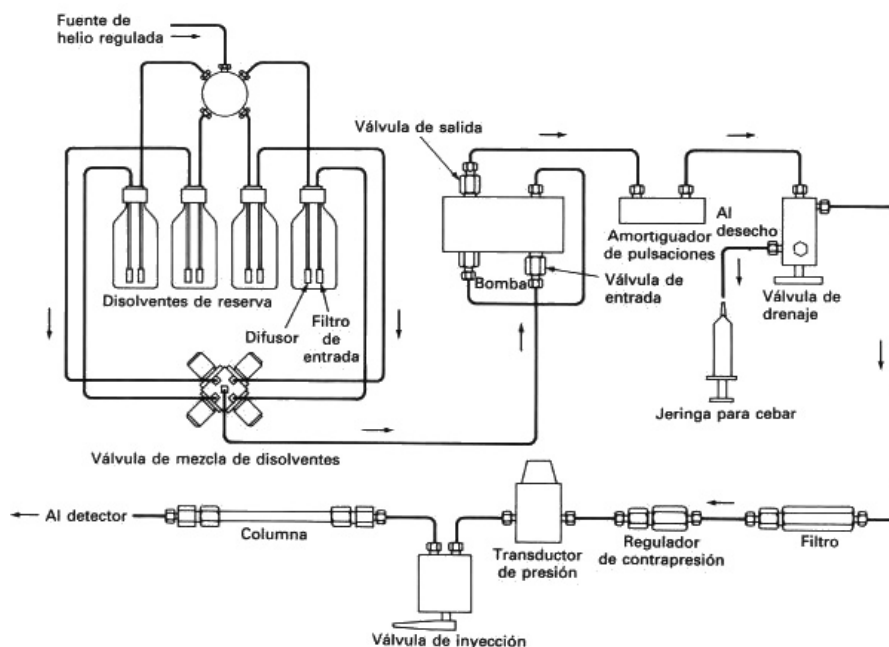


Figura 25. Esquema básico de un equipo de HPLC.

Las partes que componen normalmente un sistema HPLC son: bomba, inyector, columna y detector (Figura 25). La *bomba* facilita una circulación continua e ininterrumpida de fase móvil a través del sistema. El *inyector* hace posible la introducción de la muestra sin despresurizar el sistema y sin sobrecargar la columna. La *columna* es el corazón del HPLC, en donde se produce la separación de los analitos de una mezcla. El *detector* es un dispositivo capaz de detectar una señal relacionada con la concentración de los solutos que separadamente van saliendo de la columna. Esta señal obtenida y el tiempo de retención característico de cada componente darán lugar a un cromatograma. De esta forma se puede realizar el análisis cuantitativo y cualitativo de la muestra.

El detector ultravioleta más reciente es el detector de red de diodos (Figura 26) en el cual la radiación procedente de una lámpara de deuterio pasa a través de un divisor de haz hacia la celda de flujo, de modo que la muestra recibe la radiación lumínica total. El haz de luz pasa a través de otra lente que lo enfoca hacia una red de difracción produciendo la dispersión de la luz. La radiación dispersada se refleja sobre un transductor de red de diodos

situados sobre un chip de silicona. Al existir la misma separación entre las rendijas de la red de difracción que entre los diodos, la señal de cada diodo se corresponde con radiación de diferente longitud de onda. La serie de diodos en conjunto cubre un ancho intervalo del espectro, 190 a 800 nm, midiendo cada uno de ellos una banda estrecha del espectro de 1 ó 2 nm. El escaneado secuencial de todas las señales da lugar a un espectro y permite monitorizar la muestra a más de una longitud de onda. El detector de red de diodos presenta tres grandes ventajas: detección de señal múltiple, identificación de picos y determinación de la pureza de los picos [Huber y George, 1993].

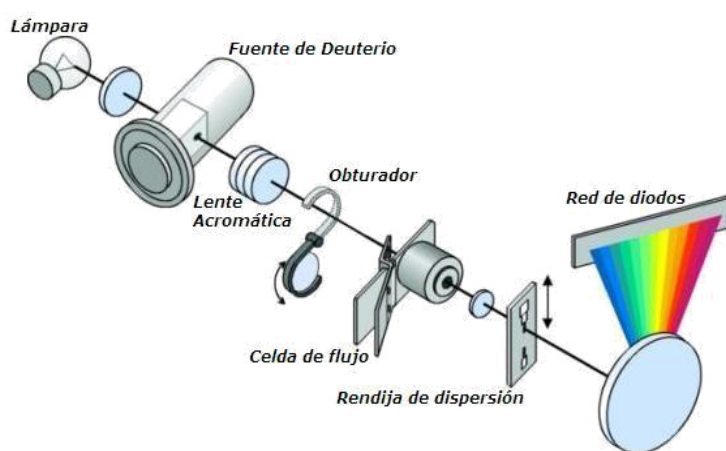


Figura 26. Esquema básico de un detector de red de diodos.

I.5.3. DISEÑOS EXPERIMENTALES

La experimentación forma parte natural de la mayoría de las investigaciones industriales, científicas y en estudios toxicológicos, donde la presencia de distintos factores influye sobre los resultados del proceso de interés [Kobilinsky, 1997; Kuehl, 2000].

Es fundamental conocer los factores que influyen realmente entre un número considerable de posibilidades y estimar esta influencia. Para ello es necesario planificar los experimentos, variar las condiciones experimentales y observar la variable respuesta. Del análisis y estudio de la información recogida se obtienen las conclusiones. La planificación de experiencias consiste en imponer a los factores variaciones particulares, medir las variaciones inducidas y deducir las relaciones entre causas (factores) y consecuencias (respuestas). Se podría definir el concepto de experiencia como la prueba o ensayo efectuado para estudiar un fenómeno; la respuesta experimental sería la manifestación medible que se observa al variar

los factores estudiados, y debe ser pertinente, repetible y tener una precisión aceptable. La forma tradicional que se utilizaba en la experimentación, para el estudio de estos problemas, se basa en estudiar los factores uno a uno, esto es, variar los niveles de un factor permaneciendo fijos los demás. Esta metodología presenta grandes inconvenientes como el gran número de ensayos necesarios, que implica un aumento de tiempo de trabajo y coste, así como la imposibilidad de evaluar las interacciones entre las variables [Miller y Miller, 2002].

Como alternativa, el diseño de experimentos permite estudiar simultáneamente los efectos de todos los factores de interés, son más eficaces y proporcionan mejores resultados en un tiempo razonable de trabajo que implica un menor coste [Ryan, 2007]. Se trata de una herramienta quimiométrica para la planificación y análisis de experimentos, con el objeto de obtener la información requerida, con la mayor precisión y eficacia posible. De esta manera se consigue caracterizar y optimizar un proceso, determinando los parámetros operacionales que influyen sobre las respuestas [Lewis y col, 1999]. Las etapas a seguir en el proceso de utilización de diseño de experimentos en un estudio determinado son las siguientes:

- Definir los objetivos del experimento.
- Identificar las posibles variables influyentes.
- Definir el dominio experimental de trabajo
- Determinar las respuestas susceptibles de variación.
- Plantear una estrategia experimental basada en una matriz de experimentos.
- Llevar a cabo los experimentos y realizar el análisis estadístico de los resultados.

Para alcanzar el objetivo, puede diseñarse una estrategia que permita estimar la magnitud y dirección de los efectos de todas las variables (*diseños de cribado o screening*). Tras descartar los factores no significativos, el número de variables utilizadas para crear un diseño que permita el *estudio de factores* se reduce considerablemente, y por tanto también lo hace el número de experimentos a realizar lo que supone un ahorro de tiempo y dinero. En este segundo tipo de diseños se mide el cambio en la respuesta con los distintos niveles de un factor (efectos principales) y se pueden determinar las interacciones entre factores. Los experimentos realizados en esta fase del estudio pueden servir de base para la optimización del proceso. En estos estudios todos los factores deben tener al menos dos niveles. El número de coeficientes en el modelo matemático postulado y el número de experiencias necesarias para determinar los coeficientes aumentan bruscamente con el número de niveles de los

factores y con el estudio de las interacciones entre variables. Existen varios tipos de diseños de experiencias, entre los que destacan los diseños factoriales simétricos o asimétricos [Lewis y col, 1999], completos o fraccionales [Fernández Ruano y Tomás, 2007]. Una vez definido el diseño de experiencias se transforma en el plan de experimentación, que consiste en la aplicación en el mundo real de la estructura formal definida por el diseño o matriz de experiencias. A continuación, se realizan las experiencias y se obtiene la matriz de respuestas. Un grado más de conocimiento se adquiere en el *estudio de las respuestas*, con el fin de prever en cualquier punto del campo experimental de interés, el valor de la respuesta sin estar obligado a efectuar la experiencia [Mathieu y Phan-Tan-Luu, 1997; Lewis y col, 1999; Myers y col, 2009]. Finalmente, la *optimización* gráfica a través de las superficies de respuesta, o numérica, mediante *funciones de deseabilidad*, permite encontrar las condiciones operacionales que proporcionan las mejores respuestas [Lewis y col, 1999].

En general, se puede establecer una relación de regresión entre la función respuesta y las variables influyentes, a través de un modelo polinómico de primer o segundo grado:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_n x_n + \beta_{11} x_1^2 + \dots + \beta_{nn} x_n^2 + \beta_{1n} x_1 x_n + \dots + \beta_{n1} x_n x_1$$

donde Y es la respuesta, y x_n son los diferentes factores de los que depende la respuesta. Los coeficientes β tienen el siguiente significado:

β_0 es el término constante

β_n es el efecto lineal del factor n

β_{1n} es el efecto de interacción de dos factores

β_{nn} es el efecto cuadrático del factor n -ésimo

Los experimentos realizados permiten la evaluación mediante el análisis de varianza [Otto, 2007] de los coeficientes del modelo, de modo que se determina la importancia de cada factor, así como las posibles interacciones entre factores, mediante la metodología de superficies de respuesta.

Diseños de screening asimétrico

El cribado o screening de factores, consiste en investigar de manera rápida cuáles son los factores influyentes dentro de un conjunto potencial. No siempre es adecuado utilizar diseños que consideran el mismo número de niveles para todas las variables consideradas (diseños simétricos) o, incluso, sólo dos niveles por factor (Plackett-Burman). Para estudiar

variables que no tienen el mismo número de niveles se emplean diseños asimétricos. Para que las estimaciones de los efectos principales de cada nivel sean obtenidas de manera independiente, los niveles de una variable deberán estar combinados con cada uno de los niveles de otra variable siguiendo frecuencias proporcionales. Los software disponen de diversas formas de obtener estas matrices, pero destacan los métodos de correspondencia propuestos por Addelman para la construcción de matrices asimétricas [Lewis y col, 1999].

La influencia de los distintos niveles de cada factor sobre la respuesta (como eficacia de extracción de cada compuesto) y las interacciones entre factores quedan puestas de manifiesto mediante dos tipos de gráficos de diagramas de barras: *Efectos totales* y de *Pesos delta*, que permiten comparar los efectos relativos sobre la respuesta de un cambio de nivel en una variable. El gráfico de los *Pesos delta* representa los efectos relativos cuando se produce un cambio de nivel para cada variable. La longitud de las barras es proporcional a la amplitud del efecto relativo. Las barras se dirigen hacia la derecha cuando el efecto es positivo y hacia la izquierda cuando es negativo. Las líneas discontinuas del gráfico indican los límites de significación estadística. Si las barras de los efectos sobrepasan dichas líneas, el efecto del nivel considerado sobre la respuesta estudiada es estadísticamente significativo. El gráfico de los *Efectos totales* es también un diagrama de barras en el que la longitud de cada barra es proporcional al valor del efecto de cada nivel de un factor sobre la respuesta [Mathieu y col, 2000].

Diseños de superficie de respuesta

Entre los diseños de superficie de respuesta más utilizados cabe destacar el diseño central compuesto (CCD) de dominio esférico ($\alpha=1.682$). Son diseños construidos a partir de diseños factoriales 2^k con $2k$ combinaciones adicionales llamadas puntos axiales o en estrella y n_0 puntos centrales [Myers y col, 2009; Lewis y col, 1999]. Las coordenadas de los puntos axiales de los ejes del factor codificado son $(\pm \alpha, 0, 0, \dots, 0)$, $(0, \pm \alpha, 0, \dots, 0)$, ..., $(0, 0, 0, \dots, \pm \alpha)$ y los puntos centrales son de la forma $(0, 0, 0, \dots, 0)$. De este modo, el número de niveles considerado para cada factor es cinco. El número de experimentos en un diseño central compuesto, se determina por la expresión siguiente: $N = 2^k + 2k + n_0$; donde k es el número de factores y n_0 el número de repeticiones en el centro del dominio experimental. El punto central se repite para lograr la estimación del error experimental, y reducir la varianza de las estimaciones, $v(y)$ en el centro del dominio experimental. La rotabilidad es una propiedad

deseable de estos diseños, según la cual la varianza de los valores estimados es constante en puntos equidistantes del centro del diseño. Se logra estableciendo $\alpha = (2^k)^{1/4}$. Así, el valor de α para un diseño de tres factores es $\alpha = 1.682$. Los valores de respuesta obtenidos tras la experimentación, se utilizan para estimar los valores de los coeficientes del modelo, a través de la regresión lineal múltiple mediante el método de mínimos cuadrados. La validación del modelo se lleva a cabo mediante ANOVA. Las representaciones gráficas en 2D y 3D de las superficies de respuesta, que enfrenta dos factores, se utilizan para estudiar la influencia sobre la respuesta. La optimización multirespuesta presenta la dificultad de encontrar unas condiciones de compromiso comunes a todos los analitos, donde todas las respuestas presenten un valor óptimo. Por ello se recurre a la optimización numérica basada en la aplicación de funciones de deseabilidad [Lewis y col, 1999]. Estas funciones permiten la obtención inequívoca de unas condiciones óptimas de extracción simultánea para las respuestas estudiadas sin experimentación adicional. Para ello, se propone una función de transformación de las respuestas que tenga un grado de conformidad adecuado para cada respuesta. Se define la función de deseabilidad individual $d_j = d(Y_j)$ ($j = 1, \dots, r$) para cada respuesta en función de la combinación de todas las respuestas de modo que cuando d_j se aproxima a 0 indica la ausencia de conformidad con la respuesta deseada y cuando d_j se aproxima a 1 indica total conformidad. Finalmente, se define una deseabilidad global, D , calculada como la media geométrica de las d_j individuales.

Existen otros diseños de superficie de respuesta recomendables para problemas de optimización por sus propiedades y por ser económicos, en términos del número experimentos que debe ser realizado. Así, el diseño Híbrido permite estudiar diferentes niveles para los factores considerados con un mínimo de experimentos inferior al CCD. Consiste en un diseño factorial para todas las variables excepto una, y las variables restantes mantenidas en un nivel constante; un diseño de estrella para las mismas variables, la variable restante es mantenida a un nivel constante diferente; 2 o más puntos axiales; se puede añadir uno o más puntos centrales [Lewis y col, 1999]. Tiene mucha similitud con el CCD. Los diseños Híbridos existen para 3, 4 y 6 factores en un dominio esférico, donde la mayoría de los experimentos se llevan a cabo en la superficie de la zona de interés. No son adecuados para un enfoque secuencial y los experimentos deben realizarse en un solo bloque y en orden aleatorio.

I.5.4. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico requiere demostrar que el procedimiento de análisis cuantitativo de los analitos en una matriz biológica es fiable dentro de un margen de error determinado para comprobar si es o no adecuado para la resolución de problemas analíticos. Solamente los métodos analíticos validados permiten asegurar como ciertos los resultados obtenidos. Los criterios seguidos en este trabajo son los recomendados por organizaciones como la FDA [Food and Drug Administration] y la ICH [International Conference of Harmonization]. Para realizar la validación es necesaria la determinación de los siguientes parámetros: linealidad y análisis de regresión, sensibilidad, límites de detección y cuantificación, selectividad, precisión, exactitud, recuperación y robustez.

Linealidad y análisis de regresión: La linealidad de un método analítico se define como la capacidad de obtener respuestas linealmente proporcionales a la concentración de un analito en un intervalo determinado. El estudio de la linealidad requiere la realización de curvas de calibrado, que han de ser realizadas para cada uno de los analitos en estudio, utilizando una muestra cero (matriz sin droga) y seis a ocho niveles para definir de forma adecuada la relación entre la concentración y la respuesta. Las concentraciones de los puntos estándar son elegidas en base al rango esperado en cada situación particular. Las curvas de calibrado se obtienen mediante la representación gráfica de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos frente a la concentración conocida del analito. Los datos obtenidos permitirán realizar un análisis de regresión mediante el cual se ajustan a un modelo lineal del tipo $y = ax + b$ donde a es la pendiente de la recta de regresión y b es la ordenada en el origen. También es común calcular el coeficiente de correlación, r , que muestra el grado de relación entre las variables x e y , al igual que el coeficiente de determinación, r^2 .

Sensibilidad: La sensibilidad de los métodos analíticos es la capacidad para discernir pequeñas variaciones en la concentración del analito.

Límites de detección y cuantificación: El límite de detección (LOD) se define como la menor cantidad de analito que puede detectarse con seguridad diferenciándose estadísticamente de un blanco y que no tiene que ser cuantificada como un valor exacto. El límite de detección se calcula realizando replicados de muestras blanco, empleando un mínimo de cinco determinaciones y utilizando las ecuaciones siguientes:

$$\text{LOD: } S/R = 3; \quad Y_{\text{LOD}} = 3Y_b$$

donde S/R es la relación señal-ruido e Y_b representa la señal de un blanco cuyos picos definen el ruido medio estimado para cada compuesto. A continuación, sustituyendo la señal en la ecuación de la recta de calibrado:

$$Y_{LOD} = aX_{LOD} + b$$

El límite de cuantificación (LOQ) se define como la menor cantidad de analito que puede ser determinada cuantitativamente con unos niveles aceptables de exactitud y precisión. Se expresa como aquella concentración cuya señal instrumental es igual a la media de las señales del blanco más diez veces la desviación estándar de éstas

$$LOQ: S/R = 10; \quad Y_{LOQ} = 10Y_b$$

donde S/R es la relación señal-ruido e Y_b representa la señal de un blanco cuyos picos definen el ruido medio estimado para cada compuesto. A continuación, sustituyendo la señal en la ecuación de la recta de calibrado:

$$Y_{LOQ} = aX_{LOQ} + b$$

Se acepta como límite inferior de cuantificación (LLOQ) el estándar más bajo de la curva de calibración si cumple las siguientes condiciones: la respuesta del analito en el LLOQ es por lo menos cinco veces superior a la respuesta del blanco, y el pico del analito es identificable y reproducible con una precisión de 20% y una exactitud de 80-120%.

Selectividad: La selectividad es la capacidad de un método analítico de distinguir y cuantificar el analito en presencia de otros componentes de la muestra. Existen diferentes métodos para validar la selectividad. El método más sencillo cuando se habla de análisis cromatográficos es demostrar la ausencia de respuesta en una muestra blanco de la matriz biológica que tratemos. Para confirmar que el método analítico es selectivo se debe realizar el análisis de al menos cinco muestras blanco de diferente procedencia. Una vez hecho esto se examinarán con cuidado los cromatogramas en los tiempos de retención de los analitos de interés.

Precisión y Exactitud: La precisión es una medida de la variabilidad de los resultados obtenidos cuando una muestra se analiza repetidas veces con un mismo método analítico, es decir, es una indicación de la reproducibilidad de una medida. Se recomienda realizar un mínimo de cinco determinaciones por cada concentración y un mínimo de dos niveles (alto y bajo) dentro del rango seleccionado. Se expresa normalmente como coeficiente de variación (CV) ó desviación estándar relativa (RSD) y viene determinado por la fórmula:

$$CV = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100$$

siendo s la desviación estándar y \bar{x} el valor medio. El coeficiente de variación calculado para cada nivel de concentración no debe exceder del 15%, a excepción del LLOQ donde no debe exceder del 20%, como criterio de validación. Existen dos tipos de precisión, intra-serie o repetibilidad, que determina la precisión durante el procesado de una sola secuencia de datos; e inter-serie o reproducibilidad que refleja la precisión en el tiempo.

La exactitud analítica de un método es la medida de la concordancia entre el valor obtenido en una medida y su valor real o asignado. La determinación de este parámetro permite estimar el grado en el que los errores sistemáticos afectan a un método en particular [Araujo, 2009]. Existen varios procedimientos para su evaluación: medida del analito en un material de referencia certificado y comparación del resultado con el valor certificado; comparación de los resultados del método propuesto con los resultados de un método de referencia y el análisis de muestras adicionales [Campañó y Rios, 2002]. La exactitud debe ser calculada para un mínimo de cinco replicados por cada concentración, aplicadas por lo menos a dos niveles de concentración distintos dentro del rango de la curva de calibrado. Para ello se ha empleado la siguiente ecuación:

$$E_r = \left| \frac{\bar{x} - x_t}{x_t} \right| \times 100$$

siendo E_r el error relativo; \bar{x} el valor de la media y x_t el valor teórico. El error relativo medio debe ser inferior o igual al 15% respecto al valor real, excepto en el límite inferior de cuantificación (LLOQ), donde la desviación no debe superar el 20%, para su uso como criterio de validación [Shah y col, 2000; Peters y Maurer, 2002].

Recuperación: La recuperación es la relación porcentual entre la respuesta del detector obtenida a partir de una cantidad de analito añadido y posteriormente extraído de la matriz biológica, en comparación con la respuesta de ese mismo detector obtenida para la concentración verdadera de la sustancia estándar pura. La recuperación nos proporciona la idea de la eficacia de la extracción de un método analítico dentro de unos límites de variabilidad. La recuperación del analito no tiene porqué ser del 100%, pero sí debe ser constante, exacta y reproducible [Bressolle y col, 1996]. Después del proceso de extracción,

cinco muestras conteniendo las drogas fueron analizadas en el cromatógrafo y a otras cinco muestras blanco se les añadió la cantidad exacta del analito para conseguir la concentración teórica máxima antes de ser medidas en el cromatógrafo. La recuperación se calcula comparando las áreas de cada analito en las primeras cinco muestras (drogas extraídas), con las áreas de cada analito en las otras cinco muestras (que representaban el 100% del analito).

Robustez. Mide la capacidad de un procedimiento analítico para no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método, y proporciona una indicación de su fiabilidad durante su uso habitual [ICH Q2B].

I.5.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araujo A. *Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation*. J Chromatogr B, 877 (2009) 2224-2234.

Bressolle F, Bromet-Petit M, Audran M. *Validation of liquid chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics*. J Chromatogr, 686 (1996) 3-10.

Caddick S. *Microwave-assisted organic reactions*. Tetrahedron, 51 (1995) 10403-10432.

Camel V. *Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples*. Trends Anal Chem, 19 (2000) 229-248.

Campañó R, Rios A. *Garantía de calidad en los laboratorios analíticos*. Ed. Síntesis, Madrid, 2002.

Cela R, Lorenzo RA, Casais MC. *Técnicas de separación en Química Analítica*. Ed. Síntesis, Madrid, 2002.

Dean JR, Fitzpatrick L, Heslop C. *Microwave-assisted solvent extraction in organic analysis*. In: Handley AJ (Ed). *Extraction methods in organic analysis*. Ed. CRC Press, Sheffield, 1999.

Ericsson M, Colmsjö A. *Dynamic microwave-assisted extraction*. J Chromatogr A, 877 (2000) 141-151.

Eskilsson CS, Björklund E. *Analytical-scale microwave-assisted extraction*. J Chromatogr A, 902 (2000) 227-250.

Fernández Ruano L y Tomás X. *Cap 4: Diseño de experimentos*. En: Blanco M, Cerdá V (Eds). *Temas Avanzados de Quimiometría*. Universitat de les Illes Balears. Servei de Publicacions i Intercanvi Científic, Palma, 2007, pp 95-186.

Food and Drug Administration (FDA), U.S. Department of Health and Human Services, *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation* (2001). <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>.

Huber L, George SA. *Diode array detection in HPLC*. Chromatographic Science Series, vol.62. Ed. Marcel Dekker, New York, 1993.

International Conference on Harmonization (2005). *Validation of analytical procedures: Methodology ICH Q2B*. <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>

Jacob J, Boey F. *Thermal and non-thermal interaction of microwave radiation with materials*. J Materials Sci, 30 (1995) 5321-5327.

Kingston HM, Haswell SJ. *Microwave enhanced chemistry fundamentals, sample preparation and applications*. Ed. American Chemical Society, Washington DC, 1997, Cap. 12.

Kobilinsky A. *Les plans factoriels*. En: Drosbeke J, Fine J, Saporta G. Plans d'expériences. Applications à l'entreprise. Editions Technip, 1997, pp 879-883.

Kuehl RO. *Design of experiments: statistical principles of research design and analysis*. 2^a Ed, Ed. Duxbury/Thomson, California, 2000.

Letellier M, Budzinski H. *Microwave assisted extraction of organic compounds*. Analisis, 27 (1999) 259-271.

Lewis GA, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. *Pharmaceutical experimental design*. 2nd Ed, Marcel Dekker, Basel, 1999.

Mathieu D, Nony J, Phan-Tan-Luu R. *NEMROD-W2000*, LPRAI, Marseille, 2000.

Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. *Ch. 4: Approche Méthodologique des Surfaces de Réponse*, En: Drosbeke JJ, Fine J, Saporta G (Eds). Plans d'expériences Applications à l'entreprise. Éditions Technip, Paris, 1997.

Miller JM, Miller JC. *Estadística y quimiometría para química analítica*. 4^a Edición, Ed. Prentice Hall, Madrid, 2002.

Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM. *Response surface methodology*. 3rd Ed, Wiley, New Jersey, 2009.

Otto M. *Chemometrics: statistics and computer. Application in analytical chemistry*. 2nd Ed, Wiley-VCH, New York, 2007.

Peters FT, Maurer HH. *Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review*. Accred Qual Assur, 7 (2002) 441-449.

Ryan TP. *Modern experimental design*. 1st Ed, Wiley-Interscience, New Jersey, 2007.

Shah VP, Midha KK, Findlay JWA, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Liller KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A. *Bioanalytical Method Validation - A Revisit with a Decade of Progress*. Pharm Research, 17 (2000) 1551-1557.

Snyder, LR, Kirkland JJ. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Ed. John Wiley and Sons, New York, 1979.

I.6. DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y BENZODIACEPINAS EN MATRICES BIOLÓGICAS. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La preparación de la muestra para el análisis es un paso muy importante, siendo normalmente el paso más lento. La finalidad de este proceso es la extracción de los analitos de matrices complejas en el menor tiempo y con el menor consumo de energía posible y con la mayor eficiencia y reproducibilidad posible. Los sistemas más comunes de extracción de drogas de abuso actualmente son: extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida. El elevado consumo de drogas de abuso hace necesaria una investigación continuada en este campo, tanto desde el punto de vista analítico como toxicológico, lo que lleva a la búsqueda de métodos más eficaces de extracción, tales como la extracción asistida por microondas. La radiación de microondas ha sido muy utilizada para la extracción de contaminantes orgánicos, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos, policlorobifenilos, pesticidas, herbicidas, fenoles, en varias matrices como sedimentos, suelos, aguas, etc. Pero en escasas ocasiones para la extracción de drogas de abuso y aún en menor medida a partir de matrices biológicas.

La extracción de compuestos orgánicos por radiación microondas fue realizada por primera vez por Ganzler y col [1986], que desarrollaron procedimientos para la extracción de lípidos, no-nutrientes y pesticidas de suelos, sedimentos y alimentos utilizando un pequeño volumen de disolvente, irradiando durante treinta segundos hasta siete veces en microondas domésticos (1140 W). Unos años después el mismo investigador y sus colaboradores [Ganzler y col, 1990] llevaron a cabo la extracción de esparteína y sus metabolitos en diferentes matrices (sedimentos y heces de rata), demostrando que la reproducibilidad de cualquier técnica de microondas depende de la homogeneidad de la radiación, y que ésta viene determinada por las características del magnetron y por el modo de propagación de la onda en la cavidad del microondas.

Paré y Belanger [1994] desarrollaron procesos de extracción de productos naturales en agua, suelos, plantas y animales. Este método muestra capacidades analíticas tales como selectividad, sensibilidad, linealidad y reproducibilidad similares o mejores que las de métodos tradicionales. Es en este mismo año cuando surge una de las primeras aplicaciones de la radiación microondas a tejidos biológicos realizada por Croteau y col [1994] que extrajeron el ácido 3-nitro-4-hidroxifenilarsónico de hígado, riñón y músculo de cerdo. Este ácido es un suplemento dietético para cerdos que aumenta enormemente su crecimiento.

Franke y col [1996] utilizaron la radiación de microondas para la extracción de drogas de suero humano entre ellas metadona, lidocaína y diacepam. El sistema fue comparado con la extracción líquido-líquido concluyendo que no existe degradación de las drogas por la exposición a elevadas temperaturas y que las recuperaciones obtenidas para las muestras son similares por ambos métodos. Sin embargo, el uso de microondas disminuye el tiempo de extracción y el consumo de disolvente.

Eskilsson y Björklund [1999] aplicaron la extracción asistida por microondas (MAE) para la obtención de felodipina a partir de comprimidos. Trataron de optimizar el disolvente de extracción y el tiempo de extracción. En su trabajo concluyen que una de las mayores ventajas de este sistema es el mínimo tratamiento de muestra ya que se trata de una extracción directa sin ningún tratamiento previo.

Brachet y col [2002] y Bieri y col [2006] llevaron a cabo la extracción de cocaína y benzoilecgonina a partir de las hojas de coca, utilizando para ello la extracción asistida por microondas de enfoque (focused microwave assisted extraction) a presión atmosférica. Los resultados que obtuvieron muestran que la absorción de la radiación microondas por los disolventes juega un papel importante en la eficiencia de la extracción, seleccionando metanol debido a que su capacidad de calentamiento es buena al igual que su habilidad para solubilizar cocaína.

Deng y col [2006] aplicaron la extracción asistida por microondas combinada con la microextracción por espacio de cabeza a muestras de paeonol en comprimidos. En la optimización del proceso concluyeron que una elevada potencia de la energía de microondas y tiempos largos de irradiación pueden llevar a la descomposición del analito.

La extracción asistida por microondas (MAE) ha sido aplicada para drogas de abuso en orina, saliva, pelo y humor vítreo [Fernandez y col, 2007; 2008; 2009; 2011]. Los parámetros optimizados mediante diseño experimental fueron: temperatura, tiempo de extracción, y tipo y volumen de disolvente, obteniendo buenos resultados con un tiempo de 10 minutos, a 60/100°C y usando pequeños volúmenes de extractante (cloroformo o diclorometano).

Álvarez y col. [2008, 2009] han propuesto dos métodos basados en MAE para la extracción de etil glucurónido (ETG), marcador del consumo de alcohol, en orina y pelo. Las condiciones de trabajo se fijaron en 110°C, 11 minutos y 8 mL de n-hexano/agua (1:1 v/v).

Desrosiers y col. [2009] llevaron a cabo un estudio sobre la aplicación de la MAE a la extracción de diferentes fármacos (ketamina, diacepam y pentobarbital) a partir de hueso molido de animales que fueron expuestos previamente a dosis elevadas de los mismos. Estudiaron el efecto del disolvente de extracción, la masa ósea y el tiempo de irradiación, obteniendo buenos resultados con un tiempo de 5 minutos, adición de tampón fosfato y extracción con metanol o agua-metanol, a presión atmosférica.

Mazzarino y col. [2010] demostraron que la radiación de microondas acelera la etapa de extracción líquido-líquido de diuréticos, narcóticos, glucocorticoides, beta-bloqueantes y beta2-agonistas, compuestos incluidos en la lista de sustancias prohibidas publicada cada año por la Agencia Mundial Antidopaje. La potencia óptima se fijó en 600 W (generando una temperatura de 70°C) para los componentes más termolábiles y 1020W (generando una temperatura de 150°C) para los otros compuestos estudiados. Los experimentos realizados con mayor potencia y tiempo mostraron peores resultados debido a la degradación de las sustancias. Las mejores recuperaciones se obtuvieron utilizando acetato de etilo como disolvente.

Wietecha-Posłuszny y col [2011] desarrollaron, optimizaron y validaron un método para la determinación de ocho antidepresivos tricíclicos en pelo, basado en la irradiación con microondas. Simultáneamente realizaron la hidrólisis alcalina y la extracción asistida por microondas a 60°C con hexano-alcohol isoamílico (99:1 v/v) como disolvente de extracción. Los extractos fueron analizados por HPLC-DAD, con LOQ entre 0.9 y 4.0 µg/g (rango terapéutico).

De Brabanter y col [2013] desarrollaron un procedimiento rápido para la determinación de 11-nor-D9-tetrahidrocannabinol-9-ácido carboxílico (THCA), principal metabolito de los cannabinoides, en orina. El método descrito se basa en la completa derivatización de THCA con 20 µL de acetonitrilo, 50 µL de MSTFA y 50 µL de MSTFA/etanotiol/ioduro amónico (500:4:2) y extracción asistida por microondas a 750 W durante 1.5 min. La GC-MS permite su separación de los componentes interferentes de la matriz en menos de 4 minutos.

En relación con las técnicas de determinación, una de las primeras utilizadas para investigar drogas de abuso fue el radioinmunoensayo (RIA) [Valente y col, 1981; Baumgartner y col, 1982; Balabanova y col, 1987], que permitió la detección de metabolitos de cocaína en el pelo del 100% de los sujetos cocainómanos estudiados. Smith y Liu [1986] aplicaron esta técnica para analizar el pelo de una persona que había alegado ser víctima de una agresión sexual, siendo positivo el resultado del test. Esta fue la primera vez que los resultados de un análisis de drogas en pelo fueron utilizados en un tribunal de justicia de Estados Unidos. Reuschel y Smith [1991] emplearon el RIA para analizar muestras de pelo recogidas anónimamente de 48 presos, confirmando los resultados positivos de 22 muestras mediante GC-MS con impacto electrónico.

Otros autores [Harkey y col, 1991; Cone y col, 1991; Henderson y col, 1992; Cone y col, 1993; Hold y col, 1998] describieron métodos más sensibles para la determinación simultánea de cocaína y metabolitos en pelo humano usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). A partir del año 2000 son más frecuentes las aplicaciones de GC-MS para la determinación conjunta de opiáceos, cocaína y otras drogas en pelo [Uhl, 2000; Skender y col, 2002; Romolo y col, 2003; Gambelunghe y col, 2005; Cordero y Paterson, 2007; Aleksa y col, 2012]. También se estudiaron drogas de abuso en otras matrices biológicas (orina, sangre, plasma y/o saliva), usando GC-MS. Los trabajos publicados en los últimos años demuestran la bondad de este sistema de detección que permite llegar a un rango de nanogramos y diferenciar inequívocamente cada droga, así como sus respectivos metabolitos [Kacinko y col, 2004; Gunnar y col, 2005; Cognard y col, 2006; Nikolaou y col, 2008; Bravo y col, 2011; Rees y col, 2012].

Sin embargo, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica más utilizada en el campo de la toxicología para la determinación de drogas de abuso en diversas matrices como orina, plasma, humor vítreo, pelo, sudor, saliva, hígado, músculo o riñón. Esta técnica acelera el proceso de separación de compuestos y mejora la resolución, usando en columnas rellenas de pequeñas partículas (3-10 μm) y elución con un líquido o fase móvil bajo condiciones de alta presión. La elección de la fase móvil es fundamental: mientras que en la cromatografía de gases se habla de la temperatura de la columna, en la cromatografía líquida importa la polaridad de la fase móvil, empleando generalmente mezclas binarias o ternarias de disolventes, libres de partículas y de gases disueltos que pudiesen introducir burbujas en el sistema. El equipo con el que trabajamos resuelve todos estos problemas con

facilidad ya que cuenta con un desgasificador de membrana. Para la investigación de alcaloides se pueden usar diversos sistemas de detección que consiguen límites de sensibilidad del orden de nanogramos. La introducción de la cromatografía líquida en la década de los sesenta revela ciertas ventajas sobre la cromatografía de gases, pues facilita la separación y detección de compuestos termolábiles no volátiles que pueden ser cuantificados sin recurrir a su derivatización.

Esto explica la existencia de numerosos trabajos llevados a cabo con esta técnica para la determinación de opiáceos, cocaína y sus metabolitos en plasma, en los que ha ido variando el método de detección debido a la aparición de nuevos sistemas con mayores ventajas. Se ha estudiado la separación con distintas columnas y fases móviles, y se han utilizado diferentes procedimientos de preparación de la muestra. La tabla 7 muestra una revisión bibliográfica por orden cronológico, relacionada con drogas de abuso, cromatografía líquida, diferentes procedimientos de extracción (SPE, LLE, MAE) y diversas muestras biológicas (sangre, plasma, orina, saliva, pelo).

Tabla 7. Revisión bibliográfica sobre la determinación de las drogas de abuso por HPLC.

Droga Matriz	Detector	Fase móvil	Columna	Referencia
Cocaína, BEG Sangre	UV	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 2.1 (6:94)	Velosep ODS (100 x 3.2 mm, 3µm)	Sandberg, 1990
Cocaína, BEG Suero	UV	Metanol – Acetonitrilo - Tampón acetato pH 5.1	µBondapack C18 (300 x 2 mm, 10µm)	Lau, 1990
100 drogas básicas Orina	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 3.2	Lichrospher 100 C8/II (250 x 4.6 mm, 5µm)	Logan, 1990
Morfina, BEG Orina	UV	N-hexano - Cloruro metileno – Metanol - Dietilamina	Lichrospher 100 RP8 (250 x 4 mm, 5µm)	Ferrara, 1992
Cocaína, BEG Orina	UV	Fosfato monopotásico pH 3 – Acetonitrilo - Dietilamina	IBM C8 (150 x 4.6 mm, 5µm)	Larsen, 1992
Cocaína, BEG Muestras biológicas	DAD	Metanol - Tampón fosfato (15:85)	Separon SGX CN (150 x 3 mm, 7µm)	Balíková, 1994
Opiáceos, cocaína	DAD	Acetonitrilo – Metanol - Ácido fosfórico	Zorbax RX (250 x 4.6 mm, 5µm)	Hill, 1994
Drogas de abuso Orina	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 3.2	Lichrospher 60 RP8 (250 x 4 mm, 5µm)	Li, 1994

Droga Matriz	Detector	Fase móvil	Columna	Referencia
Cocaína, BEG Humor vítreo	UV	Metanol - Tampón fosfato (25:75)	Lichrospher RP18 (125 x 4 mm, 5µm)	Fernández, 1994
Cocaína, BEG, CET Plasma, orina	UV	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 6 (76:24)	Nova Pack C8 (150 x 3.9 mm, 4µm)	Sukbuntherng, 1995
Cocaína, opiáceos Muestras biológicas	DAD	Metanol - NaOH 12.5mM	Aluspher RP (125 x 4 mm, 5µm)	Lambert, 1995
Opiáceos Orina	UV	Pentano – Diclorometano - Metanol con 0.5% dietilamina	Hypersil (200 x 4.6 mm, 5µm)	Low, 1995
Opiáceos, cocaína Muestras biológicas	DAD	Metanol – Acetonitrilo - Acetato amónico (40:15:45)	Adsorbospher C18 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Theodoridis, 1995
Cocaína, opiáceos Muestras biológicas	DAD	Metanol – THF - Tampón fosfato	Nova Pack C18 (300 x 3.9 mm, 4µm)	Tracqui, 1995
Cocaína, opiáceos Muestras biológicas	DAD	Acetonitrilo - Ácido fosfórico con trietilamina pH 3.4	Lichrospher 100 RP8 (250 x 4 mm, 5µm)	Koves, 1995
Opiáceos, cocaína Muestras ilícitas	UV	Agua - Ácido fosfórico – Hexilamina - Acetonitrilo	Spherisorb ODS-1 (125 x 4.6 mm, 3µm)	Grogg-Sulser, 1995
Opiáceos Suero	Fluoresc.	Acetonitrilo - Tampón fosfato trietilamónico pH 3	Superspher RP18 (125 x 4 mm, 4µm)	Aderjan, 1995
Cocaína, BEG, CET Orina	DAD	Acetonitrilo – Metanol - Agua (10:10:80)	Hypersil BDS C18 (150 x 4.6 mm, 5µm)	Clauwaert, 1996
Cocaína, BEG Plasma, orina	UV	Metanol - Tampón fosfato pH 7 (70:30)	Lichrospher RP18 (125 x 4 mm, 5µm)	Fernández, 1996
Morfina, cocaína Orina	MS	Acetato amónico 100mM	ODS RP18 (150 x 4.6 mm, 5µm)	Tatsuno, 1996
Cocaína, BEG, CET Orina	UV	Tampón fosfato pH 3 - Acetonitrilo - Butilamina (81:18:1)	Lichrosorb RP18 (250 x 4.6 mm, 10µm)	Phillips, 1996
Cocaína, BEG Plasma	UV	Ácetonitrilo con 0.3% trietilamina - Tampón fosfato pH 3	Nucleosil C18 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Virag, 1996
Cocaína, CET Suero	UV	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 7.4 (38:62)	Supelcosil LC-CN (250 x 4.6 mm, 5µm)	Williams, 1996
Cocaína, opiáceos Plasma	UV	Metanol – Acetonitrilo - Fosfato amónico (5:7:63)	Supelcosil ABZ (250 x 2.1 mm, 5µm)	Pan, 1997
Drogas de abuso Suero, orina	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 3 - Octilsulfato sódico - Trietilamina	Hypersil C18 (150 x 4.6 mm, 5µm)	Lai, 1997
Cocaína, BEG Suero	UV	Metanol – Acetonitrilo - Tampón acetato pH 2.2	Brownlee C18 (100 x 2.1 mm, 5µm)	Ma, 1997

Droga Matriz	Detector	Fase móvil	Columna	Referencia
Cocaína, BEG, CET Muestras biológ.	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 2.7	µBondapack C18 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Logan, 1997
Morfina Pelo	DAD	Tampón fosfato - Acetonitrilo	Symmetry C8 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Gaillard, 1997
Codeína	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato trietilamónico pH 3	Spherisorb S5 OD/CN (150 x 4.6 mm, 5µm)	Elliot, 1998
Cocaína y metabolitos Suero, orina, saliva	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 2.3	Supelcosil ABZ C18 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Foulon, 1999
Cocaína, opiáceos Muestras biológ.	MS	Acetonitrilo - Agua (80:20)	Spherisorb RP8 (100 x 2.1 mm, 5µm)	Cailleux, 1999
Opiáceos Muestras biológ.	MS	Agua - Acetonitrilo - THF - Ácido fórmico (100:1:1:0.1)	LiChrospher 100 RP8 (125 x 3 mm, 5µm)	Schänzle, 1999
Metadona, EDDP Orina	UV	Acetonitrilo - Dimetiloctilamina - Fosfato sódico pH 5	Chiral-AGP (100 x 4 mm, 5µm)	Angelo, 1999
Metadona, EDDP Orina	DAD	0.1% Ácido trifluoroacético - Metanol (60:40)	Symmetry Shield RP18 (150 x 3.9 mm, 5µm)	Cheng, 1999
Opiáceos Pelo	UV	Acetonitrilo - Agua (30:70)	RP18-DB (250 x 4.6 mm, 5µm)	Pichini, 1999
Cocaína, BEG Orina	MS	Agua pH 4 - Acetonitrilo	Advantage Basic (50 x 2 mm, 5µm)	Jeanville, 2000
Cocaína Orina	MS-MS	Acetonitrilo - Formiato amónico pH 3	Columna C18 (30 x 2.1 mm, 5µm)	Needham, 2000
Morfina, cocaína Pelo	Fluoresc	Fosfato potásico pH 9.5 - Acetonitrilo (80:20)	PLRP-S (150 x 4.6 mm, 5µm)	Tagliaro, 2000
Cocaína, BEG Muestras biológicas	UV	Acetonitrilo - Agua - Ácido trifluoroacético (28:72:0.1)	Baker Cyano (250 x 4.6 mm, 5µm)	Jamdar, 2000
Cocaína, BEG, CET Plasma	MS	Metanol - Acetonitrilo - Tampón acetato pH 3.6	Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 2.1 mm, 5µm)	Klingmann, 2001
Cocaína, BEG Orina	MS	Ácido fórmico 50 mM + Formiato amónico 100mM + Acetonitrilo - Acetona	Allure basix (30 x 2.1 mm, 5µm)	Jeanville, 2001
Opiáceos Orina	MS	Acetato amónico pH 6 - Acetonitrilo (30:70)	Capcell Pak SCX (150 x 1.5 mm, 5µm)	Katagi, 2001
Cocaína, BEG, CET Orina	DAD	Acetato amónico - Metanol - Acetonitrilo (80:10:10)	LiChrospher 100 RP18 (250 x 4 mm, 5µm)	Antollini, 2001
Cocaína, BEG Sangre, orina	UV	Metanol - Tampón fosfato pH 7	LiChrospher RP18 (125 x 4 mm, 5µm)	Buján, 2001

Droga Matriz	Detector	Fase móvil	Columna	Referencia
Opiáceos Sangre, orina	DAD	Agua - Metanol con Trietilamina pH 4.5	Hypersil BDS Phenyl (53 x 7 mm, 3µm)	Dams, 2002
Morfina	UV	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 2.5	XTerra RP18 (100 x 4.6 mm, 3.5µm)	Blahová, 2002
Morfina Suero	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 2.5	Symmetry Shield RP8 (150 x 4.6 mm, 5µm)	Brandsteterová, 2002
Drogas de abuso Plasma	UV	Acetonitrilo - Tampón fosfato + Ácido pentano sulfónico 25mM (95:5)	Chromolith Perform RP18 (100 x 4.6 mm, 5µm)	Caufield, 2002
Cocaína, BEG	UV	Acetonitrilo - Metanol - Tampón fosfato pH 6.9	NovaPak (150 x 3.9 mm, 4µm)	Rofael, 2002
Opiáceos, cocaína Saliva	MS	Metanol - Formiato amónico pH 5 (6:94)	Hypersil BDS fenil (100 x 2.2 mm, 3µm)	Mortier, 2002
Cocaína, opiáceos Sangre	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 2.3	LiChrosorb RP8	Kroener, 2003
Cocaína, BEG Sangre	UV	Metanol - Tampón fosfato pH 6	Alltech C18 (250 x 4 mm, 5µm)	Brunetto, 2003
Opiáceos, cocaína Orina	MS-MS	Formiato amónico - Ácido fórmico - Acetonitrilo	Synergi Polar RP (150 x 2 mm, 4µm)	Dams, 2003
Drogas de abuso Orina	DAD	Etil acetato - Metanol - Hidróxido amónico (85:10:5) Ciclohexano - Tolueno - Dietilamina (75:15:10) Etil acetato - Diclorometano - Metanol - Hidróxido amónico (80:90:15:5)	Lichrospher 100 RP-8 (125 x 4 mm, 5µm)	Gioino, 2003
Morfina Plasma	MS	Metanol - Acetonitrilo - Ácido fórmico pH 3	Atlantis C18 (150 x 2.1 mm, 5µm)	Whittington, 2003
Cocaína Muestras biológ.	MS	Acetonitrilo - Acetato amónico	Atlantis Hilic Sílica (150 x 2.1 mm, 3µm)	Giroud, 2004
Metadona Sangre, orina	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato	Lichrospher RP18 (125 x 4.3 mm)	Trachta, 2004
Cocaína, opiáceos Plasma, orina	MS	Acetonitrilo - Acetato amónico pH 6.5	Synergi Hydro RP18 (150 x 2 mm, 3µm)	Maralikova, 2004
Cocaína, opiáceos Muestras ilícitas	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 7	Lichrospher 100 NH ₂ (250 x 3 mm, 5µm)	Conemans, 2004
Cocaína Pelo	UV-Vis	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 8 (12:88)	ISRP-C18 (250 x 2 mm)	Menezes, 2004
Opiáceos, cocaína Pelo	APCI- MS/MS	Acetonitrilo - Acetato NH ₄ + 0.001% ácido fórmico pH 4.5	Synergi Hydro RP (150 x 2 mm, 4µm)	Scheidweiler, 2004
Cocaína y metabolitos Saliva	MS	Acetonitrilo + Metanol + Acetato amónico - Acetonitrilo + Metanol + Agua	Hypersil BDS C18 (100 x 2.1 mm, 3µm)	Clauwaert, 2004

Droga Matriz	Detector	Fase móvil	Columna	Referencia
Cocaína, BEG Orina	DAD	Acetonitrilo – Metanol - Tampón fosfato pH 3 (15:15:70)	Spherisorb RP18 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Brunetto, 2005
Morfina Suero	MS	Metanol – Agua + Ácido fórmico	Zorbax SB-C18 (50 x 2.1 mm, 5µm)	Edwards, 2005
Cocaína, opiáceos Plasma	MS	Acetonitrilo - Formiato amónico pH 4	Zorbax Bonus (150 x 4.6 mm, 5µm)	Rook, 2005
Opiáceos Orina	MS-MS	Acetato amónico – Acetonitrilo - Metanol	Synergi Fusion RP (75 x 2 mm)	Murphy, 2005
Opiáceos, cocaína Orina	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 6.5	XTerra RP8 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Fernández, 2005
Opiáceos, cocaína Saliva	MS	Metanol - Bicarbonato amónico pH 10 (30:70)	XTerra MS C18 (150 x 2.1 mm, 3.5µm)	Wood, 2005
Opiáceos, cocaína Saliva	MS-MS	Acetonitrilo - Formiato amónico + Ácido fórmico + Agua	Luna C18 (150 x 2 mm, 3µm)	Wylie, 2005
Opiáceos, cocaína Plasma	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 6.5	XTerra RP8 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Fernández, 2006
Cocaína, BEG Sangre, orina, humor vítreo	MS-MS	Formiato amónico - Ácido fórmico - Acetonitrilo	Synergi Polar RP (150 x 2 mm, 4µm)	Duer, 2006
Opiáceos Sangre	MS-MS	Acetonitrilo - Tampón formiato pH 3.5	Synergi C12 Max RP (150 x 2 mm, 4µm)	Musshoff, 2006
Drogas de abuso Saliva	MS-MS	Acetonitrilo - Tampón formiato pH 3	Atlantis dC18 (200 x 2.1 mm, 3µm)	Concheiro, 2007
Opiáceos Sangre	MS-MS	Acetonitrilo - Tampón formiato pH 3	Synergi Polar RP (150 x 2 mm, 4µm)	Al-Asmari, 2007
Opiáceos Plasma, suero, orina	MS-MS	Acetonitrilo - Tampón formiato pH 3	Nova-Pack CN HP (100 x 3.9 mm, 4µm)	Coles, 2007
Opiáceos, cocaína Plasma, orina	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 6.5	XTerra RP 8 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Fernández, 2007
Cocaína Sangre, orina	MS	Acetonitrilo - Ácido fórmico - Agua	Zorbax SB-C18 (30 x 2.1 mm, 3µm)	Johansen, 2007
Opiáceos Sangre	UV-MS	Acetonitrilo - Ácido acético - Acetato amónico	Lichrospher 100 RP-8 (250 x 4 mm, 5µm)	Dordević, 2007
Opiáceos Orina	MS-MS	Acetonitrilo - Ácido fórmico	Luna C18 (100 x 2 mm, 3µm)	Gustavsson, 2007
Morfina, petidina Orina	MS-MS	Acetonitrilo – Trietilamina - Tampón fosfato pH 3	Hypersil C18 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Zhang, 2008
Cocaína Sangre	MS-MS	Acido fórmico 0.1% - Agua Ácido fórmico 0.1% - Acetonitrilo	Gemini C6-Phenyl (50 x 3 mm, 5µm)	Jagerdeo, 2008

Droga Matriz	Detector	Fase móvil	Columna	Referencia
Opiáceos Sangre, orina	MS-MS	Acetonitrilo - Ácido fórmico - Acetato amónico	Gemini C18 (100 x 2 mm, 3µm)	Gergov, 2009
Opiáceos	MS-MS	Acetato amónico pH 6.8 - Metanol Acetato amónico pH 8 - Metanol 2-propanol - Ácido fórmico - Metanol	High Purity C8 (150 x 2 mm, 3µm)	Fox, 2009
Opiáceos, cocaína Orina	MS-MS	Bicarbonato amónico pH 10.2 - Metanol	BEH C18 (50 x 2.1 mm, 1.7µm)	Berg, 2009
Cocaína Orina	MS-MS	Formiato amónico pH 2.7 - Metanol - Acetonitrilo	XDB - C8 (50 x 2.1 mm, 1.8µm)	Langman, 2009
Cocaína, opiáceos Orina	MS-MS	Formiato amónico + Ácido fórmico 0.1% - Acetonitrilo + Ácido fórmico 0.1%	Zorbax XDB-C18 (50x4.6 mm, 1.8µm) Coca (50x4.6mm,3.5µm) Opiáceo	Stout, 2009
Morfina Muestras biológicas	MS	Formiato amónico - Ácido fórmico pH 2.7 Acetonitrilo - Formiato NH ₄ - Ácido fórmico pH 3.8	Synergi Polar (150 x 2 mm)	Taylor, 2009
Drogas abuso Pelo	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 6.5	XTerra RP8 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Fernández, 2009
Drogas de abuso Sangre	MS	Metanol - Formiato amónico	Varian Pursuit 3 C18 (100 x 3 mm, 3µm)	Bjørk, 2010
Opiáceos, cocaína Orina	MS-MS	Acetato amónico 10mM - Acetonitrilo - Metanol	Synergi Fusion RP (75 x 2 mm)	Shakleya, 2010
Drogas de abuso Orina	MS-MS	0.5% ácido fórmico en agua - 0.5% ácido fórmico en acetonitrilo	Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 x 4.6 mm, 1.8µm)	Chiuminatto, 2010
Opiáceos, anfetamina, flunitracepam, cocaína Saliva	MS-MS	Acetonitrilo - Acetato NH ₄ en agua 10mM pH 6.25	Waters HSS T3 column (100 x 2.1 mm, 1.8µm)	Wang, 2010
Buprenorfina, metadona, cocaína, opiáceos, nicotina Fluido oral	MS-MS	0.1% ácido fórmico en agua - 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo	Synergi Polar-RP 80A (75 x 2 mm, 4µm)	Concheiro, 2010
Anfetaminas, cocaína, metabol. Fluido oral	MS-MS	Acetonitrilo - 5mM ácido fórmico en acetonitrilo	C18 Gemini (100 x 2.1 mm, 3µm)	Sergi, 2010
Drogas abuso Humor vítreo	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 6.53	XTerra RP8 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Fernández, 2011

Droga Matriz	Detector	Fase móvil	Columna	Referencia
Drogas abuso Suero humano	MS-MS	0.1% ácido fórmico y 1mM formiato amónico - Acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico y 1 mM formiato amónico.	Restek, Allure PFP Propyl (50 x 2.1 mm, 5µm)	Bassan, 2011
Anfetaminas, ketamina, cocaína Pelo	MS-MS	Formiato amónico pH 3.5 en agua - Acetonitrilo	Unison UK-C18 (150 x 3 mm)	Miyaguchi, 2011
Opiáceos, cocaína Saliva	MS-MS	Ácido fórmico 0.1% + Acetato amónico 2mM + Acetonitrilo 2% en agua - Ácido fórmico 0.1% + Acetato amónico 2mM + Acetonitrilo 10% en agua	Restek Allure PFP-Propyl (50 x 2.1 mm, 5µm)	Cone, 2012
Cannabinoides Orina	MS-MS	Acetato amónico 5mM en agua - Acetato amónico 5mM en Metanol - Acetonitrilo	Aquasil C18 (100 x 2.1 mm, 5µm)	Jager, 2012
Metadona Orina, plasma, saliva	UV (205 nm)	0.1% ácido fluoroacético en metanol - Agua (60:40)	Columna C18 (250 x 4.6 mm, 10µm)	Ranjbari, 2012
Drogas abuso Plasma, orina	MS-MS	10% acetonitrilo en metanol - Ácido fórmico 5mM en agua	Kinetex C18 (150 x 2.1 mm, 2.6µm)	Napoletano, 2012
THC y metabolitos Plasma	MS-MS	Agua + Ácido fórmico (100:0.1) - Acetonitrilo + Ácido fórmico (100:0.1)	Luna C18 (20 x 2 mm, 5µm)	Ferreirós, 2013
Anfetaminas, cocaína, opiáceos, BZD Sangre	MS-MS	0.1% amoniaco acuoso (25%) en agua - 0.1% amoniaco acuoso (25%) en metanol	AcquityUPLC C18 (100 x 2.1 mm, 1.7µm)	Björk, 2013
Opiáceos, cocaína Sangre, orina	MS-MS	Acetona - Ácido heptafluorobutírico al 0.05% (5:95)	Spherisorb C18 S5W (200 x 2 mm, 5µm)	Oberacher, 2013
Opiáceos, cocaína Sangre	MS-MS	Ácido fórmico 0.1% en agua - Ácido fórmico 0.1% en metanol	Acquity UPLC BEH Phenyl (100x 2.1 mm, 1.7µm)	Ramírez - Fernández, 2013
Opiáceos Orina	MS-MS	Ácido fórmico 0.1% en agua - Ácido fórmico 0.1% en metanol	Poroshell 120 EC-C18 (100 x 2.1 mm, 2.7µm)	Lin, 2013
Opiáceos Orina	MS-MS	0.1% ácido fórmico- Metanol	Acquity UPLC HSS T3 (100x2.1 mm, 1.8µm)	Andersson, 2013
Anfetaminas, cocaína, opiáceos, BZD Orina	MS-MS	Ácido fórmico 0.1% en agua - Ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo	Hypersil Gold (50 x 2.1 mm, 5µm)	Schaefer, 2013
Cannabinoides Orina	MS-MS	Ácido fórmico 0.1% en agua - Ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo	Kinetex XB-C18 (50 x 3 mm, 2.6µm)	Wohlfarth, 2013

Droga Matriz	Detector	Fase móvil	Columna	Referencia
Cocaína y metabolitos Pelo	MS-MS	Acetato amónico 5mM - Acetonitrilo	1: Eclipse XDB-C8 (12.5 x 2.1mm, 5µm) 2: Kinetex C18 (50 x 2.1 mm, 2.6µm).	Alves, 2013
Anfetaminas, opiáceos, cocaína, alucinógenos Pelo	MS-MS	Metanol – Acetonitrilo - Ácido fórmico 7mM	Kinetex XB C18 (100 x 2.1 mm, 2.6µm)	Sergi, 2013
Cocaína Muestras calle	DAD	Tampón fosfato - Acetonitrilo	Columna C18	Brancaccio, 2013
Anfetaminas, opiáceos Pelo	MS-MS	Ácido fórmico 0.1% en agua - Ácido fórmico 0.1% en metanol	Kinetex C18 (50 x 4.6 mm, 2.6µm)	Chang, 2014

Las intoxicaciones por medicamentos y entre ellos las benzodicepinas ocupan uno de los primeros lugares en cuanto a frecuencia y peligrosidad se refiere [Cabrera, 1993]. Desde su descubrimiento sus ventas fueron muy altas, quizás las más elevadas que haya alcanzado una categoría de drogas, pero su naturaleza adictiva no se puso de manifiesto hasta 1961. Este hecho suscitó bastante interés, por lo que se produjeron numerosas investigaciones [Escohotado, 1998; Drummer, 1998; Samanidou, 2009].

Entre los métodos empleados se encuentra la Electroforesis Capilar [Tomita, 1996; Kratzsch, 2004], la Cromatografía Micelar Electrocinética [Hsiu-Li, 2009], Técnicas de Inmunoensayo [Moore, 1999], Métodos electroquímicos, potenciométricos [Salem, 2003], espectrofotométricos [Salem, 2002] y fluorimétricos [Dolejsova, 1999] o la cromatografía en capa fina. Si los resultados preliminares son positivos, se realiza un ensayo confirmatorio para su verificación. Los métodos más empleados con fines cuantitativos son los cromatográficos, tanto cromatografía de gases [Pirnay, 2002; Gunnar, 2004; Gunnar, 2005; Gunnar, 2006; Papoutsis, 2010], como cromatografía de líquidos (HPLC, UPLC), o cromatografía líquida micelar [Esteve-Romero, 2005] y separación quiral.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha sido y sigue siendo una de las técnicas más utilizadas en el campo de la toxicología para la determinación de benzodicepinas en distintas matrices biológicas como sangre, orina, humor vítreo, etc. Se ha hecho una búsqueda exhaustiva de publicaciones, en donde se usan diferentes detectores: UV, fluorescencia, electroquímico o espectrometría de masas.

La separación de benzodiazepinas y sus metabolitos en cromatografía líquida con detección espectrofotométrica requiere el uso de un gradiente de elución y, a menudo la adición de modificadores iónicos, como tampones fosfato en la fase móvil, para aumentar la retención de conjugados polares. La reciente introducción del UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) permite trabajar a elevadas presiones (hasta 15000 psi) con columnas cromatográficas de tamaño de partícula inferior a 2 μm [Neue y col, 2010]. Esta tecnología presenta ventajas significativas en la resolución, velocidad y sensibilidad para aplicaciones analíticas, particularmente cuando se combina con espectrometría de masas [Nakamura, 2011]. Su elevada resolución origina mejores separaciones con picos cromatográficos estrechos, tiempos de análisis más cortos mejorando los límites de detección y reduciendo el efecto matriz. Para la detección por espectrometría de masas, los analitos tienen que ser ionizados primero, siendo los mecanismos de ionización a presión atmosférica (API), electrospray (ESI) e ionización química a presión atmosférica (APCI), los más utilizados. La técnica de ionización mediante ESI, es el método más adecuado para compuestos polares e iónicos. APCI es más apropiado para analitos no ionizados.

La tabla 8 contiene una recopilación de los distintos métodos de cromatografía líquida empleados en la determinación de benzodiazepinas en diversas muestras biológicas (sangre, plasma, suero, orina, humor vítreo), usando diferentes procedimientos de extracción (SPE, LLE, MAE).

Tabla 8. Revisión bibliográfica sobre la determinación de las benzodiacepinas usando HPLC.

Analitos Matriz	Detector	Fase móvil	Columna	Referencia
10 BZD Suero	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 6.4 - Metanol (292:610:98)	Novapak C18 (150 x 3.9 mm, 4µm)	Puopolo, 1991
3 BZD Sangre, suero	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 2.3 (16:34)	Kontrosorb 10 RP18 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Mußhoff, 1992
Bromacepam Plasma	UV	Agua - Acetonitrilo - Trietilamina pH 7.4 (700:300:4)	Novapak C18 (150 x 3.9 mm, 5µm)	Le Solleu, 1993
3 BZD Suero, plasma	DAD	Acetonitrilo - Metanol - Tampón fosfato pH 3.7 (30:2:100)	Novapak C18, 4µm	Akerman, 1996
12 BZD Suero	UV	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 6 (45:55)	TSK-Super ODS (100 x 4.6 mm, 2µm) Hypersil ODS C18 (100 x 4.6 mm, 5µm)	Tanaka, 1996
9 BZD Sangre	MS-MS	Metanol - Acetato amónico 50mM (60:40)	Novapak C18 (150 x 3.9 mm, 4µm)	Verweij, 1996
Alprazolam Sangre, orina	UV	Metanol - Agua + Dietilamina 1% (60:40)	ODS (150 x 4.6 mm, 5µm)	Jenkins, 1997
Bromacepam Plasma	UV-VIS	Fosfato potásico - Acetato amónico - Ácido acético (26.5:21.5:52)	ODS C8 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Panderi, 1997
Flunitrazepam Plasma, orina	DAD	Metanol - Agua con 0.125% isopropilamina	Chromspher C8 (100 x 3 mm, 5µm)	He, 1997
5 BZD Plasma, orina	DAD	Metanol - Agua + isopropilamina (50:50)	Chromspher C8 (100 x 3 mm, 5µm)	He, 1998
5 BZD Plasma, orina	UV	Metanol - Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 3.5 (50:10:40)	Hypersil BDS RP18 (250 x 4 mm, 5µm)	Azzam, 1998
Midazolam Plasma	UV	Tampón fosfato pH 7 - Acetonitrilo	Hypersil C18 BDS (150 x 0.8 mm, 5µm)	Eeckhoudt, 1998
Clonazepam Plasma	UV	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 7	Symmetry C18 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Le Guellec, 1998
Midazolam Plasma	UV	Metanol - Ácido perclórico 0.02% (30:70)	Spherisorb Silica (250 x 4.6 mm, 5µm)	Portier, 1999
Alprazolam Plasma	ESI-MS/MS	Metanol-Agua (60:40)	Zorbax Rx C18 (150 x 2.1 mm)	Crouch, 1999
2 BZD Plasma	UV-VIS	ACN-Agua (45:55)	Lichrospher RP-18 (250 x 4 mm, 5µm)	Atta-Politou, 1999
Diacepam Orina	UV	Tampón fosfato pH 7 - Metanol (75:25)	Stainless Steel Colum (100 x 4.6 mm, 5µm)	El-Gizawy, 2000
Diacepam Suero	DAD	Acetato amónico - Agua - Acetonitrilo (290:160:200)	µBondapack C18 (300 x 3.9 mm, 5µm)	Ahrens, 2000

Analitos Matriz	Detector	Fase móvil	Columna	Referencia
Diacepam Sangre, suero	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 2.1 (35:65)	Lichrospher C8 (125 x 3 mm, 5µm)	El Mahjoub, 2000
10 BZD Sangre	UV-ED	Acetonitrilo - Tampón acetato pH 4.6 (45:5)	Lichrospher 100 RP8 (150 x 4.6 mm)	Wilhelm, 2000
5 BZD Sangre	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 7.2 (6:94)	Lichrospher Select-B (125 x 3 mm, 5µm)	El Mahjoub, 2001
3 BZD Humor vítreo	UV	Tampón fosfato – Metanol (30:70)	Hyposil ODS (250 x 4.6 mm, 5µm)	Scott, 2001
2BZD Suero, orina	UV	Acetonitrilo – Agua - Tampón fosfato (440:540:20) para suero ó (360:580:60) para orina	Supelcosil LC-8-DB (250 x 4.6 mm, 5µm)	Kunicki, 2001
7 BZD Orina	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 4.5 con octilamina	Hypersil C18 (100 x 4.6 mm, 3µm)	Segura, 2001
Diacepam Plasma	UV-VIS	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 3.5 (31:69)	Ultrasphere ODS (150 x 4.6 mm, 5µm)	Muchohi, 2001
5 BZD Plasma, orina	UV	Agua - Metanol (52:48)	Supelcosil C18 (50 x 4.6 mm, 5µm)	Mullet, 2002
2 BZD	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato trietilamonio (10:90)	Superspher 60 RP (125 x 4.6 mm, 5µm)	Aebi, 2002
8 BZD Suero	UV	SDS - Butanol 5% - Tampón fosfato pH 7	Kromasil C18 (120 x 4.6 mm, 5µm)	Capella-Peiró, 2002
4 BZD Plasma	UV-VIS	Acetonitrilo - Tampón acetato pH 2.5 (15:85)	Hisep (250 x 4.6 mm, 5µm)	Pistos, 2003
Drogas, BZD Sangre	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 2.3 (1:2)	Lichrosorb RP18	Kroener, 2003
Loracepam Plasma, orina	API-MS	Acetonitrilo - Acetato amónico + Ácido fórmico pH 2.76	Shodex MSPak (50 x 4.6 mm, 6µm)	Lee, 2003
18 BZD Sangre	APCI-MS/MS	Metanol - Tampón formiato pH 9 (60:40)	Zorbax XDB C8 (150 x 4.6 mm, 5µm)	Rivera, 2003
Bromacepam Plasma	MS-MS	Acetonitrilo – Agua (50:50)	Genesis C18 (100 x 2.1 mm, 4µm)	Laurito, 2004
Bromacepam Plasma	ESI-MS/MS	Acetato amónico - Metanol (20:80)	Chromsep Microsorb 100 - 3BDS (50 x 2mm)	Andraus, 2004
Clobazam Muestras biológicas	DAD	Metanol - Agua	Columna RP18 (150 x 2.1 mm, 3.5µm)	Proença, 2004
Alprazolam Tabletas	UV	Tampón fosfato pH 6 - Acetonitrilo (45:55)	ODS C18 (200 x 4.6 mm, 5µm)	Pérez Lozano, 2004
23 BZD Plasma	APCI-MS	Acetonitrilo - Tampón formiato pH 3	Superspher 60RP SelectB (125 x 2 mm)	Kratzsch, 2004

Analitos Matriz	Detector	Fase móvil	Columna	Referencia
33 BZD Sangre	APCI-MS	Metanol – Ác. fórmico pH 3 (30:60)	XTerra MS C18 (150 x 2.1 mm, 3.5µm)	Smink, 2004
4 BZD Sangre	MS	AcNH ₄ pH 3.3 - Acetonitrilo (75:25) AcNH ₄ pH 6.7 - Acetonitrilo (50:50)	Supelco RP18 (150 x 4 mm, 5µm)	Wallis, 2004
Loracepam Orina, saliva, pelo	MS-MS	Acetonitrilo – Tampón formiato pH 3.6 (5:95)	XTerra C18 (100 x 2.1 mm, 3.5µm)	Kintz, 2004
Clonazepam Plasma	---	Acetonitrilo – Tampón acetato pH 7 (40:60)	NovaPak C18 (150 x 3.9 mm; 4µm)	Bares, 2004
8 BZDs Plasma	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 2.1 (30:70)	Chromolith RP18 (100 x 4.6 mm)	Bugey, 2004
DZP, DDZ Humor vítreo	DAD-MS	Acetonitrilo - Acetato amónico (60:40)	Symmetry C18 (150 x 2.1 mm, 5µm)	Teixeira, 2004
9 BZD Plasma, saliva	MS	Acetonitrilo – Ácido fórmico 0.1%	XTerra RP18 (150 x 2.1 mm, 5µm)	Quintela, 2005
Loracepam Plasma, orina	ESI-MS	Acetonitrilo – Agua - AcH (80:20:0.1)	Chiralpak OD-R (250 x 4.6 mm, 10µm)	Papini, 2006
2BZD Sangre, orina	DAD	Metanol – 0.1% TFA	Synergi RP C18 (150 x 4.6 mm, 5µm)	Hackett, 2006
12 BZD Sangre, suero	DAD-MS	Acetonitrilo - Metanol - Acetato amónico	Restek Allure C18 (150 x 3.2 mm, 5µm)	Dussy, 2006
8 BZD Sangre	APCI-MS	Tampón formiato pH 3 – Acetonitrilo (65:35)	Chromolith RP18 (100 x 4.6 mm)	Bugey, 2006
4 BZD Plasma, orina	UV-VIS	Acetato amónico - Metanol - Acetonitrilo (33:57:10)	Inertsil C8 (250 x 4 mm, 5µm)	Samanidou, 2007
Clonazepam Plasma	MS-MS	Acetonitrilo + Agua + Ácido fórmico (90:9:1) - Agua + ácido fórmico (99.954:0.046)	Genesis C8 (100 x 2.1 mm)	Cavedal, 2007
2 BZD Orina, saliva	DAD- MS/MS	Ácido fórmico 0.1% - Metanol (10:90)	Gemini C18 (150 x 2 mm, 3.5µm)	Laloup, 2007
6 BZD Sangre, orina	DAD	Metanol - Acetonitrilo - Acetato amónico (30:15:55)	Kromasil C8 (250 x 4 mm, 5µm)	Nasir Uddin, 2008a
6 BZD Sangre, orina, saliva	DAD	Metanol - Acetonitrilo - Acetato amónico (14:32:54)	Kromasil C8 (250 x 4 mm, 5µm)	Nasir Uddin, 2008b
15 BZD Plasma	UV	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 3 (35-65)	Zorbax Eclipse C8 (150 x 4.6 mm, 5µm)	Mercolini, 2008

Analitos Matriz	Detector	Fase móvil	Columna	Referencia
4BZD Plasma	UV	Acetonitrilo – Metanol – Tampón fosfato pH 2.5 (27:10:63)	Chromolith RP18 (100 x 4.6 mm, 5µm)	Rouini, 2008
7 BZD Plasma	UV	Tampón fosfato pH 6 - Metanol - Dietileter (55:40:5)	Supelcosil LC-18 DB (250 x 4.6 mm, 5µm)	Bastos Borges, 2009
DZP y metabol. Plasma, cerebro	UV	Acetonitrilo - Tampón fosfato + Trietilamina (38:62)	Zorbax Eclipse C8 (150 x 4.6 mm, 5µm)	Mercolini, 2009
43 BZD Plasma	UPLC-MS	0.05% Ácido fórmico en agua - 0.05% Ácido fórmico en acetonitrilo	Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7µm)	Ishida, 2009
2BZD Sangre	APPI-MS	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 5 (33:67)	XBridge Shield (100 x 2.1 mm, 3.5µm)	Marchi, 2009
21 BZD Suero	MS-MS	Metanol - Ácido fórmico + Formiato amónico	Unison UK-C18 (150 x 2 mm, 3µm)	Nakamura, 2009
4 BZD Plasma, orina	MS-MS	Acetonitrilo + 0.1% AcH (10:90) Acetonitrilo + 0.1% AcH (90:10)	-----	Cudjoe, 2009
DZP, LOR Orina	MS-MS	Acetonitrilo - Acetato amónico + AcH (pH 3.8) (35:65)	Luna C18 (50 x 2 mm)	Roskar, 2010
BZD, drogas Orina	UHPLC- MS	Ác. fórmico 0.5% en agua – Ácido fórmico 0.5% en acetonitrilo (90:10)	Zorbax Eclipse XDB C18 (50 x 4.6 mm, 1.8µm)	Chiuminatto, 2010
6 BZD Plasma	UV	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 7.5	XTerra RP8 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Fernández, 2010a
6 BZD Plasma	UV	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 7.5	XTerra RP8 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Fernández, 2010b
23 BZD Sangre	UPLC– MS/MS	Amoníaco + 25% agua - Amoníaco + 25% metanol	Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7µm)	Simonsen, 2010
6 BZD Humor vítreo	DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 6 (35:65)	XBridge RP18 (150 x 4.6 mm, 5µm)	Cabarcos, 2010
3 BZD Orina	MS	Agua+ 0.2% ácido fórmico – Metanol + 0.2% ácido fórmico	Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2.1 mm, 1.7µm)	Ming, 2011
BZD, drogas Orina	MS-MS	Acetato amónico + Agua – Acetato amónico + Metanol : ACN (1:1)	Aquasil C18 (100 x 2.1 mm, 5µm)	De Jager, 2011
17 BZD Orina	MS-MS	Agua - Metanol	Eclipse XDB C18 (50 x 4.6 mm, 1.8µm)	Salomone, 2011

Analitos Matriz	Detector	Fase móvil	Columna	Referencia
Midazolam Sangre, orina	MS-MS	Acetonitrilo - Acetato amónico 2mM - ácido fórmico A: 5:95:0.2; B: 95:5:0.2	Synergi Polar RP 80A (150 x 2 mm, 4µm)	Oertel, 2011
28 BZD Plasma	UHPLC-MS/MS	Tampón formiato pH 3.4 - Acetonitrilo + Ácido fórmico 0.1%	Hypersil Gold Phenyl (100 x 2.1 mm, 1.9µm)	Remane, 2011
12 BZD Plasma	MS-MS	Ácido fórmico 0.1% + Formiato amónico 1mM - Acetonitrilo + Ácido fórmico 0.1% + Formiato amónico 1mM	Allure PFP Propyl (50 x 2.1 mm, 5µm)	Bassan, 2011
3 BZD Plasma	MS-MS	Acetonitrilo - 0.1% ácido fórmico	Allure PFP Propyl (50 x 2.1 mm, 5µm)	Larsen, 2011
6 BZD Saliva	UV	Acetato amónico 0.05M - Acetonitrilo - Metanol (55:15:30)	Kromasil (250 x 4 mm, 5µm)	Nasir Uddin, 2011
28 BZD Pelo	HR-MS	Ácido fórmico 0.1% en agua - Ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo	Luna C18 (150 x 1 mm, 5µm)	Vogliardi, 2011
18 BZD Pelo	MS-MS	Acetonitrilo - Acetato amónico 20mM en ácido fórmico 1% pH 4	Allure PFP Propyl (100 x 2.1 mm, 5µm)	Xiang, 2011
Phenazepam Sangre y orina	MS-MS	Acetonitrilo - Acetato amónico 10mM en ácido fórmico 0.1%	Luna phenyl-hexyl (50 x 3 mm, 3µm)	Kriikku, 2012
11 BZD Sangre	UPLC-MS/MS	Acetonitrilo - Tampón acetato pH 5	Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7µm)	Sauve, 2012
3 BZD Suero	UV	Dodecil sulfato sódico - 2.4% pentanol en Fosfato sódico - 0.1% trietilamina	C18, CN y C8 (250 x 4.6 mm, 5µm)	Hoonka, 2012
21 BZD Pelo	MS-MS	Tampón formiato pH 3.5 + Ácido fórmico - Metanol + Formiato amónico	Kinetex C18 (50 x 2 mm, 2.6µm)	Rust, 2012
17 BZD Pelo	MS-MS	Ácido fórmico 0.1% - Acetonitrilo	Hypersil Gold (100 x 2.1 mm, 3µm)	Morini, 2012
BZD Pelo	QTOF-MS	Acetato amónico 10mM - Metanol	Zorbax Eclipse plus C18 (100 x 2.1 mm, 3.5µm)	Broecker, 2012
Zolpidem, flunitrazepam Pelo	MS-MS	Formiato amónico pH 3.5 - Acetonitrilo	Unison UK-C18 (150 x 3 mm, 3µm)	Miyaguchi, 2013
6 BZD Pelo	UHPLC-MS-TOF	Ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo - Formiato amónico pH 3.4	Columna Acclaim (250 x 4.6 mm, 5µm)	Wietecha-Posluszny, 2013
BZD Orina	MS-MS	Ácido fórmico 0.1% en agua - Ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo	Hypersil Gold (50 x 2.1mm, 5µm)	Schaefer, 2013

Analitos Matriz	Detector	Fase móvil	Columna	Referencia
BZD Orina, sangre	TOF-MS	Metanol - Formiato amónico 5mM	Eclipse Plus C18 (100 x 3 mm, 1.8µm)	Guale, 2013
7 BZD Plasma	UPCL-DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato 1mM pH 6	Acquity BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7µm) Acquity BEH RP18 (100 x 2.1 mm, 1.7µm)	Fernández, 2013
Clonazepam Plasma	UPLC-MS/MS	Ácido fórmico + Acetonitrilo - Ácido fórmico + Metanol (75:25)	Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2.1 mm, 1.7µm)	Favreto, 2013
4 BZD Sangre	UPLC-MS/MS	Acetonitrilo - Ácido fórmico 0.1%	Acquity UPLC HSST3 (100 x 2.1 mm, 1.8µm)	Proença, 2013
25 BZD Fluido oral	MS-MS	Formiato amónico + Ácido fórmico 0.2% en agua - Formiato amónico + Ácido fórmico 0.2% en acetonitrilo	Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4.6 mm, 5µm),	Jang, 2013

I.6.1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aderjan R, Hoemann S, Schmitt G, Skopp G. *Morphine and morphine glucuronides in serum of heroin consumers and in heroin-related deaths determined by HPLC with native fluorescence detection.* J Anal Toxicol, 19 (1995) 163-168.

Aebi B, Sturny-Jungo R, Bernhard W, Blanke R, Hirsch R. *Quantitation using GC-TOF-MS: example of bromazepam.* Forensic Sci Int, 128 (2002) 84-89.

Ahrens B, Schwandt H, Schütz H. *Screening, identification and quantitation of benzodiazepines in serum by solid phase extraction on a cyanopropyl phase using high performance liquid chromatography and photodiode array detection.* Arzneim Forsch, 50 (2000) 1057-1062.

Akerman KK, Jolkkonen J, Parviainen M, Penttilä I. *Analysis of low-dose benzodiazepines by HPLC with automated solid-phase extraction.* Clin Chem, 42 (1996) 1412-1416.

Al-Asmari AI, Anderson RA. *Method for quantification of opioids and their metabolites in autopsy blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* J Anal Toxicol, 31 (2007) 394-408.

Aleksa K, Walasek P, Fulga N, Kapur B, Gareri J, Koren G. *Simultaneous detection of seventeen drugs of abuse and metabolites in hair using solid phase microextraction (SPME) with GC-MS.* Forensic Sci Int, 218 (2012) 31-36.

Álvarez I, Bermejo AM, Taberero MJ, 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 (2009) 1345-1350.

Álvarez I, Bermejo Barrera AM, Cid Silva P, Taberero Duque MJ, Fernández Gómez P, López Eijo P. *Microwave assisted extraction for the determination of ethyl glucuronide in urine by gas chromatography-mass spectrometry.* J Appl Toxicol, 28 (2008) 773-778.

Alves MNR, Zanchetti G, Piccinotti A, Tameni S, De Martinis BE, Poletini A. *Determination of cocaine and metabolites in hair by column-switching LC-MS-MS analysis.* Anal Bioanal Chem, 405 (2013) 6299–6306.

Andersson M, Stephanson N, Ohman I, Terzuoli T, Lindh JD, Beck O. *Direct and efficient liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for opiates in urine drug testing-importance of 6-acetylmorphine and reduction of analytes.* Drug Test Anal, 6(4) (2014) 317-324.

Andraus M, Wong A, Silva O, Wada C, Toffleto O. *Determination of bromazepam in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometric detection: application to a bioequivalence study.* J Mass Spect, 39 (2004) 1348-1355.

Angelo HR, Beck N, Kristensen K. *Enantioselective high performance liquid chromatographic method for the determination of methadone and its main metabolite in urine using an AGP and C8 column coupled serially.* J Chromatogr B, 724 (1999) 35-40.

Antollini L, Suriano C, Grassi MC, Nencini P. *Analysis of cocaethylene, benzoylecgonine and cocaine in human urine by high performance thin layer chromatography with ultraviolet detection: a comparison with high performance liquid chromatography.* J Chromatogr B, 751 (2001) 19-27.

Atta-Politou J, Parissi-Poulou M, Koutselinis A. *A modified simple and rapid reversed phase liquid chromatographic method for quantification of diazepam and nordiazepam in plasma.* J Pharm Biomed Anal, 20 (1999) 389-396.

Azzam RM, Notarianni LJ, Ali HM. *Rapid and simple chromatographic method for the determination of diazepam and its major metabolites in human plasma and urine.* J Chromatogr B, 708 (1998) 304–309.

Balabanova S, Brunner H, Nowak R. *Radioimmunological determination of cocaine in human hair.* Z Rechtsmed, 98 (1987) 229-234.

Balíková M, Habrdová V. *Hair analysis for opiates: evaluation of washing and incubation procedures.* J Chromatogr B, 789 (2003) 93–100.

Balíková M, Vecerková J. *High performance liquid chromatography confirmation of cocaine and benzoylecgonine in biological samples using photodiode array detection after toxicological screening.* J Chromatogr B, 656 (1994) 267-273.

Bares IF, Pehourcq F, Jarry C. *Development of a rapid RP-HPLC method for the determination of clonazepam in human plasma.* J Pharm Biomed Anal, 36 (2004) 865–869.

Bassan DM, Erdmann F, Krüll R. *Quantitative determination of 43 common drugs and drugs of abuse in human serum by HPLC-MS/MS.* Anal Bioanal Chem, 400 (2011) 43–50.

Bastos Borges K, Figueiredo Freire E, Martins I. *Simultaneous determination of multibenzodiazepines by HPLC/UV: investigation of liquid-liquid and solid-phase extractions in human plasma.* Talanta, 78 (2009) 233-341.

Baumgartner WA, Black CT, Jones PF, Bland WH. *Radioimmunoassay of cocaine in hair: concise communication.* J Nucl Med, 23 (1982) 790-792.

- Berg T, Lundanes E, Christophersen AS, Strand DH. *Determination of opiates and cocaine in urine by high pH mobile phase reversed phase UPLC-MS/MS*. J Chromatogr B, 877 (2009) 421-432.
- Bieri S, Ilias Y, Bicchi C, Veuthey J, Christen P. *Focused microwave assisted extraction combined with solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the selective analysis of cocaine from coca leaves*. J Chromatogr A, 1112 (2006) 127-132.
- Bjørk MK, Nielsen MKK, Markussen LØ, Klinke HB, Linnet K. *Determination of 19 drugs of abuse and metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 396 (2010) 2393-2401.
- Bjørk MK, Simonsen KW, Andersen DW, Dalsgaard PW, Sigurðardóttir SR, Linnet K, Rasmussen BR. *Quantification of 31 illicit and medicinal drugs and metabolites in whole blood by fully automated solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem 405 (2013) 2607–2617.
- Blahová E, Brandsteterová E, Netriová J. *Symmetry Shield and XTerra reversed phase columns in HPLC determination of morphine and its metabolites*. Microchim Acta, 140 (2002) 247-253.
- Brachet A, Christen P, Veuthey JL. *Focused microwave assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves*. Phytochem Anal, 13 (2002) 162-169.
- Brancaccio A, Maresca P, Albrizio S, Fattore M, Cozzolino M, Seccia S. *Development and validation of a diode array high performance liquid chromatography method to determine seized street cocaine sample purity*. Anal Methods, 5 (2013) 2584-2590.
- Brandsteterová E, Blahová E, Netriová J. *Simple generic SPE assay for HPLC analysis of morphine and its glucuronides in serum samples*. J Liq Chromatogr & Rel Technol, 25 (2002) 2521-2534.
- Bravo F, González D, Benites J. *Development and validation of a solid-phase extraction gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous quantification of opioid drugs in human whole blood and plasma*. J Chilean Chem Soc, 56 (2011) 799-802.
- Broecker S, Herre S, Pragst F. *General unknown screening in hair by liquid chromatography–hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC–QTOF-MS)*. Forensic Sci Int, 218 (2012) 68–81.
- Brunetto MR, Delgado Cayama Y, Gutiérrez García L, Gallignani M, Obando MA. *Determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human urine into a column switching liquid chromatography system with diode array detection*. J Pharm Biomed Anal, 37 (2005) 115-120.
- Brunetto R, Gutiérrez L, Delgado Y, Gallignani M, Bruguera JL, Bruguera M. *High performance liquid chromatographic determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human blood plasma sample into an alkyl-diol-silica precolumn*. Anal Bioanal Chem, 375 (2003) 534-538.
- Bugey A, Rudaz S, Staub C. *A fast LC-APCI/MS method for analyzing benzodiazepines in whole blood using monolithic support*. J Chromatogr B, 832 (2006) 249–255.
- Bugey A, Staub C. *Rapid analysis of benzodiazepines in whole blood by high-performance liquid chromatography: use of a monolithic column*. J Pharm Biomed Anal, 35 (2004) 555-562.

- Buján L, Fernández P, Lafuente N, Aldonza M, Bermejo AM. *Comparison of two chromatographic methods for the determination of cocaine and its metabolites in blood and urine*. Anal Letters, 34 (2001) 2263-2275.
- Cabarcos P, Tabernero MJ, Alvarez I, López P, Fernández P, Bermejo AM. *Analysis of six benzodiazepines in vitreous humor by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection*. J Anal Toxicol, 34 (2010) 539-542.
- Cabrera R, Mencias E, Cabrera C. *Toxicología de los psicofármacos*. 1ª Ed, Mosby Year Book, Madrid, 1993.
- Cailleux A, Le Bouil A, Auger B, Bonsergent G, Turcant A, Allain P. *Determination of opiates and cocaine and its metabolites in biological fluids by high performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry*. J Anal Toxicol, 23 (1999) 620-624.
- Capella-Peiro ME, Bose D, Martinavarro-Domínguez A, Gil-Agusti M, Esteve-Romero J. *Direct injection micellar liquid chromatographic determination of benzodiazepines in serum*. J Chromatogr B, 780 (2002) 241-249.
- Caufield WV, Stewart JT. *Rapid determination of selected drugs of abuse in human plasma using a monolithic silica HPLC column and solid phase extraction*. J Liq Chromatogr & Rel Technol, 25 (2002) 2977-2998.
- Cavedal Luiz E, Mendes FD, Domingues CC, Patni Anil K, Monif T, Reyar S, Pereira ADS, Mendes GD, De Nucci G. *Clonazepam quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry in a bioequivalence study*. J Mass Spectrom, 42 (2007) 81-88.
- Chang Y-J, Chao M-R, Chen S-C, Chen C-H, Chang Y-Z. *A high-throughput method based on microwave-assisted extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of amphetamines, ketamine, opiates, and their metabolites in hair*. Anal Bioanal Chem, 406 (2014) 2445-2455.
- Cheng YF, Neue UD, Woods LL. *Novel high performance liquid chromatography and solid-phase extraction methods for quantitating methadone and its metabolite in spiked human urine*. J Chromatogr B, 729(1/2) (1999) 19-31.
- Chiuminato U, Gosetti F, Dossetto P, Mazzucco E, Zampieri D, Robotti E, Gennaro MC, Marengo E. *Automated online solid phase extraction ultra high performance liquid chromatography method coupled with tandem mass spectrometry for determination of forty-two therapeutic drugs and drugs of abuse in human urine*. Anal Chem, 82 (2010) 5636-5645.
- Clauwaert KM, Decaestecker T, Mortier K, Lambert W, Deforce D, Van Peteghem C, Van Bocxlaer J. *The determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in small-volume oral fluid samples by liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*. J Anal Toxicol, 28 (2004) 655-659.
- Clauwaert KM, Van Bocxlaer JF, Lambert WE, De Leenheer AP. *Analysis of cocaine, benzoylecgonine, and cocaethylene in urine by HPLC with diode array detection*. Anal Chem, 68(17) (1996) 3021-3028.
- Cognard E, Bouchonnet S, Staub C. *Validation of a gas chromatography-Ion trap tandem mass spectrometry for simultaneous analyze of cocaine and its metabolites in saliva*. J Pharm Biomed Anal, 41 (2006) 925-934.

- Coles R, Kushnir MM, Nelson GJ, McMillin GA, Urry FM. *Simultaneous determination of codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, and 6-acetylmorphine in urine, serum, plasma, whole blood, and meconium by LC-MS-MS*. J Anal Toxicol, 31 (2007) 1-14.
- Concheiro M, De Castro A, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M. *Confirmation by LC-MS of drugs in oral fluid obtained from roadside testing*. Forensic Sci Int, 170 (2007) 156-162.
- Concheiro M, Gray TR, Shakleya DM, Huestis MA. *High-throughput simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates, nicotine, and metabolites in oral fluid by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem 398 (2010) 915-924.
- Cone EJ, Darwin WD, Wang WL. *The occurrence of cocaine, heroin and metabolites in hair of drug abusers*. Forensic Sci Int, 63 (1993) 55-68.
- Cone EJ, Yousefnejad D, Darwin WD, Maguire T. *Testing human hair for drugs of abuse. II. Identification of unique cocaine metabolites in hair of drug abusers and evaluation of decontamination procedures*. J Anal Toxicol, 15 (1991) 250-255.
- Cone EJ. *Oral fluid results compared to self reports of recent cocaine and heroin use by methadone maintenance patients*. Forensic Sci Int, 215 (2012) 88-91.
- Conemans JMH, Van Der Burgt HAAM, Van Rooij JML, Pijnenburg CC. *The simultaneous determination of illicit drugs with HPLC-DAD*. Bulletin of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), 34(1) (2004) 11-13.
- Cordero R, Paterson S. *Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC-MS*. J Chromatogr B, 850 (2007) 423-431.
- Croteau LG, Akhtar MH, Bélanger JMR, Paré JRJ. *High performance liquid chromatography determination following microwave assisted extraction of 3-nitro-4-hydroxyphenylarsonic acid from swine liver, kidney and muscle*. J Liq Chromatogr, 17 (1994) 2971-2981.
- Crouch DJ, Rollins E, Canfield V, Andrenyak DM, Schulties JE. *Quantitation of alprazolam and α -hydroxyalprazolam in human plasma using liquid chromatography electrospray ionization MS-MS*. J Anal Toxicol, 23 (1999) 479-485.
- Cudjoe E, Pawliszyn J. *A new approach to the application of solid phase extraction disks with LC-MS/MS for the analysis of drugs on a 96-well plate format*. J Pharm Biomed Anal, 50 (2009) 556-562.
- Dams R, Benijts T, Lambert W, De Leenheer AP. *Simultaneous determination of in total 17 opium alkaloids and opioids in blood and urine by fast liquid chromatography diode array detection fluorescence detection, after solid-phase extraction*. J Chromatogr B, 733 (2002) 53-61.
- Dams R, Murphy CM, Lambert WE, Huestis MA. *Urine drug testing for opioids, cocaine, and metabolites by direct injection liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Comm Mass Spect, 17 (2003) 1665-1670.
- De Brabanter N, Van Gansbeke W, Hooghe F, Van Eenoo P. *Fast quantification of 11-nor-D9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCA) using microwave-accelerated derivatisation and gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry*. Forensic Sci Int, 224 (2013) 90-95.

- De Jager AD, Bailey NL. *Online extraction LC-MS/MS method for the simultaneous quantitative confirmation of urine drugs of abuse and metabolites: amphetamines, opiates, cocaine, cannabis, benzodiazepines and methadone*. J Chromatogr B, 879 (2011) 2642-2652.
- Deng C, Yao N, Wang B, Zhang X. *Development of microwave-assisted extraction followed by headspace single-drop microextraction for fast determination of paeonol in traditional Chinese medicines*. J Chromatogr A, 1103 (2006) 15-21.
- Desrosiers NA, Betit CC, Watterson JH. *Microwave-assisted extraction in toxicological screening of skeletal tissues*. Forensic Sci Int, 188 (2009) 23-30.
- Dolejsova J, Solich P, Polydorou CK, Koupparis MA, Efstathiou CE. *Flow-injection fluorimetric determination of 1,4-benzodiazepines in pharmaceutical formulations after acid hydrolysis*. J Pharm Biomed Anal, 20 (1999) 357-362.
- Dordevic S, Kilibarda V. *Analytical confirmation of lethal heroin overdose by the use of liquid chromatography methods*. Vojnosanit Pregl, 64 (2007) 739-743.
- Drummer OH. *Review methods for the measurement of benzodiazepines in biological samples*. J Chromatogr B, 713 (1998) 201-225.
- Duer WC, Spitz DJ, McFarland S. *Relationships between concentrations of cocaine and its hydrolysates in peripheral blood, heart blood, vitreous humor and urine*. J Forensic Sci, 51 (2006) 421-425.
- Dussy F, Hamberg C, Briellman T. *Quantification of benzodiazepines in whole blood and serum*. J Leg Med, 120 (2006) 323-330.
- Edwards SR, Smith MT. *Simultaneous determination of morphine, oxycodone, morphine-3-glucuronide, and noroxycodone concentrations in rat serum by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B, 814 (2005) 241-249.
- Eeckhoudt SL, Desager J, Horsmans Y, De Winne AJ, Verbeeck RK. *Sensitive assay for midazolam and its metabolite 1-hydroxymidazolam in human plasma by capillary high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr B, 710 (1998) 165-171.
- El Mahjoub A, Staub C. *High-performance liquid chromatographic method for the determination of benzodiazepines in plasma or serum using the column-switching technique*. J Chromatogr B, 742 (2000) 381-390.
- El Mahjoub A, Staub C. *Semiautomated high-performance liquid chromatographic method for the determination of benzodiazepines in whole blood*. J Anal Toxicol, 25 (2001) 209-214.
- El Mahjoub A, Staub C. *Simultaneous determination of benzodiazepines in whole blood or serum by HPLC/DAD with a semi-microcolumn*. J Pharm Biomed Anal, 23 (2000) 447-458.
- El-Gizawy SM. *Simultaneous determination of diazepam, oxazepam and temazepam in spiked urine by HPLC*. Anal Letters, 33(4) (2000) 629-638.
- Elliott SP, Hale KA. *Applications of an HPLC-DAD drugs screening system based on retention indices and UV spectra*. J Anal Toxicol, 22 (1998) 279-289.
- Escohotado A. *Historia general de las drogas*. 1ª Ed, Espasa Calpe, Madrid, 1998.
- Eskilsson CS, Björklund E, Mathiasson L, Karlsson L, Tortensson A. *Microwave assisted extraction of felodipine tablets*. J Chromatogr A, 840 (1999) 59-70.

Esteve-Romero J, Carda-Broch S, Gil-Agust M, Capella-Peiro M, Bose D. *Micellar liquid chromatography for the determination of drug materials in pharmaceutical preparations and biological samples*. Trends Anal Chem, 24 (2005) 75-91.

Favreto WAJ, Pinto AMP, Manfio JL, Hoss I, Pristich MC, Bordignon SF. *Development and Validation of an Ultra-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry Bioanalytical Method for Quantifying Clonazepam in Human Plasma*. J AOAC Int, 96 (2013) 745-750.

Fernández P, González C, Pena MT, Carro AM, Lorenzo RA. *A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples*. Anal Chim Acta, 767 (2013) 88-96.

Fernández P, Lafuente N, Bermejo AM, López-Rivadulla M, Cruz A. *HPLC determination of cocaine and benzoilecgonine in plasma and urine from drugs abusers*. J Anal Toxicol, 20 (1996) 224-228.

Fernández P, Lago M, Álvarez I, Carro AM, Lorenzo RA. *Chromatographic Determination of six Benzodiazepines in Vitreous Humor after Microwave-Assisted Extraction*. Anal Methods, 5 (2013) 4999-5004.

Fernández P, Lago M, Lorenzo RA, Carro AM, Bermejo AM, Tabernero MJ. *Microwave-assisted extraction and HPLC-DAD determination of drugs of abuse in human plasma*. J Anal Toxicol, 31 (2007) 388-393.

Fernández P, Lago M, Lorenzo RA, Carro AM, Bermejo AM, Tabernero MJ. *Microwave-assisted extraction of drugs of abuse from human urine*. J Appl Toxicol, 27 (2007) 373-379.

Fernández P, Lago M, Lorenzo RA, Carro AM, Bermejo AM, Tabernero MJ. *Optimisation of a rapid microwave-assisted extraction method for the simultaneous determination of opiates, cocaine and their metabolites in human hair*. J Chromatogr B, 877 (2009) 1743-1750.

Fernández P, Morales L, Vázquez C, Bermejo AM. *HPLC-DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma*. Forensic Sci Int, 161 (2006) 31-35.

Fernández P, Morales L, Vázquez C, Lago M, Bermejo AM. *Comparison of two extraction procedures for determination of drugs of abuse in human saliva by high-performance liquid chromatography*. J Applied Toxicol, 28 (2008) 998-1003.

Fernández P, Rodríguez P, Bermejo AM, López-Rivadulla M, Cruz A. *Simultaneous determination of cocaine and benzoylecgonine in vitreous humor by HPLC*. J Liq Chromatogr, 17 (1994) 883-890.

Fernández P, Seoane S, Vázquez C, Bermejo AM, Carro AM, Lorenzo RA. *A rapid analytical method based on microwave-assisted extraction for the determination of drugs of abuse in vitreous humor*. Anal Bioanal Chem, 401 (2011) 2177-2186.

Fernández P, Vázquez C, Lorenzo RA, Carro AM, Alvarez I, Cabarcos P. *Experimental design for optimization of microwave-assisted extraction of benzodiazepines in human plasma*. Anal Bioanal Chem, 397 (2010a) 677-685.

Fernandez P, Vazquez C, Lorenzo RA, Carro AM, Bermejo AM. *Development of a Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Six Benzodiazepines in Human Plasma after Solid-Phase-extraction*. Anal Letters, 43 (2010b) 1075-1084.

- Fernández P, Vázquez C, Morales L, Bermejo AM. *Analysis of opiates, cocaine and metabolites in urine by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD)*. J Appl Toxicol, 25 (2005) 200-204.
- Ferrara SD, Tedeschi L, Frison G, Castagna F. *Solid-phase extraction and HPLC-UV confirmation of drugs of abuse in urine*. J Anal Toxicol, 16 (1992) 217-222.
- Ferreirós N, Labocha S, Walter C, Lötsch J, Geisslinger G. *Simultaneous and sensitive LC-MS/MS determination of tetrahydrocannabinol and metabolites in human plasma*. Anal Bioanal Chem, 405 (2013) 1399-1406.
- Foulon C, Menet MC, Manuel N, Pham-Huy C, Galons H, Claude JR, Guyon F. *Rapid analysis of benzoylecgonine, cocaine and cocaethylene in urine, serum and saliva by isocratic high performance liquid chromatography with diode array detection*. Chromatographia, 50 (1999) 721-727.
- Fox EJ, Twigger S, Allen KR. *Criteria for opiate identification using liquid chromatography linked to tandem mass spectrometry: problems in routine practice*. Ann Clin Biochem, 46 (2009) 50-57.
- Franke M, Winek CL, Kingston HM. *Extraction of selected drugs from serum using microwave irradiation*. Forensic Sci Int, 81 (1996) 51-59.
- Gaillard Y, Pepin G. *Screening and identification of drugs in human hair by high-performance liquid chromatography-photodiode-array UV detection and gas chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction. A powerful tool in forensic medicine*. J Chromatogr A, 762 (1997) 251-267.
- Gambelunghe C, Rossi R, Ferranti C, Rossi R, Bacci M. *Hair analysis by GC/MS/MS to verify abuse of drugs*. J Applied Toxicol, 25 (2005) 205-211.
- Ganzler K, Salgó A, Valkó K. *Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography*. J Chromatogr, 371 (1986) 299-306.
- Ganzler K, Szinai I, Salgó A. *Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique*. J Chromatogr, 520 (1990) 257-262.
- Gergov M, Nokua P, Vuoni E, Ojamperä I. *Simultaneous screening and quantification of 25 opioid drugs in post-mortem blood and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Forensic Sci Int, 186 (2009) 36-43.
- Gioino G, Hansen C, Pacchioni A, Rocca F, Barrios SM, Brocca E, Cancela LM. *Use of high-performance liquid chromatography with diode-array detection after a primary drug screening in patients admitted to the emergency department*. Ther Drug Monit, 25 (2003) 99-106.
- Giroud C, Michaud K, Sporkert F, Eap C, Augsburger M, Cardinal P, Mangin P. *A fatal overdose of cocaine associated with coingestion of marijuana, buprenorphine, and fluoxetine. Body fluid and tissue distribution of cocaine and its metabolites determined by hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry (HILIC-MS)*. J Anal Toxicol, 28 (2004) 464-474.
- Grogg-Sulser K, Helmlin H-J, Clerc J-T. *Qualitative and quantitative determination of illicit heroin street samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography: method development by CARTAGO-S*. J Chromatogr A, 692 (1995) 121-129.

- Guale F, Shahreza S, Walterscheid JP, Chen H-H, Arndt C, Kelly AT, Mozayani A. *Validation of LC-TOF-MS Screening for Drugs, Metabolites, and Collateral Compounds in Forensic Toxicology Specimens*. *J Anal Toxicol*, 37 (2013) 17-24.
- Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P. *Determination of 14 benzodiazepines and hydroxy metabolites, zaleplon and zolpidem as tert-butyldimethylsilyl derivatives compared with other common silylating reagents in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry*. *J Chromatogr B*, 818 (2005) 175-189.
- Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P. *Validated toxicological determination of 30 drugs of abuse as optimized derivatives in oral fluid by long column fast gas chromatography/electron impact mass spectrometry*. *J Mass Spectrom*, 40 (2005) 739-753.
- Gunnar T, Lillsunde P. *Fast gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry with microscale volume sample preparation for the determination of benzodiazepines and α -hydroxy metabolites, zaleplon and zopiclone in whole blood*. *J Mass Spectrom*, 41 (2006) 741-754.
- Gunnar T, Mykkänen S, Ariniemi K, Lillsunde P. *Validated semiquantitative/quantitative screening of 51 drugs in whole blood as silylated derivatives by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry and gas chromatography electron capture detection*. *J Chromatogr B*, 806 (2004) 205-219.
- Gustavsson E, Andersson M, Stephansson N, Beck O. *Validation of direct injection electrospray lc-ms/ms for confirmation of opiates in urine drug testing*. *J Mass Spect*, 42 (2007) 881-889.
- Hackett J, Elian AA. *Extraction and analysis of flunitrazepam/7-aminoflunitrazepam in blood and urine by LC-PDA and GC-MS using butyl spe columns*. *Forensic Sci Int*, 157 (2006) 156-162.
- Hall MA, Robinson CA, Brisie RM. *High-performance liquid chromatography of alprazolam in postmortem blood using solid-phase extraction*. *J Anal Toxicol*, 19 (1995) 511-513.
- Harkey MR, Henderson GL, Zhou C. *Simultaneous quantitation of cocaine and its major metabolites in human hair by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry*. *J Anal Toxicol*, 15 (1991) 260-265.
- He W, Parissis N, Kiratzidis T. *Determination of benzodiazepines in forensic samples by HPLC with photodiode array detection*. *J Forensic Sci*, 43(5) (1998) 1061-1067.
- He W, Parissis N. *Simultaneous determination of flunitrazepam and its metabolites in plasma and urine by HPLC/DAD after solid phase extraction*. *J Pharm Biomed Anal*, 16 (1997) 707-715.
- Henderson GL, Harkey MR, Zhou C, Jones RT. *Cocaine and metabolite concentrations in the hair of South American coca chewers*. *J Anal Toxicol*, 16 (1992) 199-201.
- Hill DW, Kind AJ. *Reversed phase solvent gradient high performance liquid chromatography retention indexes of drugs*. *J Anal Toxicol*, 18 (1994) 104-109.
- Hold KM, Wilkins DG, Rollins DE, Joseph RE, Cone EJ. *Simultaneous quantitation of cocaine, opiates and their metabolites in human hair by positive ion chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry*. *J Chromatogr Sci*, 36 (1998) 125-130.

Hoonka S, Bose D, Esteve-Romero J, Durgbanshi A. *Micellar Liquid Chromatography for the Determination of Some Less Prescribed Benzodiazepines*. E-J Chem, 9 (2012) 443-450.

Hsiu-Li S, Min-Tsu L, You-Zung H. *Using the cationic surfactants n-acetyl-n-methylpyrrolidinium bromide and 1-cetyl-3-methylimidazolium bromide for sweeping-micellar electrokinetic chromatography*. J Chromatogr A, 1216 (2009) 5313–5319.

Ishida T, Kudo K, Hayashida M, Ikeda N. *Rapid and quantitative screening method for 43 benzodiazepines and their metabolites, zolpidem and zopiclone in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with a small particle column*. J Chromatogr B, 877 (2009) 2652–2657.

Jager AD de, Warner JV, Henman M, Ferguson W, Hall A. *LC-MS/MS method for the quantitation of metabolites of eight commonly-used synthetic cannabinoids in human urine – An Australian perspective*. J Chromatogr B, 897 (2012) 22-31.

Jagerdeo E, Montgomery MA, Lebeau MA, Sibum M. *An automated SPE/LC/MS/MS method for the analysis of cocaine and metabolites in whole blood*. J Chromatogr B, 874 (2008) 15-20.

Jamdar SC, Pantuck CB, Diaz J, Mets B. *A rapid, sensitive assay for cocaine and its metabolites in biological fluids using solid phase extraction and high performance liquid chromatography*. J Anal Toxicol, 24 (2000) 438-441.

Jang M, Chang H, Yang W, Choi H, Kim E, Yu B-H, Oh Y, Chung H. *Development of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of 25 benzodiazepines and zolpidem in oral fluid and its application to authentic samples from regular drug users*. J Pharm Biomed Anal, 74 (2013) 213-222.

Jeanville PM, Estapé ES, Needham SR, Cole MJ. *Rapid confirmation/quantification of cocaine and benzoilecgonine in urine utilizing high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry*. American Society Mass Spectrom, 11 (2000) 257-263.

Jeanville PM, Estapé ES, Torres Negrón I, Martí A. *Rapid confirmation/quantitation of ecgonine methyl ester, benzoilecgonine, cocaine in urine using on-line extraction coupled with fast HPLC and tandem mass spectrometry*. J Anal Toxicol, 25 (2001) 69-75.

Jenkins AJ, Levine B, Lock JL, Smialek JE. *A fatality due to alprazolam intoxication*. J Anal Toxicol, 21 (1997) 218-220.

Johansen SS, Bhatia HM. *Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B, 852 (2007) 338-344.

Kacinko SL, Barnes AJ, Kim I, Moolchan ET, Wilson L, Cooper GA et al. *Performance characteristics of the Cozart RapiScan oral fluid drug testing system for opiates in comparison to ELISA and GC/MS following controlled codeine administration*. Forensic Sci Int, 141 (2004) 41-48.

Katagi M, Nishikayawa M, Tatsuno M, Miki A, Tsuchihashi H. *Column switching high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry for identification of heroin metabolites in human urine*. J Chromatogr B, 751 (2001) 177-185.

Kintz P, Villain M, Cirimele V, Pépin G, Ludes B. *Windows of detection of lorazepam in urine, oral fluid and hair, with a special focus on drug-facilitated crimes*. Forensic Sci Int, 145 (2004) 131-135.

Kleinschnitz M, Herderich M, Schreier P. *Determination of 1,4-benzodiazepines by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry.* J Chromatogr B, 676 (1996) 61-67.

Klingmann A, Skoop G, Aderjan R. *Analysis of cocaine, benzoilecgonine, ecgonine methyl ester, and ecgonine by high-pressure liquid chromatography-API Mass Spectrometry and application a short-term degradation study of cocaine in plasma.* J Anal Toxicol, 25 (2001) 425-430.

Koves EM. *Use of high performance liquid chromatography diode array detection in forensic toxicology.* J Chromatogr B, 692 (1995) 103-119.

Kratzsch C, Tenberken O, Peters FT, Weber AA, Kraemer T, Maurer HH. *Screening, library-assisted identification and validated quantification of 23 benzodiazepines, flumazenil, zaleplone, zolpidem and zopiclone in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization.* J Mass Spect, 39 (2004) 856-872.

Kriikku P, Wilhelm L, Rintatalo J, Hurme J, Kramer J, Ojanpera I. *Phenazepam abuse in Finland: Findings from apprehended drivers, post-mortem cases and police confiscations.* Forensic Sci Int, 220 (2012) 111-117.

Kroener L, Musshoff F, Madea B. *Evaluation of immunochemical drug screenings of whole blood Samples. A retrospective optimization of cut-off levels alter confirmation-analysis on GC-MS and HPLC-DAD.* J Anal Toxicol, 27 (2003) 205-212.

Kunicki PK. *Simple and sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of 1,5-benzodiazepine clobazam and its active metabolite n-desmethylclobazam in human serum and urine with application to 1,4-benzodiazepines analysis.* J Chromatogr B, 750 (2001) 41-49.

Lai C-K, Lee T, Au K-M, Chan AY-W. *Uniform solid-phase extraction procedure for toxicological drug screening in serum and urine by HPLC with photodiode-array detection.* Clin Chem, 43 (1997) 312-325.

Laloup M, Ramirez M, Wood M, Maes V. *Detection of diazepam in urine, hair and preserved oral fluid samples with LC-MS-MS after single and repeated administration of myolastan® and valium®.* Anal Bioanal Chem, 388 (2007) 1545-1556.

Lambert WE, Meyer E, De Leeheer AP. *Systematic toxicological analysis of basic drugs by gradient elution of an alumina-based HPLC packing material under alkaline conditions.* J Anal Toxicol, 19 (1995) 73-78.

Langman LJ, Bjergum MW, Williamson CL, Crow FW. *Sensitive method for detection of cocaine and associated analytes by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in urine.* J Anal Toxicol, 33 (2009) 447-455.

Larsen AKJr, Tebbett IR. *Direct analysis for cocaine in urine by high performance liquid chromatography using a column switching technique.* J Forensic Sci, 37(2) (1992) 636-639.

Larsen HS, Chin PK, Begg EJ, Jensen BP. *Quantification of total and unbound concentrations of lorazepam, oxazepam and temazepam in human plasma by ultrafiltration and LC-MS/MS.* Bioanalysis, 3 (2011) 843-852.

Lau CE, Ma F, Falk JL. *Simultaneous determination of cocaine and its metabolites with caffeine in rat serum microsamples by high performance liquid chromatography.* J Chromatogr, 532 (1990) 95-103.

- Laurito T, Mendes G, Santagada V, Caliendo G. *Bromazepam determination in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: A highly sensitive and specific tool for bioequivalence studies*. *J Mass Spect*, 39 (2004) 168-176.
- Le Guellec C, Gaudet ML, Breteau M. *Improved selectivity for high-performance liquid chromatographic determination of clonazepam in plasma of epileptic patients*. *J Chromatogr B*, 719 (1998) 227-233.
- Le Solleu H, Demontes-Mainard F, Vinçon G, Bannwarth B. *The determination of bromazepam in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography*. *J Pharm Biomed Anal*, 11(8) (1993) 771-775.
- Lee XP, Kumazawa T, Sato J, Shoji Y, Hasegawa C, Karibe C, Arinobu T, Seno H, Sato K. *Simple method for the determination of benzodiazepines in human body fluids by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry*. *Anal Chim Acta*, 492 (2003) 223-231.
- Li S, Genperline PJ, Briley K, Kazmierczak S. *Identification and quantification of drugs of abuse in urine using the generalized rank annihilation method of curve resolution*. *J Chromatogr B*, 655 (1994) 213-223.
- Lin HR, Chen CL, Huang CL, Chen ST, Lua AC. *Simultaneous determination of opiates, methadone, buprenorphine and metabolites in human urine by superficially porous liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr B*, 925 (2013) 10-15.
- Logan BK, Smirnow D. *Lack of predictable site-dependent differences and time-dependent changes in post-mortem concentrations of cocaine, benzoilecgonine and cocaethylene in humans*. *J Anal Toxicol*, 20 (1997) 23-31.
- Logan BK, Stafford DT, Tebbet IR, Moore CM. *Rapid screening for 100 basic drugs and metabolites in urine using cation exchange solid-phase extraction and high performance liquid chromatography with diode array detection*. *J Anal Toxicol*, 14 (1990) 154-159.
- Low AS, Taylor RB. *Analysis of common opiates and heroin metabolites in urine by high performance liquid chromatography*. *J Chromatogr B*, 663 (1995) 225-233.
- Ma F, Zhang J, Lau CE. *Determination of cocaine and its metabolites in serum microsamples by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetics in rats*. *J Chromatogr B*, 693 (1997) 307-312.
- Maralíková B, Weinmann W. *Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification*. *J Chromatogr B*, 811 (2004) 21-30.
- Marchi I, Schappler J, Veuthey JL, Rudaz S. *Development and validation of a liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry method for the quantification of alprazolam, flunitrazepam, and their main metabolites in haemolysed blood*. *J Chromatogr B*, 877 (2009) 2275-2283.
- Mazzarino M, Riggi S, de la Torre X, Botrè F. *Speeding up the process urine sample pre-treatment: Some perspectives on the use of microwave assisted extraction in the anti-doping field*. *Talanta*, 81 (2010) 1264-1272.
- Menezes ML, Muzardo GA, Chaves MS. *Determination of Cocaine in Samples of Hair Using the Chromatographic Column, ISRP-C18*. *J Liq Chrom & Rel Technol*, 27 (2004) 1799-1809.

- Mercolini L, Mandrioli R, Amore M, Raggi MA. *Separation and HPLC analysis of 15 benzodiazepines in human plasma*. J Sep Sci, 31 (2008) 2619–2626.
- Mercolini L, Mandrioli R, Giannello C. *Simultaneous analysis of diazepam and its metabolites in rat plasma and brain tissue by HPLC-UV and SPE*. Talanta, 80 (2009) 279–285.
- Mikami E, Goto T, Ohno T, Kanamori H. *Simultaneous analysis of seven benzodiazepines in dietary supplements as adulterants using high performance liquid chromatographic and its application to an identification system for diazepam*. J Health Sci, 51(3) (2005) 278–283.
- Ming DS, Heathcote J. *A rapid and accurate UPLC/MS/MS method for the determination of benzodiazepines in human urine*. J Chromatogr B, 879 (2011) 421–428.
- Miyaguchi H, Inoue H. *Determination of amphetamine-type stimulants, cocaine and ketamine in human hair by liquid chromatography/linear ion trap–Orbitrap hybrid mass spectrometry*. Analyst, 136 (2011) 3503–3511.
- Miyaguchi H. *Determination of zolpidem in human hair by micropulverized extraction based on the evaluation of relative extraction efficiency of seven psychoactive drugs from an incurred human hair specimen*. J Chromatogr A, 1293 (2013) 28–35.
- Moore KA, Wernwr C, Zannelli RM, Levine B, Smiyh ML. *Screening postmortem blood and tissues for nine classes of drugs of abuse using automated microplate immunoassay*. Forensic Sci Int, 106 (1999) 93–102.
- Morini L, Vignali C, Polla M, Sponta A, Groppi A. *Comparison of extraction procedures for benzodiazepines determination in hair by LC–MS/MS*. Forensic Sci Int, 218 (2012) 53–56.
- Mortier KA, Maudens KE, Lambert WE, Clauwaert KM, Van Bocxlaer JF, Deforce DL, Van Peteghem CH, De Leenheer AP. *Simultaneous, quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*. J Chromatogr B, 779 (2002) 321–330.
- Mubhoff F, Daldrup T. *A rapid solid-phase extraction and HPLC/DAD procedure for the simultaneous determination and quantification of different benzodiazepines in serum, blood and post-mortem blood*. Int J Leg Med, 105 (1992) 105–109.
- Muchohi SN, Ogutu BR, Newton CRJ, Kokwaro GO. *High-performance liquid chromatographic determination of diazepam in plasma of children with severe malaria*. J Chromatogr B, 761 (2001) 255–259.
- Mullett WM, Pawliszyn J. *Direct determination of benzodiazepines in biological fluids by restricted-access solid-phase microextraction*. Anal Chem, 74 (2002) 1081–1087.
- Mullett WM, Pawliszyn J. *Direct LC analysis of five benzodiazepines in human urine and plasma using an ADS restricted access extraction column*. J Pharm Biomed Anal, 26 (2001) 899–908.
- Murphy CM, Huestis MA. *LC–ESI-MS/MS analysis for the quantification of morphine, codeine, morphine-3- β -d-glucuronide, morphine-6- β -d-glucuronide, and codeine-6- β -d-glucuronide in human urine*. J Mass Spect, 40 (2005) 1412–1416.
- Musshoff F, Trafkowski J, Kuepper U, Madea B. *An automated and fully validated LC-MS/MS procedure for the simultaneous determination of 11 opioids used in palliative care, with 5 of their metabolites*. J Mass Spect, 41 (2006) 633–640.

- Nakamura M, Ohmori T, Itoh Y, Terashita M and Hirano K. *Simultaneous determination of benzodiazepines and their metabolites in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a high-resolution octadecyl silica column compatible with aqueous compounds*. Biomed Chromatogr, 23 (2009) 357–364.
- Nakamura M. *Analyses of benzodiazepines and their metabolites in various biological matrices by LC-MS/MS*. Biomed Chromatogr, 25 (2011) 1283–1307.
- Napoletano S, Montesano C, Compagnone D, Curini R, D’Ascenzo G, Roccia C, Sergi M. *Determination of illicit drugs in urine and plasma by Micro-SPE followed by HPLC–MS/MS*. Chromatographia, 75 (2012) 55–63.
- Nasir Uddin M, Samanidou V, Papadoyannis I. *Development and validation of an HPLC method for the determination of benzodiazepines and tricyclic antidepressants in biological fluids after sequential SPE*. J Sep Sci, 31 (2008a) 2358-2370.
- Nasir Uddin M, Samanidou V, Papadoyannis I. *Validation of SPE-HPLC determination of 1,4-benzodiazepines and metabolites in blood, plasma, urine and saliva*. J Sep Sci, 31 (2008b) 3704-3717.
- Nasir Uddin MN, Samanidou VF, Papadoyannis IN. *Simultaneous Determination of 1,4-Benzodiazepines and Tricyclic Antidepressants in Saliva after Sequential SPE Elution by the Same HPLC Conditions* J Chin Chem Soc, 58 (2011) 142-154.
- Needham SR, Jeanville PM, Brown PR, Estapé ES. *Performance of a pentafluorophenylpropyl stationary phase for the electrospray ionization high performance liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry assay of cocaine and its metabolite ecgonine methyl ester in human urine*. J Chromatogr B, 748 (2000) 77-87.
- Neue UD, Kele M, Bunner B, Kromidas A, Dourdeville T, Mazzeo JR, Grumbach ES, Serpa S, Wheat TE, Hong P, Gilar M. *Ultrapformance liquid chromatography technology and applications*. Advances in Chromatography, 48 (2010) 99–143.
- Nikolaou PD, Papoutsis II, Atta-Politou J, Athanaselis SA, Spiliopoulou CA, Calokerinos AC et al. *Validated method for the simultaneous determination of methadone and its main metabolites (EDDP and EMDP) in plasma of umbilical cord blood by gas chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr B, 867 (2008) 219-225.
- Oberacher H, Schubert B, Libiseller K, Schweissgut A. *Detection and identification of drugs and toxicants in human body fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry under data-dependent acquisition control and automated database search*. Anal Chim Acta, 770 (2013) 121-131.
- Oertel R, Pietsch J, Arenza N, Zeitzb SG, Goltza L, Kirch W. *Distribution of metoprolol, tramadol, and midazolam in human autopsy material*. J Chromatogr A, 1218 (2011) 4988–4994.
- Pan WJ, Hedaya MA. *Sensitive and specific high-performance liquid chromatographic assay with ultraviolet detection for the determination of cocaine and its metabolites in rat plasma*. J Chromatogr, 703 (1997) 129-138.
- Panderi I, Archontaki H, Gikas E, Parissi-Poulou M. *Acidic hydrolysis of bromazepam studied by high performance liquid chromatography. Isolation and identification of its degradation products*. J Pharm Biomed Anal, 17 (1998) 327-335.

- Papini O, Bertucci C, Pereira da Cunha S, Guinaim dos Santos NA, Lanchote VL. *Quantitative assay of lorazepam and its metabolite glucuronide by reverse-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry in human plasma and urine samples*. J Pharm Biomed Anal, 40 (2006) 389-396.
- Papoutsis II, Sotirios AA, Panagiota ND, Pistos CM, Spiliopoulou CA, Maravelias C. *Development and validation of an EI-GC-MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood: applications in clinical and forensic toxicology*. J Pharm Biomed Anal, 52 (2010) 609-614.
- Paré JRJ, Belanger JMR. *Microwave assisted process (MAP): a new tool for the analytical laboratory*. Trends Anal Chem, 13 (1994) 176-184.
- Pérez-Lozano P, García-Montoya E, Orriols A, Miñarro M. *Development and validation of a new HPLC analytical method for the determination of alprazolam in tablets*. J Pharm Biomed Anal, 34 (2004) 979-987.
- Phillips DL, Tebbett IR, Bertholf RL. *Comparison of HPLC and GC-MS for measurement of cocaine and metabolites in human urine*. J Anal Toxicol, 20 (1996) 305-308.
- Pichini S, Altieri I, Pellegrini M, Pacifici R, Zuccaro P. *Analysis of opiates in human hair by high-performance liquid chromatography*. J Liq Chromatogr & Rel Technol, 22 (1999) 873-884.
- Pirnay S, Ricordel I, Libong D, Bouchonnet S. *Sensitive method for the detection of 22 benzodiazepines by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 954 (2002) 235-245.
- Pistos C, Stewart T. *Direct injection HPLC method for the determination of selected benzodiazepines in plasma using a hisep column*. J Pharm Biomed Anal, 33 (2003) 1135-1142.
- Portier EJG, De Blok K, Butter JJ, Van Boxtel CJ. *Simultaneous determination of fentanyl and midazolam using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*. J Chromatogr B, 723 (1999) 313-318.
- Proença P, Franco JM, Mustra C, Monteiro C, Costa J, Corte-Real F, Vieira DN. *UPLC-MS/MS determination in blood of a mixed-drug fatal intoxication: A case report*. Forensic Sci Int, 227 (2013) 85-89.
- Proença P, Teixeira H, Pinheiro J, Marques EP, Vieira DN. *Forensic intoxication with clobazam: HPLC/DAD/MSD analysis*. Forensic Sci Int, 143 (2004) 205-209.
- Puopolo PR, Pothier ME, Volpicelli SA, Flood JG. *Single procedure for detection, confirmation and quantification of benzodiazepines in serum by liquid chromatography with photodiode-array detection*. Clin Chem, 37 (1991) 701-706.
- Quintela O, Cruz A, De Castro A, Concheiro M, López-Rivadulla M. *Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of nine selected benzodiazepines in human plasma and oral fluid*. J Chromatogr B, 825 (2005) 63-71.
- Ramirez-Fernandez MM, Wille SMR, Kummer N, Di Fazio V, Ruyssinckx E, Samyn N. *Quantitative analysis of 26 opioids, cocaine, and their metabolites in human blood by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Ther Drug Monit, 35 (2013) 510-521.

- Ranjbari E, Golbabanezhad-Azizi AA, Hadjmohammadi MR. *Preconcentration of trace amounts of methadone in human urine, plasma, saliva and sweat samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography*. *Talanta*, 94 (2012) 116-122.
- Rees KA, McLaughlin PA, Osselton MD. *Validation of a Gas Chromatography-Ion Trap-Tandem Mass Spectrometry assay for the simultaneous quantification of cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene, morphine, codeine and 6-acetylmorphine in aqueous solution, blood and skeletal muscle tissue*. *J Anal Toxicol*, 36 (2012) 1-11.
- Remane D, Meyer MR, Wissenbach DK, Maurer HH. *Ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric multi-analyte procedure for target screening and quantification in human blood plasma: validation and application for 31 neuroleptics, 28 benzodiazepines, and z-drugs*. *Anal Bioanal Chem*, 401 (2011) 1341-1352.
- Reuschel SA, Smith FP. *Benzoylecgonine (cocaine metabolite) detection in hair samples of jail detained, using radioimmunoassay (RIA) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)*. *J Forensic Sci*, 36 (1991) 1179-1185.
- Rivera HM, Walker GS, Sims DN, Stockham PC. *Application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of benzodiazepines in blood*. *Eur J Mass Spectrom*, 9 (2003) 599-607.
- Rofael HZ, Abdel-Rahman MS. *Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of cocaine, its metabolites and ketamine*. *J Appl Toxicol*, 22 (2002) 123-128.
- Romano G, Barbera N, Spadaro G, Valenti V. *Determination of drugs of abuse in hair: evaluation of external heroin contamination and risk of false positives*. *Forensic Sci Int*, 131 (2003) 98-102.
- Romolo FS, Rotolo MC, Palmi I, Pacifici R, López A. *Optimized conditions for simultaneous determination of opiates, cocaine and benzoylecgonine in hair samples by GC-MS*. *Forensic Sci Int*, 138 (2003) 17-26.
- Rook EJ, Hillebrand JX, Rosing H, Van Ree JM, Beijnen JH. *The quantitative analysis of heroin, methadone and their metabolites and the simultaneous detection of cocaine, acetylcodeine and their metabolites in human plasma by high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr B*, 824 (2005) 213-221.
- Roskar M, Sollner D. *Determination of benzodiazepines in urine via benzophenone derivatives using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Arh Hig Toksikol*, 61 (2010) 381-388.
- Rouini MR, Ardakani Y, Moghaddam K, Solatani F. *An improved hplc method for rapid quantitation of diazepam and its major metabolites in human plasma*. *Talanta*, 75 (2008) 671-676.
- Rust KY, Baumgartner MR, Meggiolaro N, Kraemer T. *Detection and validated quantification of 21 benzodiazepines and 3 "z-drugs" in human hair by LC-MS/MS*. *Forensic Sci Int*, 215 (2012) 64-72.

Salem AA, Barsoum BN, Izake EL. *Determination of bromazepam and clonazepam in pure and pharmaceutical dosage forms using chloranil as a charge transfer complexing agent.* Anal Letters, 35 (2002) 1631-1648.

Salem AA, Barsoum BN, Izake EL. *Potentiometric determination of diazepam, bromazepam and clonazepam using solid contact ion-selective electrodes.* Anal Chim Acta, 498 (2003) 79-91.

Salomone A, Gerace E, Brizio P, Gennaro MC, Vincenti M. *A fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine. Validation and application to real cases of forensic interest.* J Pharm Biomed Anal, 56 (2011) 582-591.

Samanidou V, Pechlivanidou A, Papadoyannis I. *Development of a validated HPLC method for the determination of four 1,4-benzodiazepines in human biological fluids.* J Sep Sci, 30 (2007) 679-687.

Samanidou V, Uddin MN, Papadoyannis IN. *Review benzodiazepines: sample preparation and HPLC methods for their determination in biological samples.* Bioanalysis, 1 (2009) 755-784.

Sandberg JA, Olsen GD. *Microassay for the simultaneous determination of cocaine, norcocaine, benzoylecgonine and benzoynorecgonine by high performance liquid chromatography.* J Chromatogr, 525 (1990) 113-121.

Sauve EN, Langødegård M, Ekeberg D, Øiestad AML. *Determination of benzodiazepines in ante-mortem and post-mortem whole blood by solid-supported liquid–liquid extraction and UPLC–MS/MS.* J Chromatogr B, 883–884 (2012) 177–188.

Schaefer N, Peters B, Schmidt P, Ewald AH. *Development and validation of two LC-MS/MS methods for the detection and quantification of amphetamines, designer amphetamines, benzoylecgonine, benzodiazepines, opiates, and opioids in urine using turbulent flow chromatography.* Anal Bioanal Chem, 405 (2013) 247–258.

Schänzle G, Li S, Mikus G, Hofmann U. *Rapid, highly sensitive method for the determination of morphine and its metabolites in body fluids by liquid chromatography mass spectrometry.* J Chromatogr B, 721 (1999) 55-65.

Scheidweiler KB, Huestis MA. *Simultaneous Quantification of Opiates, Cocaine, and Metabolites in Hair by LC-APCI-MS/MS.* Anal Chem, 76 (2004) 4358-4363.

Scott KS, Oliver JS. *The use of vitreous humor as an alternative to whole blood for the analysis of benzodiazepines.* J Forensic Sci, 46 (2001) 694-697.

Segura M, Barbosa J, Torrens M, Farré M. *Analytical methodology for the detection of benzodiazepines consumption in opioid-dependent subjects.* J Anal Toxicol, 25 (2001) 130-136.

Sergi M, Compagnone D, Curini R, D'Ascenzo G, Del Carlo M, Napoletano S, Risoluti R. *Micro-solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of stimulants, hallucinogens, ketamine and phencyclidine in oral fluids.* Anal Chim Acta, 675 (2010) 132–137.

Sergi M, Napoletano S, Montesano C, Iofrida R, Curini R, Compagnone D. *Pressurized-liquid extraction for determination of illicit drugs in hair by LC–MS–MS.* Anal Bioanal Chem, 405 (2013) 725–735.

Shakleya DM, Dams R, Choo RE, Jones H, Huestis MA. *Simultaneous liquid chromatography-mass spectrometry quantification of urinary opiates, cocaine, and metabolites in opiate-dependent pregnant women in methadone-maintenance treatment*. J Anal Toxicol, 34 (2010) 17-25.

Simonsen KW, Hermansson S, Steentoft A, Linnet K. *A validated method for simultaneous screening and quantification of twenty-three benzodiazepines and metabolites plus zopiclone and zaleplone in whole blood by liquid-liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Anal Toxicol, 34 (2010) 332-341.

Skender L, Karacic V, Brcic I, Bagaric A. *Quantitative determination of amphetamines, cocaine and opiates in human hair by gas chromatography-mass spectrometry*. Forensic Sci Int, 125 (2002) 120-126.

Smink BE, Brandsma JE, Dijkhuizen A, Lusthof KJ, De Gier JJ, Egberts ACG, Uuges DRA. *Quantitative analysis of 33 benzodiazepines, metabolites and benzodiazepine-like substances in whole blood by liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry*. J Chromatogr B, 811 (2004) 13-20.

Smith FP, Liu RH. *Detection of cocaine metabolite in perspiration stain, menstrual blood-stain, and hair*. J Forensic Sci, 31 (1986) 1269-1273.

Stout PR, Bynum ND, Mitchell JM, Baylor MR, Roper-Miller JD. *A Comparison of the Validity of Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Urine Samples for Morphine, Codeine, 6-Acetylmorphine, and Benzoyllecgonine*. J Anal Toxicol, 33 (2009) 398-408.

Sukbuntherng J, Walters A, Chow HH, Mayerson M. *Quantitative determination of cocaine, cocaethylene (ethylcocaine), and metabolites in plasma and urine by high performance liquid chromatography*. J Pharm Sci, 84 (1995) 799-804.

Tagliaro F, Valentini R, Manetto G, Crivellente F, Carli G, Marigo M. *Hair analysis by using radioimmunoassay, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis to investigate chronic exposure to heroin, cocaine and/or ecstasy in applicants for driving licenses*. Forensic Sci Int, 107 (2000) 121-128.

Tanaka E, Terada M, Misawa S, Wakasugi C. *Simultaneous determination of twelve benzodiazepines in human serum using a new reversed-phase chromatographic column on a 2- μ m porous microspherical silica gel*. J Chromatogr B, 682 (1996) 173-178.

Tatsuno M, Nishikawa MK, Tsuchihashi H. *Simultaneous determination of illicit drugs in human urine by liquid chromatography mass spectrometry*. J Anal Toxicol, 20 (1996) 281-286.

Taylor K, Elliott S. *A validated hybrid quadrupole linear ion-trap LC-MS method for the analysis of morphine and morphine glucuronides applied to opiate deaths*. Forensic Sci Int, 187 (2009) 34-41.

Teixeira HM, Reis F, Proença P, Ramos P, Quintela O, López-Rivadulla M, Marques E, Vieira DN. *Vitreous humor as a complementary sample to blood for the detection / confirmation of diazepam: ante-mortem and post-mortem studies in an animal model*. Human Exp Toxicol, 23 (2004) 571-577.

- Theodoridis G, Papadoyannis I, Tsoukali-Papadopoulou H, Vasilikiotis G. *A comparative study of different solid phase extraction procedures for the analysis of alkaloids of forensic interest in biological fluids by RP-HPLC/Diode Array*. J Liquid Chrom, 18 (1995) 1973-1995.
- Tomita M, Okuyama T. *Application of capillary electrophoresis to the simultaneous screening and quantitation of benzodiazepines*. J Chromatogr B, 678 (1996) 331-337.
- Trachta G, Schwarze B, Sägmüller B, Brehm G. *Combination of high performance liquid chromatography and SERS detection applied to the analysis of drugs in human blood and urine*. J Molecular Structure, 693 (2004) 175-185.
- Tracqui A, Kintz P, Mangin P. *Systematic toxicological analysis using HPLC/DAD*. J Forensic Sci, 40 (1995) 254-262.
- Uhl M. *Tandem mass spectrometry: a helpful tool in hair analysis for the forensic expert*. Forensic Sci Int, 107(1-3) (2000) 169-179
- Valente D, Cassini M, Pigliapochi M, Vansetti G. *Hair as the sample in assessing morphine and cocaine addiction*. Clin Chem, 27 (1981) 1952-1953.
- Verweij MA, Hordijk ML, Lipman P. *Liquid chromatographic-thermospray tandem mass spectrometric quantitative analysis of some drugs with hypnotic, sedative and tranquillising properties in whole blood*. J Chromatogr B, 686 (1996) 27-34.
- Virag L, Mets B, Jamdar S. *Determination of cocaine, norcocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester in rat plasma by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection*. J Chromatogr B, 681 (1996) 263-269.
- Vogliardi S, Favretto D, Tucci M, Stocchero G, Ferrara SD. *Simultaneous LC-HRMS determination of 28 benzodiazepines and metabolites in hair*. Anal Bioanal Chem, 400 (2011) 51-67.
- Walles M, Mullett WM, Pawliszyn J. *Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr A, 1025 (2004) 85-92.
- Wang IT, Feng YT, Chen CY. *Determination of 17 illicit drugs in oral fluid using isotope dilution ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with three atmospheric pressure ionizations*. J Chromatogr B, 878 (2010) 3095-3105.
- Whittington D, Kharasch ED. *Determination of morphine and morphine glucuronides in human plasma by 96-well plate solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry*. J Chromatogr B, 796 (2003) 95-103.
- Wietecha-Posłuszny R, Garbacik A, Woźniakiewicz M, Kościelniak P. *Microwave-assisted hydrolysis and extraction of tricyclic antidepressants from human hair*. Anal Bioanal Chem, 399 (2011) 3233-3240.
- Wietecha-Posłuszny R, Woźniakiewicz M, Garbacik A, Chesny P, Kościelniak P. *Application of microwave irradiation to fast and efficient isolation of benzodiazepines from human hair*. J Chromatogr A, 1278 (2013) 22-28.
- Wilhelm M, Battista HJ, Obendorf D. *Selective and sensitive assay for the determination of benzodiazepines by high-performance liquid chromatography with simultaneous ultraviolet and reductive electrochemical detection at the hanging mercury drop electrode*. J Chromatogr, 897 (2000) 215-225.

Williams CL, Laizure SC, Parker RB, Lima JJ. *Quantitation of cocaine and cocaethylene in canine serum by high performance liquid chromatography*. J Chromatogr B, 681 (1996) 271-276.

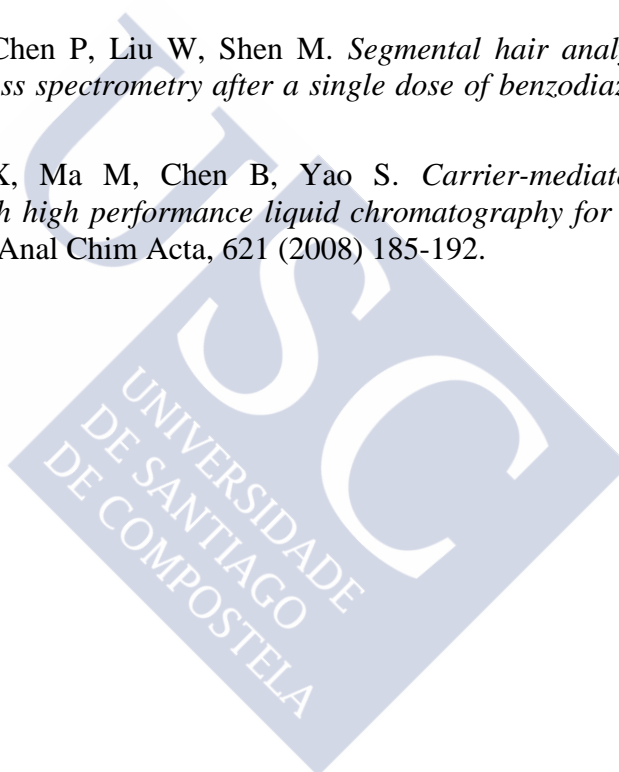
Wohlfarth A, Scheidweiler KB, Chen X, Liu H, Huestis MA. *Qualitative Confirmation of 9 Synthetic Cannabinoids and 20 Metabolites in Human Urine Using LC–MS/MS and Library Search*. Anal Chem, 85 (2013) 3730–3738.

Wood M, Laloup M, Ramírez Fernández MM, Jenkins KM, Young MS, Ramaekers JG, Boeck G, Samyn N. *Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Forensic Sci Int, 150 (2005) 227-238.

Wylie FM, Torrance H, Anderson RA, Oliver JS. *Drugs in oral fluid. Part I. Validation of an analytical procedure for licit and illicit drugs in oral fluid*. Forensic Sci Int, 150 (2005) 191-198.

Xiang P, Sun Q, Shen B, Chen P, Liu W, Shen M. *Segmental hair analysis using liquid chromatography–tandem mass spectrometry after a single dose of benzodiazepines*. Forensic Sci Int, 204 (2011) 19–26.

Zhang Z, Zhang C, Su X, Ma M, Chen B, Yao S. *Carrier-mediated liquid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for determination of illicit drugs in human urine*. Anal Chim Acta, 621 (2008) 185-192.





CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Hoy en día, el consumo de *drogas de abuso* se ha convertido en un grave problema social y de salud pública. En España, se puede apreciar un aumento del número de intoxicaciones por cocaína en los últimos años en contraposición al resto de drogas ilícitas como la heroína, siendo cada vez más importantes las consecuencias de su consumo habitual. Durante los últimos años se ha observado un aumento significativo de las urgencias hospitalarias relacionadas con intoxicaciones por *benzodiazepinas*, porque son fármacos frecuentemente prescritos, de fácil administración y de precios reducidos. La gran variedad presente en el mercado, así como su elevada versatilidad en aplicaciones clínicas, las identifica como una de las familias de medicamentos de mayor uso. Este elevado consumo, unido a la ausencia de un correcto seguimiento de su prescripción, está convirtiendo a las benzodiazepinas en drogas de abuso, con las consecuencias negativas que esto supone.

La *sangre* proporciona una estimación de la concentración actual circulante de los analitos de interés, por tanto es la muestra que mejor correlaciona sus niveles con el efecto farmacológico o tóxico, indicando si el individuo se encuentra bajo la influencia de una determinada sustancia, así como su grado de afectación. Sin embargo, el tiempo de detección de las drogas es muy corto (24-48 horas), por lo que esta muestra es de gran utilidad solo cuando se pretende demostrar un consumo reciente. Tanto los opiáceos como la cocaína se metabolizan rápidamente en el organismo, de ahí la importancia de la investigación analítica conjunta de cada droga y sus principales metabolitos en sangre.

El análisis de *orina* es usado rutinariamente para demostrar el consumo de opiáceos y cocaína en toxicología forense, pues su recogida es cómoda y no invasiva, la detección de drogas de abuso es relativamente fácil hasta pasados varios días de su administración, y presenta menor cantidad de sustancias que pueden interferir en el análisis. Por el contrario, este análisis requiere una supervisión que garantice la no manipulación, no siempre es posible tomar una muestra en un momento determinado, la conservación de la muestra requiere refrigeración o congelación, y no existe una correlación entre las concentraciones de drogas en orina y en sangre. Las drogas se metabolizan rápidamente, excretándose en orina en forma inalterada y como metabolitos, de ahí la importancia de la determinación conjunta de cada droga y sus principales metabolitos en orina.

La *saliva o fluido oral* se considera como una muestra alternativa para medir drogas de abuso porque es fácil de recoger, no invade la privacidad del individuo y contiene mayores concentraciones de las drogas originales frente a sus metabolitos, lo que favorece la identificación de las sustancias consumidas. La transferencia de las drogas desde la sangre a la saliva tiene lugar por difusión pasiva, transporte activo y/o filtración, según su liposolubilidad y su tamaño molecular. Si se favorece el flujo de la saliva, por estimulación mecánica o tomando alguna sustancia ácida, el pH de la saliva puede variar, modificándose así la concentración de las drogas en esta matriz. Puesto que la ventana de detección en saliva es corta (1-2 días), se utiliza únicamente como indicador de consumo reciente; además, los niveles de drogas suelen ser bajos, por lo que se requiere una metodología analítica con una adecuada sensibilidad, tal como la cromatografía líquida propuesta en este trabajo.

El análisis de *pelo* permite conocer el historial de adicción a drogas de un sujeto, durante un período más o menos prolongado, en función de la longitud de los cabellos (su crecimiento aproximado es de 1 cm/mes). La detección de drogas en pelo puede realizarse incluso meses después de su consumo puesto que su unión a la matriz es muy estable, al contrario de lo que sucede con la orina y el plasma. La muestra es recogida preferentemente en la zona occipital del cuero cabelludo porque se ha observado una menor variabilidad en la velocidad de crecimiento, presenta una buena estabilidad y hay posibilidad de una segunda muestra para comparación o contraanálisis. Los resultados de los test de drogas en pelo han sido utilizados en estudios clínicos, forenses y epidemiológicos, investigación histórica e incluso han sido presentados como prueba en tribunales civiles, criminales y militares.

El *humor vítreo* es una muestra bastante utilizada en la actualidad ya que tiene propiedades de las que carecen otras matrices biológicas. En el caso de cuerpos que hayan sufrido shocks hemorrágicos o procesos de descomposición, quemados o embalsamados, es necesario recurrir a fluidos biológicos, que se encuentran en lugares protegidos de la contaminación (líquido cefalorraquídeo, humor vítreo, líquido sinovial y líquido pericárdico). De todos ellos, el humor vítreo es el que presenta más ventajas para determinar diferentes tipos de drogas; su acceso es sumamente fácil, su volumen es suficiente y tiene un bajo contenido proteico, por lo que no está muy influenciado por procesos postmortem. Muchos han sido los esfuerzos para determinar la relación existente entre los niveles de droga en humor vítreo y los correspondientes en sangre, sin poder llegar a una conclusión común y

definitiva para las benzodiazepinas y drogas de abuso; sin embargo es una muestra alternativa muy útil para demostrar el consumo de estas sustancias.

Se han desarrollado nuevos procedimientos de preparación de muestra que proporcionan buenos rendimientos sin excesivo gasto de tiempo y dinero. Hasta la publicación de los trabajos presentados en esta tesis doctoral, la extracción asistida por microondas (MAE) era una técnica muy poco utilizada en el campo de la toxicología forense pero muy extendida en el tratamiento de otras matrices. Nuestra experiencia con las múltiples aplicaciones de la MAE, realizadas para la extracción de drogas de abuso y benzodiazepinas en diferentes matrices biológicas, nos permite demostrar la obtención de unos buenos resultados (recuperaciones y limpieza de la muestra) y confirmar que se trata de una técnica limpia y amable con el medio ambiente, porque se disminuye significativamente el consumo de disolventes orgánicos, el tiempo y por tanto el coste final de los análisis.

La cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos (HPLC-DAD) es una técnica más eficaz si se compara con el radioinmunoensayo (RIA) pues permite diferenciar las drogas de sus metabolitos, y además es más rápida y sencilla si se compara con la cromatografía de gases, en la que es necesaria la derivatización previa de algunas drogas, para su identificación y cuantificación en medios biológicos. Además, los resultados son buenos y comparables con los obtenidos por otras técnicas para la detección de un amplio número de drogas y/o psicofármacos (sin ningún tratamiento químico) en plasma, orina, saliva, pelo y humor vítreo. El uso de este detector aumenta la especificidad y selectividad del método proporcionando el espectro de cada pico cromatográfico.

En la actualidad, es obligado optimizar constantemente las técnicas de preparación de la muestra y de cuantificación de los analitos, con el fin de ahorrar tiempo y costes, siempre que no se reduzcan la sensibilidad y reproducibilidad del método analítico. En consecuencia, se ha planteado este trabajo de investigación, en el que están implicadas diversas matrices biológicas y las drogas de abuso y benzodiazepinas más consumidas en el área sanitaria de Santiago de Compostela.

Los objetivos del trabajo presentado en esta Memoria son:

1- Optimizar y validar cinco métodos de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de red de diodos (HPLC-DAD) para la identificación y determinación de *drogas de abuso* (morfina, 6-acetilmorfina, codeína, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metadona y EDDP) en plasma, orina, saliva y pelo, así como de *benzodiazepinas* (alprazolam, bromacepam, loracepam, lormetacepam, diacepam y tetracepam) en humor vítreo.

2- Desarrollar cinco procesos de extracción asistida por microondas (MAE) para el aislamiento de *drogas de abuso* (morfina, 6-acetilmorfina, codeína, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metadona y EDDP) a partir de plasma, orina, saliva y pelo, así como de *benzodiazepinas* (alprazolam, bromacepam, loracepam, lormetacepan, diacepam y tetracepam) a partir de humor vítreo. Se recurre al uso de diseños experimentales para estudiar la influencia de la identidad y volumen del disolvente extractante, pH, temperatura y tiempo de extracción.

3- Aplicar estos procesos de extracción asistida por microondas, seguidos de la cromatografía líquida con detector de red de diodos (MAE-HPLC/DAD), para la determinación de *drogas de abuso* en muestras reales de plasma, orina, saliva y pelo, así como de *benzodiazepinas* en muestras de humor vítreo, todas ellas procedentes de sujetos consumidores de drogas y/o benzodiazepinas.



CAPÍTULO III
SECCIÓN EXPERIMENTAL.
RESULTADOS Y DISCUSIÓN



III. SECCIÓN EXPERIMENTAL. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

Publicaciones relacionadas:

1- P Fernández, M Lago, RA Lorenzo, AM Carro, AM Bermejo, MJ Tabernero. *Microwave-Assisted Extraction and HPLC-DAD Determination of Drugs of Abuse in Human Plasma*. **J. Anal. Toxicol.** 31: 388-393 (2007).

2- P Fernández, M Lago, RA Lorenzo, AM Carro, AM Bermejo, MJ Tabernero. *Microwave Assisted Extraction of Drugs of Abuse from Human Urine*. **J. Applied Toxicol.** 27: 373-379 (2007).

3- P Fernández, L Morales, C Vázquez, M Lago, AM Bermejo. *Comparison of two Extraction Procedures for Determination of Drugs of Abuse in Human Saliva by High-Performance Liquid Chromatography*. **J. Applied Toxicol.** 28: 998-1003 (2008).

4- P Fernández, M Lago, RA Lorenzo, AM Carro, AM Bermejo, MJ Tabernero. *Optimization of a Rapid Microwave-Assisted Extraction Method for the Simultaneous Determination of Opiates, Cocaine and their Metabolites in Human Hair*. **J. Chromatogr. B** 877: 1743-1750 (2009).

Comunicaciones relacionadas:

1- M Lago, P Fernández, AM Bermejo, MJ Tabernero. *Extracción Asistida por Microondas para la Determinación de Opiáceos, Cocaína y sus Metabolitos en Orina por HPLC-DAD*. **XVI Congreso Español de Toxicología. Cáceres. Septiembre, 2005.**

2- M Lago, P Fernández, AM Bermejo, MJ Tabernero. *Microwave Assisted Extraction and HPLC-DAD Determination of Drugs of Abuse in Human Plasma*. **26th International Symposium on Chromatography (ISC-06). Copenhagen. Agosto, 2006.**

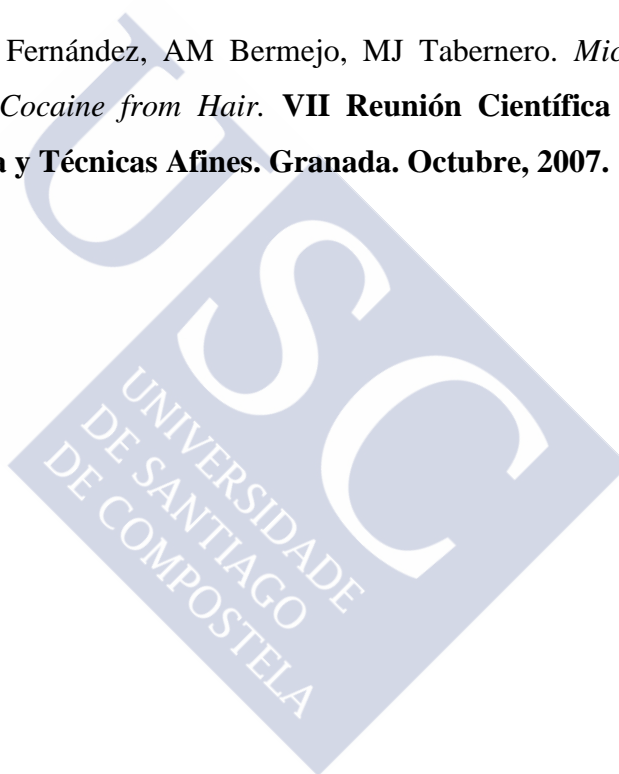
3- M Lago, P Fernández, AM Bermejo, MJ Tabernero. *Estudio de las Intoxicaciones por Consumo de Opiáceos y/o Cocaína en Galicia*. **XVII Congreso Español de Toxicología. Santiago de Compostela. Septiembre, 2007.**

4- M Bermúdez, M Lago, P Fernández, AM Bermejo, MJ Tabernero. *Estudio Preliminar de la Incorporación de Drogas de Abuso en el Pelo*. **XVII Congreso Español de Toxicología. Santiago de Compostela. Septiembre, 2007.**

5- S Seoane, M Lago, P Fernández, AM Bermejo, C Vázquez. *Aplicación de la Extracción Asistida por Microondas para la Determinación de Opiáceos y Cocaína en Humor Vítreo*. **XVII Congreso Español de Toxicología. Santiago de Compostela. Septiembre, 2007.**

6- P Fernández, L Morales, C Vázquez, M Lago, AM Bermejo. *Simultaneous Analysis of Abuse Drugs in Oral Fluid*. **VII Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines. Granada. Octubre, 2007.**

7- M Lago, C Vázquez, P Fernández, AM Bermejo, MJ Tabernero. *Microwave Assisted Extraction of Opiates and Cocaine from Hair*. **VII Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines. Granada. Octubre, 2007.**



III.1.1. Aplicación de la extracción asistida por microondas y la cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos (MAE/HPLC-DAD) para la determinación de drogas de abuso en plasma humano

El objetivo de este trabajo ha sido la optimización de un procedimiento de extracción asistida por microondas y de un método de cromatografía líquida para la separación y determinación simultáneas de drogas de abuso y sus metabolitos más importantes (morfina, 6-acetilmorfina, codeína, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metadona y 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina) en muestras de plasma humano. La heroína y la cocaína son drogas consumidas con fines recreativos por una gran parte de la población española, mientras que la metadona es utilizada en programas de deshabituación al consumo de heroína, hechos que explican el elevado número de intoxicaciones provocadas por todas ellas, y que justifican su elección para ser estudiadas. El plasma es una muestra biológica muy importante en toxicología porque es útil para realizar estudios toxicocinéticos y porque las concentraciones de drogas alcanzadas en la misma guardan una correlación con el estado clínico o la muerte del sujeto. Como la cantidad de muestra es limitada y los niveles plasmáticos de las sustancias suelen tomar valores muy bajos, es necesario poner a punto este método analítico, para que sea suficientemente sensible para su determinación.

La extracción asistida por microondas no necesita una etapa posterior de limpieza y ha demostrado ser un procedimiento simple, rápido y eficaz para ser incorporado en cualquier laboratorio como un método rutinario a utilizar en muestras, cuyo estudio es requerido por hospitales y juzgados, en este caso de Galicia. Una vez seleccionados dos disolventes con una buena afinidad por los analitos, se realizó un *diseño experimental*, estudiando tres factores (uno cualitativo y dos cuantitativos): disolvente (cloroformo y diclorometano), temperatura (50, 75 y 100°C) y tiempo de extracción (1, 5 y 10 minutos). La matriz de experiencias realizada se corresponde con un diseño factorial parcial porque no todos los factores estudiados presentan el mismo número de niveles; por tanto se trata de una matriz asimétrica de $2^1 \cdot 3^2 // 9$ experiencias. Las respuestas cromatográficas obtenidas por HPLC-DAD son representadas en forma de gráficos Pareto, gráficos de efectos totales y análisis bayesiano de los coeficientes, concluyendo que las condiciones óptimas son: cloroformo como disolvente, 75°C como temperatura de extracción y 10 min como tiempo de extracción.

Paralelamente, se ha validado un método de cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos para determinar las drogas de abuso en plasma, optimizando previamente la separación de los analitos mediante la selección de los componentes de la fase móvil, flujo, gradiente y tipo de columna cromatográfica. Los resultados obtenidos son buenos para los objetivos propuestos: la linealidad se cumple en el rango de concentraciones 0.05-2 $\mu\text{g/mL}$ en plasma, y los límites de detección oscilan entre 10 y 40 ng/mL . Se demuestra una buena selectividad, la precisión obtenida siempre es menor de 7.5%, la exactitud se encuentra en el rango 0.1-6.9% y las recuperaciones medias están comprendidas entre 68 y 83%.

Finalmente, se aplicó el método propuesto (MAE/HPLC-DAD) a 20 muestras de plasma de sujetos vivos y a otras 18 procedentes de sujetos muertos, todas ellas recibidas en nuestro laboratorio para su análisis y posterior interpretación toxicológica. Los resultados obtenidos demuestran la utilidad de la determinación conjunta de las drogas en estudio y sus metabolitos. En el primer grupo se detectaron tres consumidores de heroína+cocaína+metadona, cuatro de heroína+metadona, cinco de cocaína+metadona, y seis de heroína+cocaína. En el segundo grupo se encontraron cuatro consumidores de las tres drogas, once de dos drogas y tres de una sola droga.

MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION AND HPLC-DAD DETERMINATION OF DRUGS OF ABUSE IN HUMAN PLASMA

Purificación Fernández^{1,*}, Marta Lago¹, Rosa Antonia Lorenzo², Antonia María Carro², Ana María Bermejo¹, María Jesús Taberero¹

¹ Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Santiago de Compostela, Spain

² Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Santiago de Compostela, Spain

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: imlpuri@usc.es

ABSTRACT

A sample preparation procedure using microwave energy is proposed for the determination of morphine, 6-acetylmorphine, codeine, cocaine, cocaethylene, benzoylecgonine, methadone and 2-ethylene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP) in human plasma. A screening asymmetrical factorial design was used to identify the most suitable extraction conditions as regards solvent, temperature and extraction time. The target drugs were quantified by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. The use of microwave energy was found to reduce solvent consumption and the extraction time compared with solid-phase extraction. The detector response was linear over the drug concentration range 0.05-2.0 µg/mL in human plasma. The precision and accuracy were good, with values less than 8% and 7%, respectively. Drug recoveries from spiked samples ranged from 69 to 81%. The proposed method was successfully applied to a number of forensic cases.

INTRODUCTION

Sample preparation is possibly the most important step of the analytical process inasmuch as it has a direct influence on accuracy, representativeness and precision, and hence a direct impact on the quality of the results. Microwave assisted extraction (MAE) is especially useful with a view to reducing solvent consumption and the preparation time for complex clinical and environmental samples.

The reliability of forensic toxicological analyses depends heavily on appropriate preparation of the samples. There have been major recent developments in extraction

methodology including improved solid-phase extraction (SPE) methods (1-3), and new solid-phase microextraction (SPME) (4-6) and microwave-based methods (7-12). Microwaves constitute a non-ionizing type of radiation spanning the frequency region between radio frequencies and the infrared spectrum. Currently commercially available microwave equipment allows the safe, rapid, selective separation of analytes from complex matrices (*e.g.* the extraction of drugs of abuse from human fluids) at high pressures and temperatures.

This paper reports a new method to prepare human plasma for the determination of morphine, 6-acetylmorphine (6AM), codeine, methadone its metabolite 2-ethylene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP), and cocaine and its metabolites benzoylecgonine (BEG) and cocaethylene, by the use of microwave energy. The operating conditions were selected as regards solvent, temperature and extraction time by using a factorial experimental design.

EXPERIMENTAL

Reagents

Standards of morphine, codeine, 6AM, cocaine, cocaethylene, BEG, methadone and EDDP were supplied by Cerilliant (Round Rock, TX). Gradient-grade acetonitrile, methanol, chloroform and dichloromethane were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Purified water was obtained from a Milli-Q water system from Millipore (Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland).

Plasma samples

Drug-free plasma taken from Transfusion Galician Centre was used for preparation of calibration standards. Plasma samples were obtained from patients on a methadone maintenance program (MMP), patients in legal custody, patients in Galician Hospitals and others from fatally poisoned individuals. They were stored refrigerated at 4°C, unless the analysis was delayed, in which case the samples were frozen at -18°C. All studies were conducted in accordance with the World Medical Association's "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects" and the Spanish National Law.

Preparation of calibration standards

Standards containing a 1 mg/mL concentration of each drug in methanol (morphine, codeine, BEG, methadone and EDDP) or acetonitrile (6AM, cocaine and cocaethylene) were used to prepare working-strength solutions containing a 0.5, 1, 2, 5, 10 or 20 µg/mL concentration of each drug in mobile phase (10:90, v/v, acetonitrile/phosphate buffer, pH 6.5) by appropriate dilution.

Apparatus

The microwave extractor system was an ETHOS PLUS MPR300/12S from Milestone[®] (Agrigento, Italy) equipped with a solvent detector. The microwave was able to extract 12 samples simultaneously in PTFE-lined extraction closed vessels under the same conditions (temperature and pressure), with simultaneous magnetic stirring of the sample and solvent inside. An in board pressure control system was installed for monitoring and controlling pressure and conditions inside the extraction vessels. This oven allows a maximum of 1000 W and the power changes in order to reach and maintain the temperature selected.

The analyses of the extracts were performed on a model 2695 chromatograph from Waters[®] (Milford, MA) connected to a model 996 photodiode array detector, also from Waters. Data were processed by using the software Millennium 32[®] v.3.05.01 for Windows 98. Samples were injected onto an XTerra[®] RP8 stainless steel column (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) supplied by Waters.

In order to optimize peak resolution in the chromatograms and efficient separation of the analytes in a reasonably short time (22 min), elution was done in the gradient mode, using a mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile and 20mM phosphate buffer (pH 6.5) at a variable flow rate (Table 1).

Table 1. Eluent Gradient.

Time (min)	Flow (mL/min)	A* (%)	B (%)
0	0.7	10	90
5	0.7	2	98
7	0.8	20	80
10	0.8	35	65
15	0.8	50	50
20	0.8	50	50
22	0.7	10	90

*A = acetonitrile and B = 20mM phosphate buffer (pH 6.5).

The diode-array detector allowed the wavelength range 200-400 nm to be scanned in order to obtain three-dimensional (wavelength x absorbance x time) chromatograms. The sensitivity was optimized by using the wavelengths of maximal chromatographic response for the analytes (specifically, 233 nm for cocaine, BEG and cocaethylene; 285 nm for morphine, codeine and 6AM; and 292 nm for methadone and EDDP).

Experimental design

The extraction conditions were selected in an experimental design constructed with the aid of the software Nemrod W. 2000, LPRAI (University of Aix-Marseille III, Marseille, France). Because of the large number of variables potentially affecting the efficiency of microwave assisted extraction, only a few were examined, all others being set at the optimum values found in earlier tests. A screening asymmetrical factorial design of the $2^1 3^2 // 9$ type was used for this purpose (Table 2). The proposed model is not predictive; rather, it measures response changes at each factor level and then determines interactions. This type of design discards non-significant factors, which reduces the number of tests needed and saves times and expenses as a result (13). We studied three factors at variable numbers of levels, namely a qualitative factor (solvent) at two levels and two quantitative factors (extraction temperature and time) at three levels each. Variables and levels were selected from a test series conducted prior to constructing the design. In these tests we tried organic solvents with high affinity with the analytes, such as chloroform, dichloromethane, hexane, toluene and ethyl acetate. The best results were obtained with chloroform and dichloromethane; therefore, they were included in

the design. After analyzing the effect of temperature and time on the process we found that the stability of the studied drugs is no affected in the ranges studied in the design. The experimental domain comprised the following specific variables and levels: solvent (chloroform or dichloromethane), temperature (50, 75 or 100°C) and extraction time (1, 5 or 10 min).

Table 2. Design Matrix ($2^1.3^2$).

No. Exp.	Solvent	Temperature (°C)	Time (min)
1	Chloroform	50	1
2	Chloroform	75	5
3	Chloroform	100	10
4	Dichloromethane	50	5
5	Dichloromethane	75	10
6	Dichloromethane	100	1
7	Chloroform	50	10
8	Chloroform	75	1
9	Chloroform	100	5

Extraction procedure

A 1-mL sample was mixed with 10 mL of solvent and placed in the vessel of the microwave oven for extraction under the conditions of the particular test as dictated by the experimental design. Following extraction, the vessel contents were centrifuged at 4000 rpm for 20 min and the organic layer was removed for evaporation to dryness under a nitrogen stream in a thermostated bath at 40°C. Finally, the dry extract was reconstituted in 100 µL of mobile phase and a 20-µL aliquot was injected into the chromatograph for analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Once the extraction conditions were selected, plasma solutions containing the eight drugs at concentrations of 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 µg/mL were prepared and extracted in accordance with the described procedure for analysis by HPLC-DAD and construction of calibration curves.

The analytes were identified from their retention times (approximately 6.6. min for morphine, 11.4 min for codeine, 12.5 min for BEG, 13.0 min for 6AM, 15.0 min for cocaine, 16.0 min for cocaethylene, 17.6 min for EDDP and 18.6 min for methadone) and absorption spectra. The HPLC-DAD technique exhibited a high specificity by virtue of its allowing the analytes to be discriminated from other substances with identical retention times potentially present in plasma. Also, it provided a high sensitivity as a result of it allowing the maximum absorption wavelength for each analyte (specifically 233 nm for BEG, cocaine and cocaethylene; 285 nm for morphine, codeine and 6AM; and 292 nm for EDDP and methadone) to be monitored.

The calibration curves for the analytes were linear over the concentration range 0.05-2.0 µg/mL in plasma, and their correlation coefficients were all greater than 0.997. A linear regression analysis of the type $y = ax + b$ provided additional useful parameters such as the slope and intercept (Table 3). By way of example, figure 1 shows the chromatogram for a plasma sample containing a 0.05 µg/mL concentration of each analyte as monitored at 233 nm.

Table 3. Linearity Data for the Standard Curves of Each Analyte (n = 5).

Compound	Linearity	Coefficient of Correlation
Morphine	$y = 1737x - 934$	0.9997
Codeine	$y = 1800x + 679$	0.9983
6AM	$y = 2974x + 843$	0.9995
BEG	$y = 22320x + 2204$	0.9989
Cocaine	$y = 29470x - 5852$	0.9969
Cocaethylene	$y = 7765x + 4672$	0.9998
EDDP	$y = 285x + 77$	0.9986
Methadone	$y = 339x + 57$	0.9996

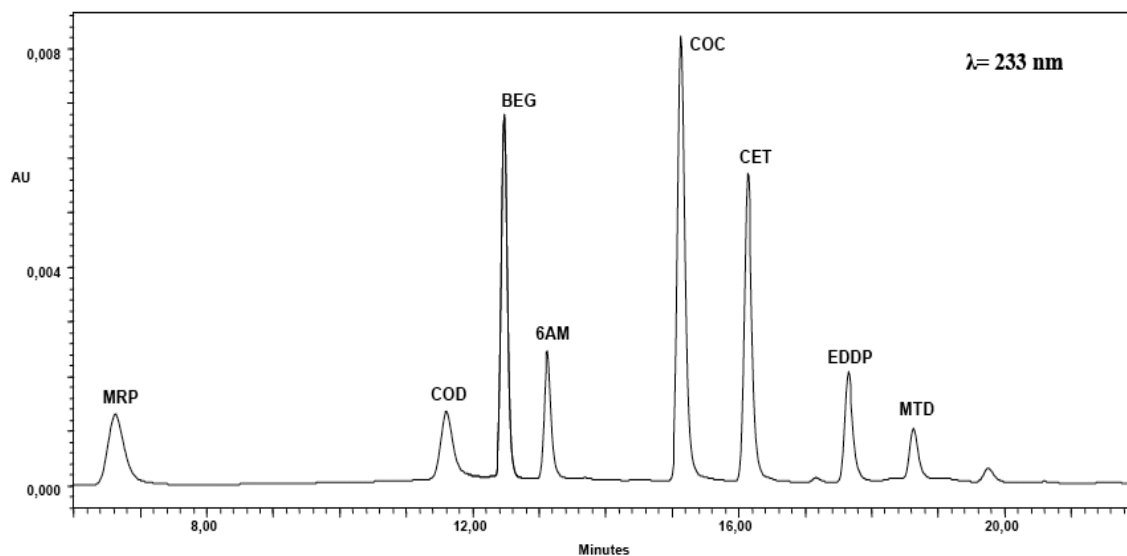


Figure 1. Chromatogram at 233 nm for a plasma sample (concentration 0.05 $\mu\text{g/mL}$).

The chromatographic conditions used to separate the studied drugs were selected from a series of tests involving various types of columns, mobile phases and gradients.

Application of the described extraction procedure to drug-free plasma samples revealed the absence of interferences in the chromatographic regions of interest for the analytes.

The results obtained in this work were examined with the aid of graphic tools supplied by the software used (Nemrod) including the total effects graph, the bars in which are proportional in length to the effect of each factor level on the analytical response. As can be seen in figure 2, chloroform provides better responses for 6AM (a), BEG (b), codeine (e) and morphine (h); it appeared as statistically significant effect for these drugs. This solvent practically provides the same effect as dichloromethane for cocaethylene (c), cocaine (d), and methadone (g). Only EDDP (f) presented better responses when dichloromethane was used in MAE.

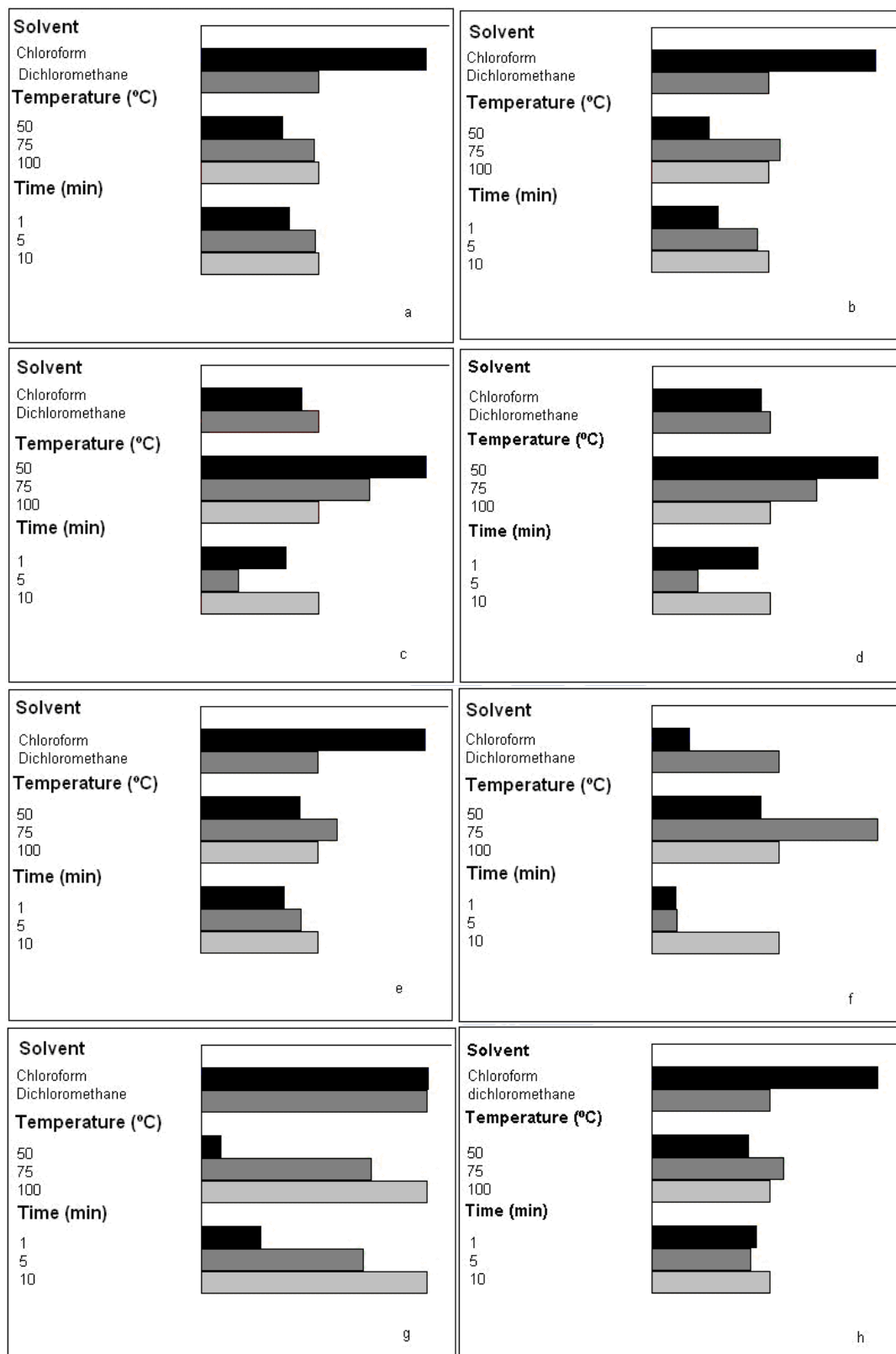


Figure 2. Total effect graphics for 6AM (a), BEG (b), cocaethylene (c), cocaine (d), codeine (e), EDDP (f), methadone (g) and morphine (h). The bar units are chromatographic peak area.

Medium level of temperature (75°C) supplied the best responses for four of the drugs: EEDP, BEG, morphine and codeine. The methadone has shown a better response with 100°C, but very short response with 50°C. Cocaine and cocaethylene have presented better responses for low value (50°C) than medium level (75°C), but good responses were also achieved at 75°C; both of values were statistically significant for these drugs, but also 75°C has shown statistical signification for morphine and 6AM and almost statistical signification for BEG.

All of the considered drugs show the best responses when high level of time (10 min) was used in MAE. This level of time was also statistically significant for cocaine, cocaethylene and 6AM. So the most suitable conditions for extracting the eight drugs were as follows: chloroform as solvent, a temperature of 75°C and a time of 10 min.

Under these conditions, the proposed method was validated in accordance with the recommendations of Shah et al. (14), and Peters and Maurer (15). The within-day and between-day precision (RSD), and accuracy (relative error), were estimated by subjecting five samples containing the eight drugs at different concentration levels (0.05, 0.5 and 2 µg/mL) to the described extraction procedure. The results thus obtained were acceptable; the RSDs were less than 8% and relative errors less than 7% in all cases (Table 4). These values are similar to those previously obtained by Caufield and Stewart (2) and Foulon et al. (16).

The limit of quantitation (LOQ) of the method was taken to be the lowest concentration in the calibration curve (0.05 µg/mL). The limit of detection (LOD), which was taken to be the lowest concentration giving a signal three times as high as the signal-to-noise ratio, was 0.01 µg/mL for cocaine, cocaethylene and BEG; 0.03 µg/mL for morphine, 6AM and methadone; and 0.04 µg/mL for codeine and EDDP. These LOD values are similar to those previously reported by Brunetto et al. (17).

Analyte recoveries were determined at two different concentration levels (0.05 and 2.0 µg/mL). To this end, the mean area under the peak obtained from five replicate analyses of plasma spiked and extracted as described were compared with the mean area under the peak obtained from five replicate samples containing the same analyte concentrations in mobile phase using the following expression:

$$\text{Recovery (\%)} = (\text{mean area}_{\text{plasma}} / \text{mean area}_{\text{mobile phase}}) \times 100$$

The recoveries thus calculated ranged from 68% for 6AM to 83% for morphine (Table 4). These values are similar to those obtained by other authors (18, 19) using SPE. The

proposed MAE method is therefore quite robust and can be used for the determination of opiates and cocaine in human plasma. Microwave energy expedites extraction of the analytes while maintaining analyte recovery rates. Because the technique uses standard laboratory equipment, it can be an effective method relative to potential alternatives such as liquid-liquid extraction and SPE; in fact, MAE reduces solvent consumption and extraction time, compared with the method published by Fernández et al. (20).

Table 4. Within-Day and Between-Day Precision and Accuracy and Recoveries.

	Concen. ($\mu\text{g/mL}$)	Precision RSD (%) Within-day (n=5)	Accuracy Rel. error (%) Within-day (n=5)	Precision RSD (%) Between-day (n=5)	Accuracy Rel. error (%) Between-day (n=5)	Recovery (%)
Morphine	0.05	2.09	0.62	7.22	5.12	80.60
	0.5	6.94	2.25	3.97	3.44	-
	2.0	3.91	3.37	1.55	1.88	82.96
Codeine	0.05	0.77	2.80	2.18	4.20	76.58
	0.5	6.01	3.65	4.30	2.80	-
	2.0	2.85	1.26	0.88	1.84	77.94
6AM	0.05	2.08	0.37	7.14	5.52	70.10
	0.5	5.49	3.20	4.95	1.24	-
	2.0	2.38	3.81	1.23	1.63	68.42
BEG	0.05	0.96	1.89	2.81	4.64	75.69
	0.5	6.25	3.05	3.16	6.89	-
	2.0	1.94	2.88	0.85	0.93	78.35
Cocaine	0.05	1.38	0.52	3.04	3.92	71.01
	0.5	2.26	3.15	4.79	4.36	-
	2.0	1.82	0.62	1.56	0.65	69.73
CET	0.05	3.25	0.88	4.43	5.72	78.10
	0.5	4.90	3.20	1.91	0.64	-
	2.0	1.96	2.17	1.29	0.73	82.02
EDDP	0.05	0.97	0.12	6.08	3.72	72.18
	0.5	4.56	1.75	2.11	2.80	-
	2.0	2.43	0.20	1.54	0.13	77.50
MTD	0.05	1.53	0.39	3.29	2.00	77.83
	0.5	2.09	0.62	1.56	1.99	-
	2.0	6.94	2.25	1.36	0.15	71.33

Once validated, the proposed method was applied to 20 human plasma samples obtained from Galician hospitals and courts (Table 5) and 18 others from fatally poisoned individuals obtained from the Institute of Legal Medicine of Galicia (Table 6). The results obtained testify to the usefulness of the simultaneous determination of the studied drugs. Thus, three drug consumers (Table 5) were found to be consuming heroin, cocaine and methadone; four heroin and methadone; five cocaine and methadone; and six others heroin and cocaine. Cocaethylene was detected in seven cases, suggesting the simultaneous use of cocaine and alcohol. The average concentrations of the drugs in the plasma samples that tested positive for them were as follows: 0.71 µg/mL for morphine, 0.80 µg/mL for codeine, 0.38 µg/mL for 6AM, 0.76 µg/mL for BEG, 0.84 µg/mL for cocaine, 0.42 µg/mL for cocaethylene, 0.62 µg/mL for EDDP and 0.48 µg/mL for methadone.

Table 5. Drug Concentrations (µg/mL) Found in Human Plasma from Drug Addicts.

	MRP	COD	6AM	BEG	COC	CET	EDDP	MTD
Positive cases	12	5	7	4	8	9	8	10
Maximum level	1.60	1.26	0.96	1.76	1.96	1.16	1.09	1.53
Minimum level	0.05	0.06	0.05	0.05	0.08	0.08	0.32	0.07
Mean	0.71	0.80	0.38	0.77	0.84	0.42	0.66	0.63
Standard deviation	0.57	0.45	0.31	0.53	0.60	0.40	0.27	0.48

Table 6. Drug Concentrations (µg/mL) Found in Plasma from Fatally Poisoned Individuals.

	MRP	COD	6AM	BEG	COC	CET	EDDP	MTD
Positive cases	10	3	9	15	11	7	6	8
Maximum level	1.59	1.52	1.41	2.08	1.92	2.08	1.50	1.65
Minimum level	0.09	0.11	0.06	0.12	0.15	0.25	0.13	0.16
Mean	0.75	0.99	0.72	1.21	1.03	1.06	0.73	0.91
Standard deviation	0.50	0.77	0.54	0.77	0.61	0.65	0.55	0.57

The average drug concentrations in the positive samples from fatally poisoned individuals were 0.89 µg/mL for morphine, 0.99 µg/mL for codeine, 0.69 µg/mL for 6AM, 1.21 µg/mL for BEG, 1.03 µg/mL for cocaine, 1.06 µg/mL for cocaethylene, 0.73 µg/mL for EDDP and 0.90 µg/mL for methadone. Four individuals (Table 6) were found to have used three drugs (heroin, cocaine and methadone), eleven used two drugs and three others only one drug. The results for cocaine are within the ranges previously obtained by Kroener et al. (21).

Based on the results, the time elapsed between consumption of the drugs and collection of the samples was quite long. In fact, 6AM, which is the main metabolite of heroin, was detected in fewer cases and at lower concentrations than was morphine (a product of the metabolism of 6AM). The fast metabolization of cocaine resulted in its being detected in fewer cases than was BEG, its main metabolite.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge funding from Spain's CICYT (Project BFI2002-03385).

REFERENCES

1. B. Maralíková and W. Weinmann. Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification. *J. Chromatogr. B* **811**: 21-30 (2004).
2. W.V. Caufield and J.T. Stewart. Rapid determination of selected drugs of abuse in human plasma using a monolithic silica HPLC column and solid phase extraction. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **25(19)**: 2977-2998 (2002).
3. E. Brandsteterová, E. Blahová and J. Netriová. Simple generic SPE assay for HPLC analysis of morphine and its glucuronides in serum samples. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **25(16)**: 2521-2534 (2002).
4. G. Theodoridis, M.A. Lontou, F. Michopoulos, M. Sucha and T. Gondova. Study of multiple solid-phase microextraction combined off-line with high performance liquid chromatography: Application in the analysis of pharmaceuticals in urine. *Anal. Chim. Acta* **516(1-2)**: 197-204 (2004).

5. M. Walles, W.M. Mullett and J. Pawliszyn. Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1025(1)**: 85-92 (2004).
6. S. Paterson, N. McLachlan-Troup, R. Cordero, M. Dohnal and S. Carman. Qualitative Screening for Drugs of Abuse in Hair Using GC–MS. *J. Anal. Toxicol.* **25(2)**: 137-143 (2001).
7. K. Ganzler, A. Salgó and K. Valkó. Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography. *J. Chromatogr.* **371**: 299-306 (1986).
8. J.R.J. Paré and J.M.R. Belanger. Microwave assisted process (MAP): a new tool for the analytical laboratory. *Trends Anal. Chem.* **13**: 176-184 (1994).
9. L.G. Croteau, M.H. Akhtar, J.M.R. Bélanger and J.R.J. Paré. High performance liquid chromatography determination following microwave assisted extraction of 3-nitro-4-hydroxyphenylarsonic acid from swine liver, kidney and muscle. *J. Liquid Chromatogr.* **17(13)**: 2971-2981 (1994).
10. M. Franke, C.L. Winek and H.M. Kingston. Extraction of selected drugs from serum using microwave irradiation. *Forensic Sci. Int.* **81**: 51-59 (1996).
11. C.S. Eskilsson, E. Björklund, L. Mathiasson, L. Karlsson and A. Tortensson. Microwave assisted extraction of felodipine tablets. *J. Chromatogr. A* **840**: 59-70 (1999).
12. A. Brachet, P. Christen and J.L. Veuthey. Focused microwave assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Phytochem. Anal.* **13**: 162-169 (2002).
13. G.A. Lewis, D. Mathieu and R. Phan-Tan-Luu. *Pharmaceutical Experimental Design*. Marcel Dekker, New York, 1999.
14. V.P. Shah, K.K. Midha, J.W.A. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonelli, C.T. Viswanathan and A. Yacobi. Bioanalytical Method Validation - A Revisit with a Decade of Progress. *Pharm. Res.* **17(12)**: 1551-1557 (2000).
15. F.T. Peters and H.H. Maurer. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. *Accred. Qual. Assur.* **7**: 441-449 (2002).

16. C. Foulon, M.C. Menet, N. Manuel, C. Pham-Huy, H. Galons, J.R. Claude and F. Guyon. Rapid analysis of benzoylecgonine, cocaine and cocaethylene in urine, serum and saliva by isocratic high performance liquid chromatography with diode array detection. *Chromatographia* **50(11/12)**: 721-727 (1999).
17. R. Brunetto, L. Gutiérrez, Y. Delgado, M. Galignani, J.L. Bruguera and M. Bruguera. High performance liquid Chromatographic determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human blood plasma sample into an alkyl-diol-silica precolumn. *Anal. Bioanal. Chem.* **375**: 534-538 (2003).
18. R. Dams, T. Benijts, W. Lambert and A.P. De Leenheer. Simultaneous determination of in total 17 opium alkaloids and opioids in blood and urine by fast liquid chromatography diode array detection fluorescence detection, after solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B* **733**: 53-61 (2002).
19. A. Klingmann, G. Skoop and R. Aderjan. Analysis of cocaine, benzoilecgonine, ecgonine methyl ester, and ecgonine by high-pressure liquid chromatography-API Mass Spectrometry and application a short-term degradation study of cocaine in plasma. *J. Anal. Toxicol.* **25**: 425-430 (2001).
20. P. Fernández, L. Morales, C. Vázquez and A.M. Bermejo, HPLC-DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma. *Forensic Sci. Int.* **161(1)**: 31-35 (2006).
21. L. Kroener, F. Musshoff and B. Madea. Evaluation of immunochemical drug screenings of whole blood samples. A retrospective optimization of cutoff levels after confirmation analysis on GC-MS. *J. Anal. Toxicol.* **27**: 205-212 (2003).

III.1.2. Análisis de drogas de abuso en orina por cromatografía líquida de alta resolución, previa optimización de su extracción asistida por microondas mediante diseño experimental

El objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de un procedimiento de extracción asistida por microondas y de un método de cromatografía líquida para el aislamiento y la determinación conjunta de drogas de abuso y sus metabolitos más importantes (morfina, 6-acetilmorfina, codeína, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metadona y 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina) en muestras de orina humana. Como ya se dijo, la selección de las drogas estudiadas se basa en el elevado consumo de heroína, cocaína y metadona; que, de esta forma, se convierten en las responsables de un gran número de intoxicaciones. La orina es una muestra biológica importante para ser analizada en casos de sobredosis pues, aunque no existe (como en el plasma) una correlación entre los niveles urinarios y el estado clínico o la muerte del sujeto, presenta ventajas tales como un mayor tiempo de detección postconsumo, disponibilidad de volúmenes elevados y concentraciones altas de drogas y sus metabolitos.

Por primera vez, se reveló la extracción asistida por microondas como un procedimiento útil para el análisis de drogas en orina, permitiendo optimizar un factor tan importante como el pH, que determina cuantitativamente la excreción de una sustancia. Después de aplicar un inmunoensayo a las muestras de orina y obtener un resultado positivo, en este trabajo se procedió a un análisis de confirmación, utilizando MAE y HPLC-DAD.

Para la optimización de la MAE se han probado diferentes disolventes, con el fin de conocer su capacidad de extracción de las drogas en estudio, diferentes temperaturas y diferentes tiempos de extracción, demostrando que los mejores resultados son obtenidos cuando se usan cloroformo o diclorometano, una temperatura de 100°C y un tiempo entre 5 y 20 minutos. A continuación se realizó un *diseño experimental*, estudiando tres factores (uno cualitativo y dos cuantitativos): disolvente (cloroformo y diclorometano), pH de la muestra (5.5 y 9) y tiempo de extracción (5, 10 y 20 minutos). El sistema está adecuadamente descrito mediante el modelo lineal de un polinomio de primer grado donde se tienen en cuenta las interacciones de primer orden. La matriz de experiencias se corresponde con un diseño factorial completo, de modo que se realizan $2^2 \cdot 3^1 // 12$ experiencias. Las áreas de los picos cromatográficos obtenidos en las experiencias del diseño son representadas en forma de

gráficos de interacción entre factores, gráficos de pesos delta y rectas de Henry, concluyendo que las condiciones óptimas son: cloroformo como disolvente, pH 9 y 10 minutos de tiempo de extracción.

Paralelamente, se ha validado un método de cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos para determinar las drogas de abuso en orina. En primer lugar, se optimizó la separación cromatográfica de los analitos, en base a la composición y flujo de la fase móvil, y el tipo de columna usada. Los resultados obtenidos son buenos para los objetivos propuestos. La linealidad se cumple en el rango de concentraciones 0.1-4 $\mu\text{g/mL}$ en orina. Los límites de detección oscilan entre 20 y 80 ng/mL , los coeficientes de variación siempre son menores de 8%, y las recuperaciones medias van desde 61 a 109%.

Finalmente, se comprobó la utilidad del método propuesto (MAE/HPLC-DAD), aplicándolo a 21 muestras de orina de sujetos vivos y a otras 17 procedentes de sujetos muertos, todas ellas recibidas en nuestro laboratorio para su análisis y posterior estudio toxicológico. En el primer grupo se detectaron ocho consumidores de heroína+cocaína+metadona, seis de heroína+metadona, tres de cocaína+metadona y tres de heroína+cocaína. En el segundo grupo se encontraron cuatro consumidores de las tres drogas, once de dos drogas y dos de una sola droga.

MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION OF DRUGS OF ABUSE FROM HUMAN URINE

Purificación Fernández^{1,*}, Marta Lago¹, Rosa Antonia Lorenzo², Antonia María Carro², Ana María Bermejo¹ and María Jesús Tabernero¹

¹ Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Santiago de Compostela, Spain

² Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Santiago de Compostela, Spain

* Correspondence to: P. Fernández, Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, C/ San Francisco s/n, 15782, Santiago de Compostela, Spain. E-mail: imlpuri@usc.es

ABSTRACT

Microwave assisted extraction (MAE) was used to extract drugs of abuse from urine samples for the simultaneous determination of morphine, codeine, 6-acetylmorphine (6AM), cocaine, cocaethylene, benzoylecgonine (BEG), methadone and 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP) by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). The working wavelengths used were 285 nm for morphine, codeine and 6AM; 233 nm for cocaine, cocaethylene and BEG; and 292 nm for methadone and EDDP. The mobile phase was a gradient of acetonitrile and phosphate buffer at pH 6.5. A full factorial design was used to identify the most suitable extraction conditions as regards pH, solvent and time of extraction. The optimum conditions thus established provided analyte recoveries from 61% to 109%. The detector response was linear over the drug concentration range 0.1–4.0 µg/mL in urine. The within- and between-day precision and accuracy were less than 8% and 6.5%, respectively. The method was applied successfully to samples obtained from Galician hospitals and courts.

Key Words: MAE; HPLC-DAD; gradient; urine; drugs of abuse

INTRODUCTION

Urine analyses are routinely used to detect the presence of drugs of abuse and certify their consumption; in fact, urine is an easily collected biological fluid that can contain many drugs – and, especially, their metabolites - at higher concentrations than in blood for several days.

Immunological techniques (Cone *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2000; Schramm *et al.*, 1993) are the most widely used for detecting drugs in biological fluids by virtue of their simplicity and expeditiousness; however, they are poorly sensitive and specific, which has compelled the development of alternative methods for the efficient identification and determination of drugs of abuse. One of the most widely used, gas chromatography-mass spectrometry (Cone *et al.*, 1994; Cárdenas *et al.*, 1996; McCambly *et al.*, 1997) requires the prior derivatization of non-volatile analytes. High performance liquid chromatography has emerged as an effective alternative in this context as it allows a large number of analytes to be separated with no chemical pretreatment (Antollini *et al.*, 2001; Brunetto *et al.*, 2005; Dams *et al.*, 2002; Foulon *et al.*, 1999; Concheiro *et al.*, 2006).

Drugs of abuse are usually extracted from samples by using liquid-liquid (Elliot and Hale, 1998) or solid phase extraction (Schänzle *et al.*, 1999; Maralíková and Weinmann, 2004). 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 the extraction of organic pollutants from sediments, soil, water and other types of materials (Ganzler *et al.*, 1986; Paré and Belanger, 1994; Croteau *et al.*, 1994). By contrast, MAE has scarcely been used to extract drugs of abuse from different materials such as serum, tablets or coca leaves (Franke *et al.*, 1996; Eskilsson *et al.*, 1999; Brachet *et al.*, 2002).

This work developed a new fast method based on microwave assisted extraction and high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) for the determination of morphine, codeine, 6-acetylmorphine (6AM), cocaine, benzoylecgonine (BEG), cocaethylene, methadone and 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP) in urine. The MAE procedure was optimized using an experimental design in order to establish the relative influence of three considered qualitative and quantitative factors for the operating conditions (Miller and Miller, 2000).

EXPERIMENTAL

Chemicals

All tests were conducted with gradient-grade solvents. The drug standards used (morphine, 6AM, cocaine, cocaethylene, BEG, methadone and EDDP) were supplied by Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Gradient grade acetonitrile, methanol, chloroform and dichloromethane were from Merck (Darmstadt, Germany). Purified water was obtained in the laboratory using a Milli-Q water system (Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland). Drug-free urine samples were obtained from non-drug users, and real samples from opiate and/or cocaine users. All were stored refrigerated at 4°C until analysis.

Preparation of Calibration Standard Solutions

Standards containing 1 mg/mL of each drug in methanol (morphine, codeine, BEG, methadone and EDDP) or acetonitrile (6AM, cocaine and cocaethylene) were used. Working-strength solutions were prepared by appropriate dilution of the previous standards to obtain 0.5, 1, 2, 5, 10 and 20 µg/mL of each drug in mobile phase (acetonitrile-phosphate buffer pH 6.5, 10:90, v/v).

Chromatographic Conditions

Analyses were carried out on a Waters[®] 2695 chromatograph (Milford, MA, USA) connected to a Model 996 photodiode array detector, also from Waters[®] (Milford, MA, USA). Data were processed with the software Millennium 32[®] 3.05.01 for Windows 98. Samples were injected onto an XTerra[®] RP8 (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) stainless steel column (Milford, MA, USA).

In order to ensure optimal peak resolution in the chromatograms, and hence efficient separation of the analytes in a reasonably short time (22 min), elution was done in the gradient mode, using a mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile and 0.02M phosphate buffer (pH 6.5) at a variable flow rate (Table 1).

The diode array detector allowed the wavelength range 200–400 nm to be scanned in order to obtain three-dimensional (wavelength × absorbance × time) chromatograms. The sensitivity was optimized by using the wavelengths where the chromatographic responses of

the analytes were maximal, namely: 233 nm for cocaine, BEG and cocaethylene; 285 nm for morphine, codeine and 6AM; and 292 nm for methadone and EDDP.

Table 1. Eluent gradient. Eluent A consisted of acetonitrile and eluent B of 20mM potassium phosphate (pH 6.5).

Time (min)	Flow (ml/min)	A (%)	B (%)
0	0.7	10	90
5	0.7	2	98
7	0.8	20	80
10	0.8	35	65
15	0.8	50	50
20	0.8	50	50
22	0.7	10	90

Experimental Design

The extraction conditions were evaluated using an experimental design constructed with the software Nemrod W. Version 2000, LPRAI (University of Aix-Marseille III, Marseille, France).

The proposed model is not predictive; rather, it measures response changes at each factor level and determines interactions - albeit with an aim other than mapping the response over the domain; this type of design discards non-significant factors, which reduces the number of tests to be performed and saves time and expense as a result. A full factorial matrix was used (Table 2) including three factors at a different number of levels that were chosen from a test series conducted prior to constructing the design: a qualitative factor (solvent) at two levels, a quantitative factor (pH) at two levels and another quantitative factor (extraction time) at three levels. Therefore, the matrix will be $2^2 \cdot 3^1 = 12$ (Lewis *et al.*, 1999).

Table 2. Design matrix ($2^3.3^1$).

Experiment	Solvent (A)	pH (B)	Time (min) (C)
1	Chloroform	5.5	5
2	Dichloromethane	5.5	5
3	Chloroform	9	5
4	Dichloromethane	9	5
5	Chloroform	5.5	10
6	Dichloromethane	5.5	10
7	Chloroform	9	10
8	Dichloromethane	9	10
9	Chloroform	5.5	20
10	Dichloromethane	5.5	20
11	Chloroform	9	20
12	Dichloromethane	9	20

Extraction Procedure

Prior to extraction, the drug-free control sample was diluted twofold with Milli-Q water in order to minimize matrix effect, the pH was modified up to 9 and then the sample was centrifuged at 14000 rpm for 10 min.

Under these conditions, the sample (1 mL) was mixed with 10 mL of chloroform and placed in the vessel of an ETHOS PLUS MPR300/12S microwave oven (Milestone[®], Agrigento, Italy) for extraction at 100°C for 10 min. After extraction, the vessel contents were centrifuged at 4000 rpm for 20 min and the organic layer was removed for evaporation to dryness under a nitrogen stream in a thermostatic bath at 40°C. Finally, the dry extract was reconstituted in 100 µL of mobile phase and a 20 µL aliquot was injected into the chromatograph for analysis.

Subsequently, solutions containing the eight drugs at concentrations of 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0 and 4.0 µg/mL in urine were prepared and extracted following the previous procedure for analysis by HPLC-DAD and construction of calibration curves.

RESULTS AND DISCUSSION

The analytes were identified from their retention times (namely 6.6 min for morphine, 11.4 min for codeine, 12.5 min for BEG, 13.0 min for 6AM, 15.0 min for cocaine, 16.0 min for cocaethylene, 17.6 min for EDDP and 18.6 min for methadone) and absorption spectra. In this way, the HPLC-DAD is a technique with a high specificity because it allows the analytes to be discriminated from other substances with the same retention times potentially present in urine. In addition, this technique provided a high sensitivity as it allowed the maximum absorption wavelength for each analyte to be monitored, namely: 233 nm for BEG, cocaine and cocaethylene; 285 nm for morphine, codeine and 6AM; and 292 nm for EDDP and methadone.

The chromatographic conditions used to separate the studied drugs were selected following testing of various types of columns, mobile phases and gradients. Application of the above-described extraction procedure to drug-free urine samples revealed the absence of interference in the chromatographic regions where the analytes appear.

Based on the graphs provided by the design (Figures 1 and 2), the final conditions for the simultaneous extraction of the studied drugs were found to be chloroform as the solvent, pH 9 for the urine samples and 10 min as the extraction time. For all the analytes, no interactions between factors were found, as shown in Figure 1 (parallel lines representing no first order interaction) for morphine. Figure 2 is a delta weight plot which allowed the relative effects of a level change in a variable on the response to be compared; the effects are shown as bars, the length of which are proportional to the relative magnitude of the effect, being negative for bars going leftwards and positive for those going rightwards. The dotted lines represent the statistical significance levels as determined using the method of Lenth; when the effect bars surpass the line, the effect of the factor level concerned on the response is statistically significant. Figure 2 shows for cocaine the statistical significance on the response (Lewis *et al.*, 1999) when the factor B (pH) changes its level.

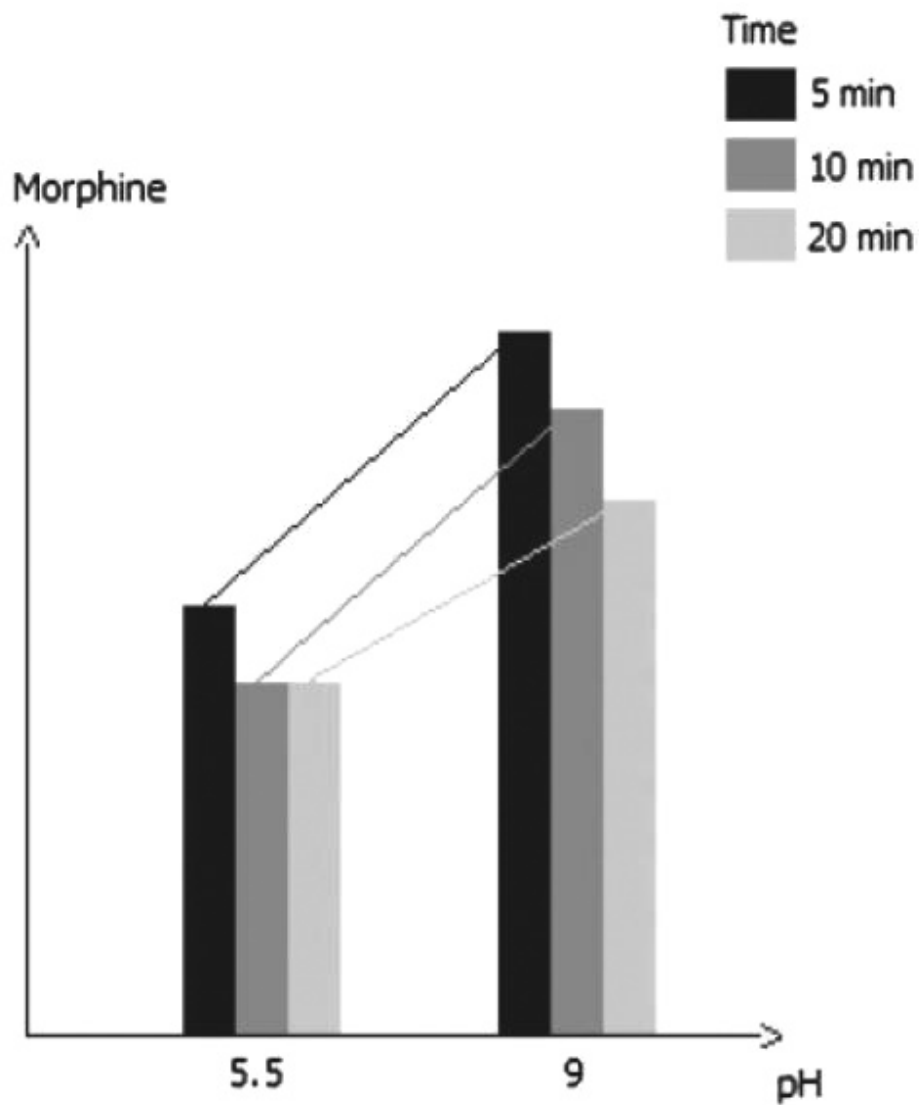


Figure 1. pH time interaction plot (morphine).

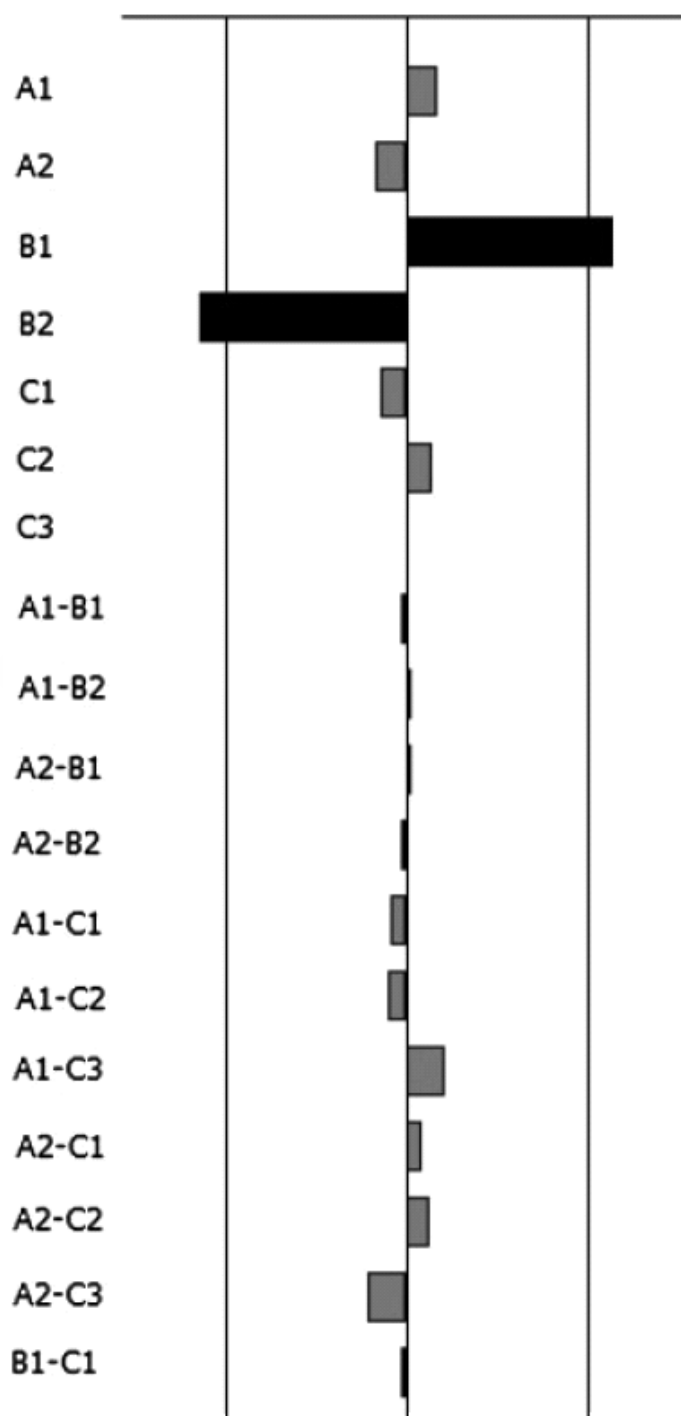


Figure 2. Delta weights plot (cocaine).

The calibration curves for the analytes were linear over the concentration range 0.1–4.0 µg/mL in urine, and their correlation coefficients were greater than 0.997 in all cases. A linear regression analysis based on the equation $y = ax + b$ provided additional parameters such as the slope and intercept (Table 3). By way of example, Figure 3 shows the chromatogram at 233 nm for a urine sample containing a 4 µg/mL analytes concentration.

Table 3. Linearity data for the standard curves of each analyte (n=5).

Compound	Linearity	Slope standard error	Intercept standard error	Coefficient of correlation
Morphine	$y = 4977x - 2682$	75	701	0.9975
Codeine	$y = 2800x - 767$	35	303	0.9984
6AM	$y = 4870x - 718$	44	287	0.9992
BEG	$y = 21773x - 1412$	79	643	0.9999
Cocaine	$y = 48364x + 2362$	182	1015	0.9999
Cocaethylene	$y = 38228x - 12850$	488	4586	0.9982
EDDP	$y = 106x + 18$	1	7	0.9993
Methadone	$y = 1091x - 392$	13	126	0.9983

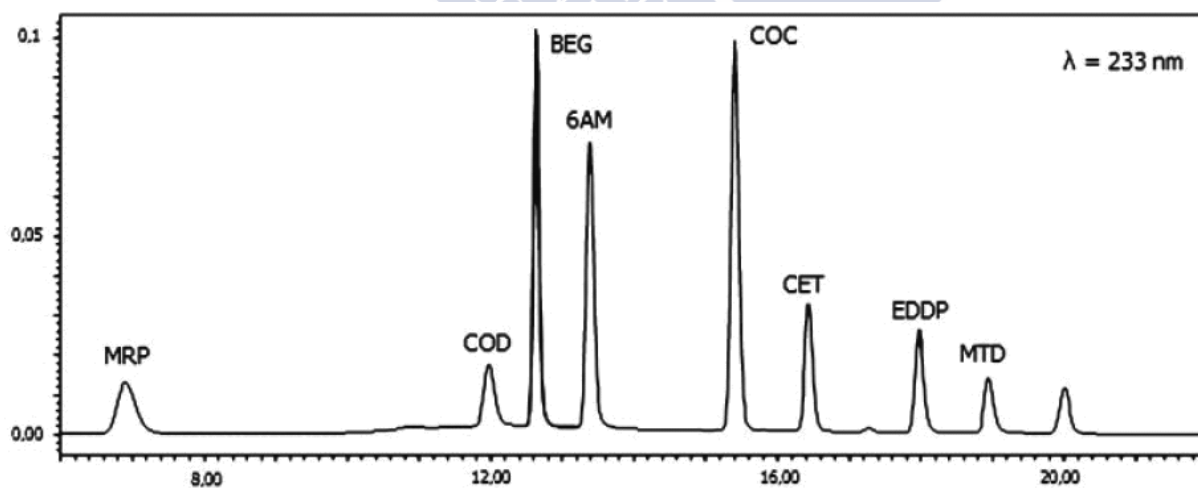


Figure 3. Chromatogram at 233 nm for a urine sample (concentration 4 µg/mL).

The analytical validation was performed according to the recommendations of Shah *et al.* (2000) and Peters and Maurer (2002). The within-day and between-day precision and accuracy were calculated by subjecting five samples containing the eight studied drugs at two different concentration levels (0.4 and 2.0 $\mu\text{g/mL}$) to the above-described extraction procedure. The results thus obtained were acceptable (Bresolle *et al.*, 1996); in fact, the relative standard deviations were less than 8% and the relative errors were less than 6.5% (Table 4).

Table 4. Within-day and between-day precision and accuracy and recoveries.

Compound	Concen. ($\mu\text{g/mL}$)	Precision	Accuracy	Precision	Accuracy	Recovery (%)
		RSD (%) within-day (n=5)	Rel. Error (%) within-day (n=5)	RSD (%) between-day (n=5)	Rel. Error (%) between-day (n=5)	
Morphine	0.4	2.14	1.52	5.87	2.30	93.98
	2.0	1.41	0.46	2.16	1.34	73.37
Codeine	0.4	1.88	1.23	6.15	3.20	82.58
	2.0	2.45	1.14	2.16	3.20	88.41
6AM	0.4	2.10	0.81	4.05	1.70	109.00
	2.0	2.61	0.46	2.41	3.50	88.31
BEG	0.4	2.24	1.43	4.43	1.70	61.01
	2.0	3.22	1.99	2.84	3.04	62.57
Cocaine	0.4	2.85	1.79	5.88	3.80	82.64
	2.0	1.90	6.09	3.10	2.32	88.20
CET	0.4	2.28	2.29	7.62	1.70	69.91
	2.0	1.91	0.67	1.23	1.48	87.65
EDDP	0.4	1.93	0.71	6.55	1.80	74.68
	2.0	3.13	4.18	2.15	1.80	67.07
MTD	0.4	1.63	1.22	4.30	3.60	66.63
	2.0	2.26	0.63	2.07	2.26	66.59

The quantitation limit for the method was taken to be the lowest concentration in the calibration curve (namely 0.1 $\mu\text{g/mL}$). On the other hand, the limit of detection was taken to be the lowest concentration giving a signal three times as high as the signal-to-noise ratio and was 20 ng/mL for cocaine, 40 ng/mL for BEG, 50 ng/mL for 6AM, 60 ng/mL for morphine, 70 ng/mL for codeine, cocaethylene and methadone and 80 ng/mL for EDDP; these values are similar to those previously reported by Brunetto *et al.* (2005).

Analyte recoveries were determined at two concentration levels (namely 0.4 and 2.0 µg/mL) by comparing the peak areas obtained in five replicate analyses of urine samples extracted as described above with those obtained in five replicate samples containing the same analyte concentrations in mobile phase. The equation used was:

$$\text{Recovery (\%)} = (\text{area}_{\text{urine}}/\text{area}_{\text{mobile phase}}) \times (10/8) \times 100$$

and included the correction factor 10/8 in order to consider the volume of chloroform used (10 mL) and that recovered (8 mL).

The average recoveries ranged from 61% for BEG to 109% for 6AM (Table 4). These values are similar to those previously obtained by other authors using solid phase extraction (Dams *et al.*, 2002). Based on the favorable recoveries provided by microwave assisted extraction, and its expeditiousness, cleanliness and reproducibility, the proposed method is an effective choice for the separation of analytes in biological matrices.

Once validated, the method was applied to 21 urine samples from drug addicts on a methadone detoxification program (Table 5) and 17 others from fatally poisoned individuals (Table 6). All samples were previously analysed by enzyme immunoassay (EMIT), which affords no quantitation or discrimination between different compounds and their metabolites.

The results testify to the usefulness of the simultaneous determination of these drugs. In fact, eight individuals shown in Table 5 were found to consume heroin, cocaine and methadone; six consumed heroin and methadone; three consumed cocaine and methadone; and another three heroin and cocaine. Only in four cases was cocaethylene detected, suggesting the combined use of cocaine and alcohol. The average concentration of each drug in the urine samples that tested positive for them was as follows: 1.94 µg/mL for morphine, 1.48 µg/mL for codeine, 0.54 µg/mL for 6AM, 3.34 µg/mL for BEG, 1.62 µg/mL for cocaine, 0.72 µg/mL for cocaethylene, 2.81 µg/mL for EDDP and 2.80 µg/mL for methadone. As can be seen, the morphine levels exceeded the 6AM levels; because morphine is a metabolite of 6AM, this result suggests that the time elapsed between consumption of the heroin and analysis of the urine was quite long. The results for BEG and cocaine confirm that the latter is rapidly metabolized to the former.

Table 5. Drug concentrations found in urine from drug addicts.

Case	Morphine	Codeine	6AM	BEG	Cocaine	Cocaethylene	EDDP	Methadone
1	1.84	4.10	0.32	4.11	0.42	0.28	4.12	1.93
2	1.08	-	0.34	3.88	0.75	-	3.99	1.80
3	3.09	-	-	3.49	0.53	-	-	2.69
4	0.57	-	-	-	-	-	0.69	0.23
5	3.70	-	-	-	2.96	-	0.54	-
6	-	-	1.84	3.62	0.85	0.12	3.47	3.49
7	0.41	-	0.57	0.44	-	-	4.03	3.95
8	-	-	-	3.24	-	-	-	2.16
9	0.14	0.11	-	-	-	-	3.06	-
10	-	-	0.37	-	-	-	4.04	4.15
11	3.73	-	-	-	0.74	-	-	3.84
12	3.05	-	0.52	-	-	0.33	3.43	2.91
13	-	-	-	-	4.15	-	-	3.30
14	1.45	-	-	-	-	-	4.37	3.55
15	4.22	-	0.15	-	-	-	2.09	3.60
16	1.02	-	-	4.14	-	-	-	2.79
17	1.33	-	-	4.22	-	-	-	-
18	0.46	-	0.21	4.33	-	-	-	-
19	3.41	0.93	-	-	2.57	2.16	-	-
20	1.60	0.80	-	-	-	-	0.31	1.53
21	-	-	-	1.92	-	-	2.44	3.06

The average concentrations of the drugs in the positive samples from fatally poisoned individuals were 2.16 µg/mL for morphine, 1.13 µg/mL for codeine, 2.44 µg/mL for 6AM, 3.66 µg/mL for BEG, 3.71 µg/mL for cocaine, 1.09 µg/mL for cocaethylene, 1.73 µg/mL for EDDP and 2.93 µg/mL for methadone. Four such individuals (Table 6) were found to use the three drugs (heroin, cocaine and methadone), eleven used two drugs, and two used only one.

Table 6. Drug concentrations found in urine from fatally poisoned individuals.

Case	Morphine	Codeine	6AM	BEG	Cocaine	Cocaethylene	EDDP	Methadone
1	-	-	-	5.39	-	-	1.59	0.63
2	-	1.37	-	-	-	-	-	6.27
3	1.50	-	-	-	3.27	-	4.35	-
4	-	-	-	3.60	-	-	0.36	5.79
5	0.24	-	-	3.03	8.13	-	-	-
6	0.18	-	5.68	4.78	-	2.17	-	-
7	-	-	-	5.81	1.62	0.96	0.12	0.16
8	1.10	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	1.68	-	-	-	0.94
10	0.76	-	2.63	3.40	0.33	-	2.71	9.16
11	-	-	-	0.21	-	0.15	0.95	1.81
12	-	0.27	-	-	4.61	-	-	-
13	4.63	-	-	-	4.92	-	-	1.03
14	-	2.06	-	5.07	-	-	3.27	0.32
15	5.24	-	0.31	-	-	-	-	-
16	-	0.84	1.15	-	3.12	-	-	-
17	3.47	-	-	-	-	-	0.49	3.17

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CICYT, project number BF12002-03385.

REFERENCES

- Antollini L, Suriano C, Grassi MC, Nencini P. 2001. Analysis of cocaethylene, benzoylecgonine and cocaine in human urine by high performance thin layer chromatography with ultraviolet detection: a comparison with high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **751**: 19–27.
- Brachet A, Christen P, Veuthey JL. 2002. Focused microwave assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Phytochem. Anal.* **13**: 162–169.

- Bresolle F, Bromet-Petit M, Audran M. 1996. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr.* **686**: 3–10.
- Brunetto MR, Delgado Cayama Y, Gutiérrez García L, Gallignani M, Obando MA. 2005. Determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human urine into a column switching liquid chromatography system with diode array detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37**: 115–120.
- Cárdenas S, Gallego M, Valcarcel M. 1996. An automated preconcentration - derivatization system for the determination of cocaine and its metabolites in urine and illicit cocaine samples by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**: 631–636.
- Concheiro M, de Castro A, Quintela O, López-Rivadulla M, Cruz A. 2006. Determination of drugs of abuse and their metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. An application to 156 road-fatalities. *J. Chromatogr. B* **832**: 81–89.
- Cone EJ, Hillsgrove M, Darwin WD. 1994. Simultaneous measurement of cocaine, cocaethylene, their metabolites, and crack pyrolysis products by gas chromatography-mass spectrometry. *Clin. Chem.* **40**: 1299–1305.
- Cone EJ, Lange R, Darwin WD. 1998. *In vivo* adulteration: excess fluid ingestion causes false-negative marijuana and cocaine urine test results. *J. Anal. Toxicol.* **22**: 460–473.
- Croteau LG, Akhtar MH, Bélanger JMR, Paré JRJ. 1994. High performance liquid chromatography determination following microwave assisted extraction of 3-nitro-4-hydroxyphenylarsonic acid from swine liver, kidney and muscle. *J. Liquid Chromatogr.* **17**: 2971–2981.
- Dams R, Benijts T, Lambert W, De Leenheer AP. 2002. Simultaneous determination of in total 17 opium alkaloids and opioids in blood and urine by fast liquid chromatography diode array detection fluorescence detection, after solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B* **733**: 53–61.
- Elliott SP, Hale KA. 1998. Applications of an HPLC-DAD drugs screening system based on retention indices and UV spectra. *J. Anal. Toxicol.* **22**: 279–289.
- Eskilsson CS, Björklund E, Mathiasson L, Karlsson L, Tortensson A. 1999. Microwave assisted extraction of felodipine tablets. *J. Chromatogr. A* **840**: 59–70.

- Foulon C, Menet MC, Manuel N, Pham-huy C, Galons H, Claude JR, Guyon F. 1999. Rapid analysis of benzoylecgonine, cocaine and cocaethylene in urine, serum and saliva by isocratic high performance liquid chromatography with diode array detection. *Chromatographia* **50**: 721–727.
- Franke M, Winek CL, Kingston HM. 1996. Extraction of selected drugs from serum using microwave irradiation. *Forensic Sci. Int.* **81**: 51–59.
- Ganzler K, Salgó A, Valkó K. 1986. Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography. *J. Chromatogr.* **371**: 299–306.
- Lewis GA, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. 1999. *Pharmaceutical Experimental Design*. Marcel Dekker: New York.
- Maralíková B, Weinmann W. 2004. Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification. *J. Chromatogr. B* **811**: 21–30.
- McCambly K, Kelly RC, Johnson T, Johnson JE, Brown WC. 1997. Robotic solid-phase extraction of amphetamines from urine for analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **21**: 438–444.
- Miller JN, Miller JC. 2002. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Prentice Hall: Harlow.
- Paré JRJ, Belanger JMR. 1994. Microwave assisted process (MAP): a new tool for the analytical laboratory. *Trends Anal. Chem.* **13**: 176–184.
- Peters FT, Maurer HH. 2002. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. *Accred. Qual. Assur.* **7**: 441–449.
- Schänzle G, Li S, Mikus G, Hofmann U. 1999. Rapid, highly sensitive method for the determination of morphine and its metabolites in body fluids by liquid chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **721**: 55–65.
- Schramm W, Craig PA, Smith RH, Berger GE. 1993. Cocaine and benzoylecgonine in saliva, serum and urine. *Clin. Chem.* **39**: 481–487.

Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, Miller KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A. 2000. Bioanalytical method validation - a revisit with a decade of progress. *Pharm. Res.* **17**: 1551–1557.

Williams RH, Maggiore JA, Shah SM, Erickson TB, Negrusz A. 2000. Cocaine and its major metabolite in plasma and urine samples from patients in an emergency medicine setting. *J. Anal. Toxicol.* **24**: 478–482.



III.1.3. Comparación de dos procedimientos de extracción (LLE y MAE) para la determinación de drogas de abuso en saliva usando cromatografía líquida de alta resolución

El objetivo de este trabajo ha sido la optimización de dos procedimientos de extracción (LLE y MAE) para la separación de varias drogas de abuso y sus metabolitos más importantes (morfina, 6-acetilmorfina, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metadona y 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP), a partir de saliva humana. La determinación posterior de estas drogas se llevó a cabo usando la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de red de diodos (HPLC-DAD). La saliva presenta ventajas con respecto a otras muestras biológicas, pues su recogida es muy fácil, no invade la intimidad del sujeto y contiene altas concentraciones de las drogas originales frente a sus metabolitos, lo que favorece la identificación de las sustancias consumidas. Las drogas llegan desde la sangre a la saliva por transporte activo, filtración y/o difusión pasiva a favor de un gradiente de concentración, según el tamaño molecular de las sustancias y su liposolubilidad. Cuando se alcanza el equilibrio entre ambos fluidos, la concentración de las drogas en saliva solo va a depender de la relación existente entre el pH de la sangre y el de la saliva. Si se favorece el flujo de la saliva, por estimulación mecánica o tomando alguna sustancia ácida, el pH de la saliva puede aumentar, modificándose así la concentración de las drogas en esta matriz. Puesto que la ventana de detección en saliva es corta y las concentraciones de drogas en saliva son bajas, se requiere una metodología analítica con una adecuada sensibilidad, tal como la cromatografía líquida de alta resolución.

La recogida de las muestras en este estudio ha sido realizada con un dispositivo comercial conocido como Salivette[®], que estimula la producción de saliva. Para la extracción líquido-líquido (LLE) se usaron Toxitubos A, que contenían una disolución tampón a pH 9 y una mezcla de disolventes orgánicos. Se añadió 1 mL de saliva, se agitó durante 10 min y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min; se separó la fase orgánica, se evaporó a sequedad, el residuo seco se reconstituyó en 100 µL de fase móvil, y una alícuota de 20 µL se inyectó en el cromatógrafo de líquidos para su análisis.

Para optimizar la extracción asistida por microondas (MAE), se probaron distintos disolventes orgánicos (cloroformo, diclorometano, hexano), distintas temperaturas (80, 90 y 100°C) y distintos tiempos (5, 10 y 15 min). Los mejores resultados fueron obtenidos cuando

se mezclaron 1 mL de saliva con 10 mL de cloroformo en un vaso del microondas y se mantuvo a 100°C durante 10 min. El contenido del vaso se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min, se separó la fase orgánica, se evaporó a sequedad, el extracto seco se reconstituyó en 100 µL de fase móvil, y una alícuota de 20 µL se inyectó en el cromatógrafo de líquidos para su análisis. La aplicación de los dos procedimientos de extracción previamente descritos a muestras de saliva libres de drogas confirma la ausencia de compuestos endógenos, que podrían interferir en el análisis cromatográfico de opiáceos, cocaína y sus metabolitos.

Paralelamente, se ha validado un método de cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos para determinar las drogas de abuso en saliva. Se usó una columna XTerra[®] RP8 y se optimizó el flujo y la composición de la fase móvil para obtener una buena separación cromatográfica de todas las drogas en estudio. A continuación, se estudiaron los siguientes parámetros: la linealidad, que se cumple en el rango 0.05-2 µg/mL; los límites de detección, que oscilaron entre 10 y 35 ng/mL para los dos procedimientos de extracción; la precisión, que tomó unos valores menores que 4.6% para LLE y MAE; y por último, la recuperación, que se situaba en los rangos de 53-95% para LLE y 83-100% para MAE. Como se pone de manifiesto, la extracción asistida por microondas es la que permite obtener mejores recuperaciones, si se compara con la extracción líquido-líquido.

Finalmente, los métodos propuestos (LLE/HPLC-DAD y MAE/HPLC-DAD) fueron aplicados a 24 muestras de saliva procedentes de usuarios crónicos de opiáceos y/o cocaína, obteniéndose resultados positivos para cocaína y/o sus metabolitos (benzoilecgonina y cocaetileno) en 22 casos, para metadona y/o EDDP en 12 casos y para metabolitos de la heroína (morfina y 6-acetilmorfina) en 8 casos. Tal y como habían publicado otros autores, las concentraciones de las drogas originales resultaron ser mayores que las de sus metabolitos, aunque se observaron diferencias interindividuales, atribuibles a la dosis, pH de la saliva y la forma de recogida de la muestra. Debido a las diferentes recuperaciones obtenidas, según el método de extracción aplicado, la morfina, EDDP y metadona fueron detectadas en menos sujetos cuando la saliva fue procesada usando Toxitubos A. Estos resultados confirman la conveniencia del uso de la extracción asistida por microondas frente a la extracción líquido-líquido.

COMPARISON OF TWO EXTRACTION PROCEDURES FOR DETERMINATION OF DRUGS OF ABUSE IN HUMAN SALIVA BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

P. Fernández*, L. Morales, C. Vázquez, M. Lago and A.M. Bermejo

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

* Correspondence to: P. Fernández, Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, Santiago de Compostela, Spain. E-mail: imlpuri@usc.es

ABSTRACT

High performance liquid chromatography in combination with diode array detection (HPLC-DAD) was used to determine morphine, 6-acetylmorphine, cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene, methadone and 2-ethylene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine in human saliva. For comparison, samples were prepared by either liquid–liquid extraction in Tox tubes A[®] or microwave-assisted extraction (MAE), by mixing 1 mL of saliva with 10 mL of chloroform and operating at 100°C for 10 min. Acetonitrile and 0.02M phosphate buffer at pH 6.5 were used as mobile phase in HPLC in gradient mode. The detector response was linear over the drug concentration range of 0.05–2.0 µg/mL in human saliva. The analytical method was validated by determining its precision and accuracy ($n = 5$), which were lower than 5% as relative standard deviation and 6% as relative error. Limits of detection ranged from 10 to 35 ng/mL; mean recoveries of drugs were from 53 to 95% with Tox tubes A and from 83 to 100% with MAE at two different concentrations (0.1 and 1.0 µg/mL). The proposed method was applied to 24 saliva samples from individuals poisoned with opiates and/or cocaine.

Keywords: HPLC-DAD; opiates; cocaine; Tox tubes; MAE; human saliva

INTRODUCTION

Most psychotropic drugs have traditionally been determined in blood and urine by virtue of these compounds and their metabolites being easily detected in these biological matrices. Over the past two decades, however, saliva has been increasingly employed to monitor drug use in the workplace and schools and for criminal justice purposes (Kadehjian, 2005). Saliva has a number of advantages over blood and urine, including ease of collection,

and it contains the parent drugs in high proportions relative to their metabolites. However, saliva has some disadvantages, such as a relatively low concentration range, variable pH and the risk of contamination from drug residues present in the nasal cavity (Aps and Martens, 2005).

The increasing simultaneous use of several drugs of abuse has required the development of convenient, expeditious methods for their detection in small amounts of sample. Properly preparing samples, which includes clean-up and pre-concentration of the target analytes, is a crucial step in the analysis of biological fluids for illicit drugs. The extraction techniques typically used for this purpose provide acceptable results, but are labour-intensive. These shortcomings have been circumvented by using alternative procedures such as those based on microwave-assisted extraction (MAE), which have enabled the successful extraction of various types of compounds from matrices including sediments, soil, plants and water (Ganzler *et al.*, 1990; Paré and Belanger, 1994; López-Avila *et al.*, 1995; Eskilsson *et al.*, 1999; Carro *et al.*, 2000; Christen and Veuthey, 2001; Barriada-Pereira *et al.*, 2004).

Opiates and cocaine in saliva have so far been determined using a variety of extraction procedures and analytical techniques (Speckl *et al.*, 1999; Niedbala *et al.*, 2001; Cone *et al.*, 2002; Mortier *et al.*, 2002; De Jager and Andrews, 2002; Jones *et al.*, 2002; Fucci *et al.*, 2003; Clauwaert *et al.*, 2004; Drummer, 2005; Jufer *et al.*, 2006; Cognard *et al.*, 2006) but none to date has used microwave-assisted extraction (MAE).

In this work, we have developed a method for the simultaneous determination of opiates, cocaine and their metabolites in saliva using Toxitubes[®] and MAE to prepare the samples, and liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) for their subsequent analysis.

EXPERIMENTAL

Material

Standards of the studied drugs [morphine, 6-acetylmorphine (6AM), cocaine, cocaethylene, benzoylecgonine (BEG), methadone and 2-ethylene-1,5-dimethyl-3,3,-diphenylpyrrolidine (EDDP)] were supplied by Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Gradient-

grade acetonitrile, methanol and chloroform were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Purified water was obtained in the laboratory using a Milli-Q water system from Millipore (Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland). Toxityubes A[®] were obtained from Dipesa (Madrid, Spain) and the Salivettes[®], used to collect the test samples, from Sarstedt (Numbrecht, Germany).

Preparation of Calibration Solutions

Standard solutions containing a 1 mg/mL concentration of each drug in methanol (morphine, BEG, methadone and EDDP) or acetonitrile (6AM, cocaine and cocaethylene) were used for calibration. Working-strength solutions containing all drugs were prepared by appropriate dilution of the previous standards to obtain concentrations of 0.5, 1, 2, 5, 10 and 20 µg/mL in mobile phase (10:90 v/v acetonitrile–phosphate buffer, pH 6.5), or 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 µg/mL in saliva.

Instrumentation

Analyses were performed on a model 2695 chromatograph from Waters[®] (Milford, MA) connected to a model 996 photodiode array detector, also from Waters[®]. Data were processed with Millennium 32[®] v.3.05.01 for Windows 98 software. Samples were injected onto an XTerra[®] RP8 (250 × 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) stainless steel column also supplied by Waters[®]. In order to ensure optimum peak resolution in the chromatograms, and hence efficient separation of the analytes within a reasonably short time (22 min), elution was carried out in gradient mode, using a mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile and potassium dihydrogen phosphate (pH 6.5; 0.02M) at a variable flow rate (Table 1). The diode array detector allowed the wavelength range 200–400 nm to be scanned in order to obtain three-dimensional (wavelength/absorbance/time) chromatograms. The sensitivity was optimized using the wavelengths where the chromatographic responses of the analytes were maximal, namely: 233 nm for cocaine, BEG and cocaethylene; 285 nm for morphine and 6AM; and 292 nm for methadone and EDDP.

The microwave extraction system was an Ethos Plus MPR 300/12S oven, from Milestone[®] (Agrigento, Italy), equipped with a solvent detector. This system allows up to 12 samples to be simultaneously extracted in PTFE-lined extraction closed vessels under identical conditions of pressure and temperature, with simultaneous magnetic stirring of the

sample and solvent inside. An in-board pressure control system was used to monitor and control pressure and other conditions inside the vessels. The oven provides a maximum power of 1000 W which can be changed in order to reach and maintain the desired temperature.

Table 1. Eluent gradient used.

Time (min)	Flow rate (ml/min)	Acetonitrile (%)	Phosphate buffer pH 6.5 (%)
0	0.7	10	90
5	0.7	15	85
7	0.8	20	80
10	0.8	35	65
15	0.8	50	50
20	0.8	50	50
22	0.7	10	90

Saliva Samples

Drug-free saliva samples were obtained from our laboratory coworkers, and test samples from opiate and/or cocaine users in a detoxification programme of the Drug Addict Health Care Unit of Galicia (NW Spain). All samples were stored refrigerated at 4°C unless their analysis was delayed, in which case they were frozen at -18°C. Saliva samples were collected with the commercial device Salivette[®]; this consists of a cotton swab that is inserted into the mouth and allowed to soak for 2–3 min, after which it is placed in a collecting tube and centrifuged to release the collected saliva for subsequent extraction and chromatographic analysis. All tests were conducted in accordance with the World Medical Association's *Principles for Medical Research Involving Human Subjects* and the Spanish National Law.

Sample Preparation

Toxītubes A

These tubes contain a buffer solution at pH 9 and a mixture of organic solvents (dichloromethane, 1,2-dichloroethane, heptane and isopropanol) to extract organic bases and some neutral drugs from the biological matrix. A volume of 1 mL of saliva was poured into each Toxītube, and the tube was shaken for 10 min and centrifuged at 4000 rpm for 15 min.

Then, the organic phase was evaporated to dryness under a nitrogen stream in a thermostated bath at 40°C, and the residue reconstituted in 100 µL of mobile phase of which a 20 µL aliquot was injected into the chromatograph for analysis.

Microwave-assisted extraction

After testing different solvents (chloroform, dichloromethane, hexane), temperatures (80, 90 and 100°C) and times (5, 10 and 15 min), the best results were obtained with the following conditions: a volume of 1 mL of saliva was mixed with 10 mL of chloroform and placed in the oven vessel for extraction at 100°C for 10 min. Then, the vessel content was centrifuged at 4000 rpm for 15 min and the organic layer was removed by evaporation to dryness under a nitrogen stream in a thermostated bath at 40°C. Finally, the dry extract was reconstituted in 100 µL of mobile phase and a 20 µL aliquot injected into the chromatograph for analysis.

The previous two extraction methods were applied in parallel to two series of solutions containing the seven target drugs at concentrations of 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 µg/mL in saliva. The extracts were analyzed under the above-described chromatographic conditions and the results used to construct a calibration curve for each analyte by plotting chromatographic areas against the respective post-extraction concentrations. Such concentrations were 10 times higher than the initial ones because the final volume was 10 times lower than the starting volume.

RESULTS AND DISCUSSION

Firstly, the target drugs were identified from their retention times and UV spectra, checking the purity of each peak and achieving satisfactory specificity and a good peak resolution in an overall analysis time of 22 min. The retention times were found to be 7.02 min for morphine, 12.48 min for BEG, 13.35 min for 6AM, 15.35 min for cocaine, 16.36 min for cocaethylene, 17.73 min for EDDP and 18.71 min for methadone. Figure 1 shows the chromatogram for a saliva sample, prepared by MAE, and containing a 0.1 µg/mL concentration of each analyte.

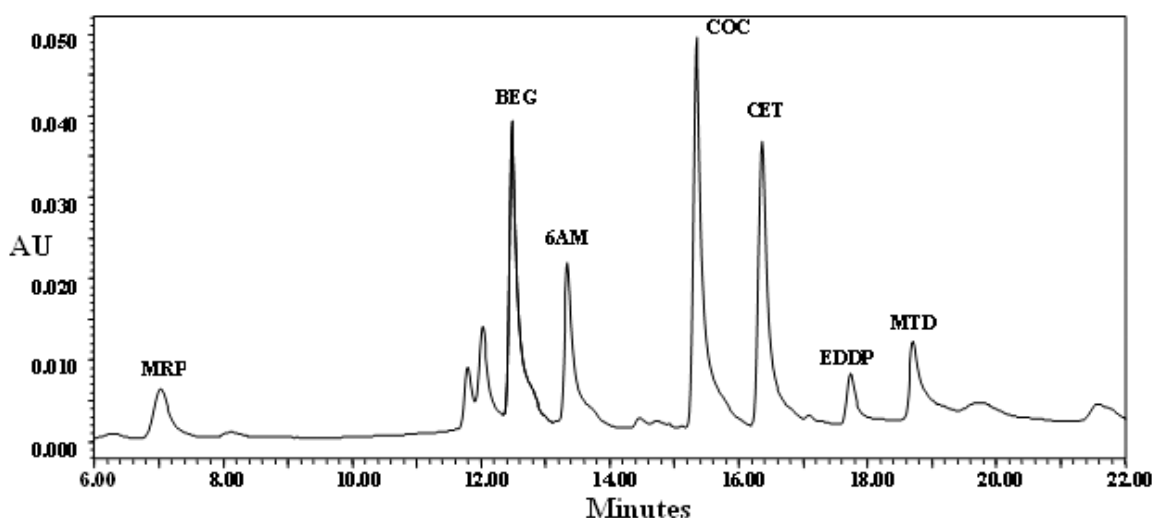


Figure 1. Chromatogram for a saliva sample containing 0.1 $\mu\text{g/mL}$ concentration of each analyte as monitored at 233 nm (MRP, morphine; BEG, benzoylecgonine; 6AM, 6-acetylmorphine; COC, cocaine; CET, cocaethylene; EDDP, 2-ethylene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine; MTD, methadone).

Application of the two above-described extraction procedures to drug-free saliva samples confirmed the absence of any endogenous compounds potentially interfering with the chromatographic analysis of the target drugs.

Calibration standards containing drug concentrations over the range 0.05–2.0 $\mu\text{g/mL}$ saliva were extracted in Tox tubes or by MAE and analyzed on five different days. Calibration curves were constructed by plotting the area under the chromatographic peak of each drug against concentration (Table 2). Each point in these curves was obtained in triplicate, and the correlation coefficients were similar using both extraction procedures. On the basis of the slopes corresponding to all compounds except cocaethylene, the MAE method provided to have a higher sensitivity.

The between-day precision and accuracy of the method were estimated by analysis of five saliva samples containing the drugs at two different concentrations (0.1 and 1.0 $\mu\text{g/mL}$). The precision was calculated as the relative standard deviation (RSD) and the accuracy was expressed as a percentage of the difference between the measured concentration and the true value for the same concentration. As can be seen from Table 3, the results were similar with both extraction procedures, with RSD less than 5% and relative error less than 6% in all cases. These values are similar to or even lower than those obtained by other authors (Foulon *et al.*,

1999; Fucci *et al.*, 2003; Cámpora *et al.*, 2003, 2006; Cognard *et al.*, 2006), using different extraction procedures and analytical techniques.

Table 2. Calibration curves.

	Equations	
	Toxitubes A	MAE
Morphine	$y = 2934.1 x - 451.8$ $R^2 = 0.999$	$y = 4109.2 x - 1972.3$ $R^2 = 0.997$
6AM	$y = 2791.4 x - 952.8$ $R^2 = 0.995$	$y = 4339.9 x - 392.5$ $R^2 = 0.999$
BEG	$y = 34939 x + 305.1$ $R^2 = 0.999$	$y = 39755 x + 10276$ $R^2 = 0.999$
Cocaine	$y = 40195 x + 278.7$ $R^2 = 0.999$	$y = 47397 x - 14084$ $R^2 = 0.999$
Cocaethylene	$y = 40045 x + 189.5$ $R^2 = 0.999$	$y = 36493 x - 3836.6$ $R^2 = 0.998$
EDDP	$y = 388.4 x - 26.7$ $R^2 = 0.999$	$y = 606.9 x - 60.5$ $R^2 = 0.997$
Methadone	$y = 1480.3 x - 290.4$ $R^2 = 0.998$	$y = 1598.1 x - 40.5$ $R^2 = 0.999$

Table 3. Mean precision, accuracy and recoveries.

	Sample preparation	RSD (%) between-day (n=5)	Relat. error (%) between-day (n=5)	Recovery (%)
Morphine	MAE	3.22	3.63	83
	Toxitubes A	2.91	2.70	67
6AM	MAE	3.23	1.50	90
	Toxitubes A	2.79	1.18	53
BEG	MAE	1.89	3.13	89
	Toxitubes A	4.55	2.55	69
Cocaine	MAE	4.51	3.23	94
	Toxitubes A	3.20	5.05	86
Cocaethylene	MAE	2.23	2.73	100
	Toxitubes A	3.64	5.80	95
EDDP	MAE	2.29	5.70	94
	Toxitubes A	4.19	3.05	72
Methadone	MAE	2.53	2.40	96
	Toxitubes A	4.24	1.93	77

The limit of quantitation of the proposed method was taken to be the lowest concentration in the calibration curve (0.05 µg/mL). On the other hand, the limit of detection

was taken to be the lowest concentration causing a signal rise three times as high as the signal-to-noise ratio at the wavelength selected for each compound; they were found to be 10 ng/mL for cocaine, cocaethylene and BEG; 25 ng/mL for 6AM and methadone; and 35 ng/mL for morphine and EDDP in saliva with the two extraction procedures. These drugs have previously been determined in saliva using other techniques; GC-MS allowed opiates to be determined at lower concentrations (Jones *et al.*, 2002; Cámpora *et al.*, 2006) and cocaine at higher (Fucci *et al.*, 2003) or similar levels (Jenkins *et al.*, 1995; Moolchan *et al.*, 2000). On the other hand, LC-MS/MS allowed cocaine and its metabolites to be determined with LODs of *ca* 0.22 ng/mL (Mortier *et al.*, 2002) or 1 ng/mL (Clauwaert *et al.*, 2004).

Drug recoveries were calculated by comparing the area under the peak for each drug as obtained from five saliva samples at two concentrations (0.1 and 1.0 $\mu\text{g/mL}$) with that obtained by direct injection of a mobile phase containing identical analyte concentrations. They were found to range from 53 to 95% with Tox tubes and from 83 to 100% with MAE (Table 3). So microwave-assisted extraction provides recoveries higher than those obtained for opiates (Mortier *et al.*, 2002) and for cocaine (Clauwaert *et al.*, 2004) with solid-phase extraction.

Finally, the two extraction procedures were used to analyze 24 samples of saliva from opiate and/or cocaine users who were under a detoxification programme (Table 4). A total of 22 samples tested positive for cocaine or its metabolites, 12 for methadone or EDDP and eight for heroin metabolites. These results only allow one to confirm the absence of recent consumption, at the time samples were collected, in two cases for cocaine, 12 cases for methadone and 16 cases for heroin. Owing to the different sensitivities and drug recovery according to the applied extraction procedure, morphine, EDDP and methadone were detected in fewer cases when the saliva was processed using Tox tubes. The concentrations were lower than the average value for each drug in more than half of the cases (55–83%). Based on the average concentrations obtained, the parent drug predominated over its metabolites, consistent with the results of other authors (Clauwaert *et al.*, 2004; Moffat *et al.*, 2004). The levels for cocaine and its metabolites found in this work are similar to those reported by Cognard *et al.* (2006) and Foulon *et al.* (1999), but higher than those obtained by Moolchan *et al.* (2000). These differences can be ascribed to various factors including dose, saliva pH and the way samples were collected - which in our case involved using a commercially available device

(Salivette®). Kato *et al.* (1993) found oral fluid obtained without stimulation to contain substantially higher drug levels than in samples collected upon stimulation with citric acid.

Table 4. Drug concentrations found in 24 real samples of saliva.

	Sample preparation	Positive cases	Mean±SD (µg/mL)	Maximum (µg/mL)	Minimum (µg/mL)
Morphine	MAE	8	1.79±1.15	3.49	0.39
	Toxitubes A	7	1.65±0.81	3.04	0.52
6AM	MAE	3	0.50±0.59	1.18	0.11
	Toxitubes A	3	0.46±0.67	1.07	0.12
BEG	MAE	20	0.75±0.55	1.59	0.05
	Toxitubes A	20	0.58±0.35	1.57	0.05
Cocaine	MAE	19	0.85±0.45	4.43	0.05
	Toxitubes A	19	0.69±0.42	2.99	0.05
Cocaethylene	MAE	6	0.057±0.014	0.07	0.05
	Toxitubes A	6	0.052±0.007	0.06	0.05
EDDP	MAE	8	0.97±0.80	2.10	0.20
	Toxitubes A	7	0.86±0.65	1.82	0.21
Methadone	MAE	12	1.62±0.042	5.87	0.10
	Toxitubes A	11	1.68±0.60	5.80	0.13

A comparison of the concentrations for the drugs in the positive samples revealed that the values obtained with microwave-assisted extraction were slightly higher than those obtained with Toxitubes but they were positively correlated, except for cocaethylene (Table 5). The microwave extraction system allows up to 12 samples to be simultaneously extracted, providing an increased analyte recovery within a shorter time than extraction with Toxitubes.

Table 5. Correlation between drug concentrations obtained with MAE and Toxitubes A.

	Equation ($y = ax + b$) ^a	R ²
Morphine (n= 7)	$y = 1.168x + 0.061$	0.982
6AM (n= 3)	$y = 1.115x - 0.013$	0.999
BEG (n= 20)	$y = 1.083x + 0.120$	0.820
Cocaine (n= 19)	$y = 1.321x - 0.053$	0.957
Cocaethylene (n= 6)	$y = 1.600x - 0.026$	0.640
EDDP (n= 7)	$y = 1.159x + 0.042$	0.933
Methadone (n= 11)	$y = 1.001x + 0.193$	0.986

^ax, concentrations with Toxitubes A; y, concentrations with MAE

CONCLUSION

The HPLC-DAD technique and microwave-assisted extraction to prepare the saliva samples provide good sensitivity and specificity for the determination of drugs of abuse in saliva, a biological matrix which has proved to be effective and useful in diagnosing overdose.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge funding of this work by Spain's CICYT (Project BFI2002-03385).

REFERENCES

- Aps JKM, Martens LC. 2005. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci. Int.* **150**: 119–131.
- Barriada-Pereira M, González-Castro MJ, Muniategui-Lorenzo S, López-Mahía P, Prada-Rodríguez D, Fernández-Fernández E. 2004. Determination of 21 organochlorine pesticides in tree leaves using solid-phase extraction clean-up cartridges. *J. Chromatogr. A* **1061**: 133–139.
- Cámpora P, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P. 2003. Quantitation of cocaine and its major metabolites in human saliva using gas chromatography–positive chemical ionization–mass spectrometry (GC/PCI-MS). *J. Anal. Toxicol.* **27**: 270–274.
- Cámpora P, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P. 2006. Use of gas chromatography–mass spectrometry with positive chemical ionization for the determination of opiates in human oral fluid. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**: 1288–1292.
- Carro N, García I, Llompart MP. 2000. Closed-vessel assisted microwave extraction of polychlorinated biphenyls in marine mussels. *Analisis* **28**: 720–724.
- Christen P, Veuthey KL. 2001. New trends in extraction, identification and quantification of artemisinin and its derivatives. *Current Med. Chem.* **8**: 1827–1839.

- Clauwaert K, Decaestecker T, Mortier K, Lambert W, Deforce D, Van Peteghem C, Van Bocxlaer JF. 2004. The determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in small-volume oral fluid samples by liquid chromatography–quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **28**: 655–659.
- Cognard E, Bouchonnet S, Staub C. 2006. Validation of a gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of cocaine and its metabolites in saliva. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**: 925–934.
- Cone EJ, Presley L, Lehrer M, Seiter W, Smith M, Kardos KW, Fritch D, Salamone S, Niedbala RS. 2002. Oral fluid testing for drugs of abuse: positive prevalence rates by intercept immunoassay screening and GC-MS-MS confirmation and suggested cutoff concentrations. *J. Anal. Toxicol.* **26**: 541–546.
- De Jager L, Andrews ARJ. 2002. Development of a screening method for cocaine and cocaine metabolites in saliva using hollow fiber membrane solvent microextraction. *Anal. Chim. Acta* **458**: 311–320.
- Drummer OH. 2005. Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. *Forensic Sci. Int.* **150**: 133–142.
- Eskilsson CS, Björklund E, Mathiasson L, Karlsson L, Tortensson A. 1999. Microwave-assisted extraction of felodipine tablets. *J. Chromatogr. A* **840**: 59–70.
- Foulon C, Menet MC, Manuel N, Pham-Huy C, Galons H, Claude JR, Guyon F. 1999. Rapid analysis of benzoylecgonine, cocaine, and cocaethylene in urine, serum, and saliva by isocratic high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Chromatographia* **50**: 721–727.
- Fucci N, De Giovanni N, Chiarotti M. 2003. Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva samples by SPME technique. *Forensic Sci. Int.* **134**: 40–45.
- Ganzler K, Szinai I, Salgó A. 1990. Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique. *J. Chromatogr.* **520**: 257–262.
- Jenkins AJ, Oyler JM, Cone EJ. 1995. Comparison of heroin and cocaine concentrations in saliva with concentrations in blood and plasma. *J. Anal. Toxicol.* **19**: 359–374.

- Jones J, Tomlinson K, Moore C. 2002. The simultaneous determination of codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, 6-acetylmorphine and oxycodone in hair and oral fluid. *J. Anal. Toxicol.* **26**: 171–175.
- Jufer R, Walsh SL, Cone EJ, Sampson-Cone A. 2006. Effect of repeated cocaine administration on detection times in oral fluid and urine. *J. Anal. Toxicol.* **30**: 458–462.
- Kadehjian L. 2005. Legal issues in oral fluid testing. *Forensic Sci. Int.* **150**: 151–160.
- Kato K, Hillsgrove M, Weinhold L, Gorelick DA, Darwin WD, Cone EJ. 1993. Cocaine and metabolite excretion in saliva under stimulated and non-stimulated conditions. *J. Anal. Toxicol.* **17**: 338–341.
- López-Avila V, Young R, Benedicto J, Ho P, Kim R, Beckert WF. 1995. Extraction of organic pollutants from solid samples using microwave energy. *Anal. Chem.* **67**: 2096–2102.
- Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Galichet LY. 2004. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceutical, Body Fluids and Postmortem Material*. Pharmaceutical Press: London.
- Moolchan ET, Cone EJ, Wstadik A, Huestis MA, Preston KL. 2000. Cocaine and metabolite elimination patterns in chronic cocaine users during cessation: plasma and saliva analysis. *J. Anal. Toxicol.* **24**: 458–466.
- Mortier KA, Maudens KE, Lambert WE, Clauwaert KM, Van Bocxlaer JF, Deforce DL, Van Peteghem CH, De Leenheer AP. 2002. Simultaneous, quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **779**: 321–330.
- Niedbala RS, Kardos K, Fries T, Cannon A, Davis A. 2001. Immunoassay for detection of cocaine/metabolites in oral fluids. *J. Anal. Toxicol.* **25**: 62–68.
- Paré JRJ, Belanger JMR. 1994. Microwave assisted process (MAP): A new tool for the analytical laboratory. *Trends Anal. Chem.* **13**: 176–184.
- Speckl IM, Hallbach J, Guder WG, Meyer LV, Zilker T. 1999. Opiate detection in saliva and urine - a prospective comparison by gas chromatography–mass spectrometry. *Clin. Toxicol.* **37**: 441–445.

III.1.4. Optimización de un método rápido de extracción asistida por microondas para la determinación cromatográfica de drogas ilegales en pelo

El objetivo de este trabajo ha sido la puesta a punto de un método analítico para la determinación simultánea de morfina, 6-acetilmorfina, codeína, cocaína, benzoilecgonina y cocaetileno en muestras de pelo humano, utilizando un nuevo procedimiento de extracción asistida por microondas y cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos. Existe un doble motivo que nos ha llevado al abordaje de este trabajo: por una parte, el elevado consumo de estas drogas en nuestro país, y por otra parte la extraordinaria utilidad que posee el pelo como herramienta para conocer el historial de drogadicción de los individuos, cuyas muestras se analizan de forma rutinaria en nuestro laboratorio:

- a) Muertos por sospecha de sobredosis en Galicia, siendo este indicador de mortalidad muy importante para valorar las consecuencias del consumo de drogas a nivel autonómico,
- b) consumidores de drogas, puestos a disposición judicial, que recibirán un tratamiento penal atenuado si se demuestra su condición de drogodependientes y
- c) drogadictos sometidos a curas de deshabituación en Centros de Drogodependencias de Galicia, que serán expulsados de estos programas si no cumplen la abstinencia a las drogas.

Esta ha sido la primera vez que se utilizó, y con buenos resultados, la extracción asistida por microondas para aislar drogas de abuso a partir de muestras de pelo, previamente lavadas, secadas y cortadas en fragmentos de milímetros. Después de realizar unos ensayos preliminares para seleccionar el disolvente de extracción (diclorometano) y establecer la necesidad de un modificador (metanol), se procedió a la optimización de la MAE, realizando un *diseño híbrido de dominio esférico*. Se realizaron 17 experiencias, estudiando tres factores con cinco niveles y un factor con cuatro niveles: temperatura (40, 53, 80, 107 y 120°C), tiempo (4, 5, 7, 9 y 10 minutos), volumen de diclorometano (5, 6, 8, 10 y 11 mL) y volumen de metanol (0.2, 0.5, 0.7 y 1 mL), y se construyeron las superficies de respuesta, a partir de las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a las drogas. Como estos gráficos no proporcionan unas conclusiones definitivas, se hace necesario el uso de funciones de deseabilidad para cada respuesta individual, que sí muestran las condiciones óptimas para la extracción simultánea de las seis drogas en estudio: 60°C, 9 min, 11 mL de diclorometano y 0.5 mL de metanol. Los resultados obtenidos en este trabajo son mejores que los publicados

después de usar digestión enzimática (López y col, 2006) o digestión ácida del pelo (Girod y Staub, 2000).

Paralelamente, se ha validado un método de cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos para determinar las drogas de abuso en pelo. En primer lugar, se optimizó la separación cromatográfica de los analitos, en base a la composición y flujo de la fase móvil, y el tipo de columna usada. La linealidad se cumple en el rango de concentraciones 0.5-40 ng/mg en pelo. El límite de cuantificación es 0.2 ng/mg para todas las drogas estudiadas, los coeficientes de variación siempre son menores de 4%, y las recuperaciones medias están incluidas en el intervalo de 99-101%.

Finalmente, se verificó la aplicabilidad del método propuesto (MAE/HPLC-DAD), analizando 46 muestras de pelo procedentes de sujetos consumidores de heroína, cocaína y/o metadona, todas ellas recibidas en nuestro laboratorio para su análisis y posterior diagnóstico de una intoxicación más o menos antigua en el tiempo. La cocaína fue la droga detectada en un mayor número de casos, poniéndose de manifiesto su elevado consumo frente a la heroína y la metadona. La presencia de su metabolito benzoilecgonina en 44 casos puede ser atribuida a la rápida biotransformación de la droga original, y demuestra que este metabolito es un buen marcador del consumo de cocaína. Por otra parte, la presencia de su metabolito cocaetileno en cinco casos sugiere un uso combinado de cocaína y alcohol.

OPTIMIZATION OF A RAPID MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION METHOD FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF OPIATES, COCAINE AND THEIR METABOLITES IN HUMAN HAIR

P. Fernández^a, M. Lago^a, R.A. Lorenzo^b, A.M. Carro^{b,*}, A.M. Bermejo^a and M.J. Tabernero^a

^aInstitute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Santiago de Compostela, Spain

^bDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Santiago de Compostela, Spain

*Corresponding author. Tel: +34981563100; Fax: +34981547141.

E-mail address: tuchi.carro@usc.es (A.M. Carro)

ABSTRACT

A rapid and cleanup-free microwave-assisted extraction (MAE) method is proposed for the simultaneous extraction of six illegal drugs of abuse: cocaine, benzoylecgonine (BZE), cocaethylene (CCE), morphine, 6-monoacetylmorphine (6AM) and codeine, from human hair samples. The analytes were determined using high performance liquid chromatography (HPLC) with photodiode array UV detection. The influence of several variables on the efficiency of the MAE procedure was investigated in detail by a multi-objective optimization approach based on a hybrid experimental design (17 experiments) and desirability functions. Six drugs were successfully extracted from human hair with recoveries close to 100% and good reproducibility (<3.6% RSD) under the optimal MAE conditions: 11 mL dichloromethane (DCM) extraction solvent, 60°C extraction temperature, 9 min extraction time and 0.5 mL of methanol (MeOH) added to 50 mg of the hair sample in the extraction vessels. Limits of quantification of 0.2 ng/mg were found for the studied compounds. A comparison of sample preparation procedures, including MAE, enzymatic digestion and digestion by aqueous acids, was also conducted. The results indicated that the global behaviour of sample procedures provided similar satisfactory recoveries ranging from 86 to 100%. Indeed, the MAE procedure resulted in a reduction of extraction time higher than 100-fold and the elimination of cleanup steps. Slightly higher recoveries of morphine, 6AM, BZE and CCE, at 1 ng/mg concentration level and cocaine at 40 ng/mg concentration level, were achieved using MAE. Lastly, the proposed MAE method was applied to several human hair samples from multidrug abusers.

1. INTRODUCTION

Hair analysis for drugs of abuse is routinely used in many countries in forensic and clinical fields [1]. Hair is an advantageous sample because of its substantially longer detection window (months to years) enabling retrospective investigation of chronic and past consumption. In addition, the collection, storage and transport of hair samples are easier and less invasive than the collection of blood or urine samples [2-4]. Moreover, hair samples may be useful even in post-mortem cases where other bodily fluids are unavailable. The drugs have been selected according to their high consumption, found in our country in recent years. Sample preparation for the extraction of illicit drugs from hair typically involves extraction with any amount of organic solvents such as methanol [3, 5-12], acid [1, 4, 10, 13-18] or basic [7, 9, 10, 19] digestion, or enzymatic digestion [7, 9, 10, 20-23]. The major drawback of these methods is the length of time needed to achieve efficient recoveries. Extended methanol extraction (3-18 h) with ultrasonic bath can provide lower drug recoveries as compared to other procedures [5-8]. Digestion with sodium hydroxide, which completely dissolves the hair matrix, allows the solubilisation of all drugs. Unfortunately, under these conditions, 6AM, a unique proof of heroin abuse, is hydrolysed to morphine. Therefore, the alkaline procedure cannot be recommended for drugs that are not stable under these conditions [7, 24]. The use of enzymes for hair analysis targets the destruction of the hair structure, thus promoting the release of the incorporated drugs to the digestion buffer. The hair is dissolved by incubating the sample with an enzyme at 40-60°C temperature for 6-24 h. For this purpose several enzymes, including proteinase K and pronase E, have been used [7, 9, 22]. The disadvantages of the enzymatic digestion of hair have been considered given the fact that the resulting digest could, under certain conditions, denature the antibodies used for the preliminary detection of drugs by immunoassays [10]. Overnight digestion in an aqueous solution of 0.01 to 0.5M HCl at 40-60°C temperature or phosphate buffer, followed by post-cleanup using solid-phase extraction columns is usually the extraction method of choice [4, 7, 24-27]. Thus, according to results from the third proficiency test organized by the Society of Hair Testing (SoHT), acid hydrolysis can offer higher yields for cocaine, opiates, and their metabolites than those obtained using enzymatic hydrolysis or methanol extraction [9].

More efficient environmentally friendly techniques for the rapid analytical extraction from solid matrices are supercritical fluids (SFE) [2, 7, 25, 28] and microwave-assisted extraction (MAE). Compared with other traditional extraction techniques, MAE presents

advantages such as the reduction of extraction time and solvent volume employed. It enables partial or total automation of the analytical process, decreases analyte loss and increases personal safety [29-31]. Commercial microwave equipment with security systems and closed vessels have made MAE an analytical technique of interest and potential since these instruments enable the simultaneous extractions of drugs of abuse at a high pressure and temperature, facilitating rapid and selective analyte desorption from complex matrices such as human plasma and urine. Moreover, the extraction yields of the analytes are equivalent to those obtained with conventional methods [32, 33].

Sensitive analytical technology for targeted assay is necessary. One of the most widely used, gas chromatography-mass spectrometry, requires prior derivatization of the non-volatile analytes [1, 3, 9, 22, 27, 34, 35]. Liquid chromatography [6-8, 12-14, 20] and capillary electrophoresis [36] combined with mass spectrometry have emerged as effective and useful approaches in this context, since they allow a large number of analytes to be separated with no derivatization requirements. Despite its advantages, LC-MS/MS remains limited to a small number of forensic toxicological laboratories because of its high cost [7]. The obtained results of drug analysis by HPLC with photodiode array UV detection [33, 37] were comparable to those provided by MS-based methods [38, 39].

To the best of the authors' knowledge - at the time of preparation of this paper - no previously published peer review literature detailing the application of MAE for drugs determination in hair matrices was available. In this paper, a new method for extracting cocaine, CCE, BZE, 6AM, morphine and codeine from hair using microwave energy was developed. An experimental design with variations in time, volume of dichloromethane (DCM) extraction solvent, volume of methanol (MeOH) solvent modifier and temperature was employed to optimize the MAE conditions with minimal experimental effort [40-42]. The method presented here is advantageous in terms of total extraction time and handling steps, without the need of any supplemental cleanup. The optimal MAE process was compared with other conventional procedures and then the proposed method for determination of opiates, cocaine and metabolites in hair samples spiked with drugs was used in the validation process. Moreover, the method was applied for the determination of drugs in real-life hair samples from forensic cases involving several drug of abuse and its robustness was evaluated in terms of recovery.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents

Standards of morphine, 6AM, cocaine, CCE and BZE were supplied by Cerilliant (Round Rock, TX, U.S.). Pronase E, dithiotreitol (DTT), sodium hydroxide, ammonium hydroxide (25%), hydrochloric acid (37%), potassium hydroxide, sodium hydrogen phosphate, potassium dihydrogen phosphate, boric acid, acetic acid, gradient-grade acetonitrile, methanol, chloroform, isopropanol and dichloromethane were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Tris(hydroxymethyl) aminomethane chloride (Tris-HCl buffer) was from Scharlau (Barcelona, Spain). Purified water was obtained from a Milli-Q water system from Millipore (Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland). Oasis HLB and MCX cartridges were from Waters[®] (Milford, MA).

2.2. Instruments and apparatus

Microwave-assisted extraction was performed with an ETHOS PLUS MPR300/12S from Milestone[®] (Agrigento, Italy) equipped with a solvent detector. The pressurized microwave oven was able to extract 12 samples simultaneously in PTFE-lined closed vessels under the same conditions (temperature and pressure), with simultaneous magnetic stirring of the sample and solvent inside.

The analyses of the extracts were performed on a Model 2695 liquid chromatograph from Waters[®] connected to a Model 996 diode array UV-vis detector (DAD). Data were processed with Millennium software 32[®] v. 3.05.01 for Windows 98. Samples were injected onto an XTerra[®] RP8 column (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μ m particle size) supplied by Waters[®]. In order to optimize peak resolution in the chromatograms and achieve efficient separation of the analytes in a reasonably short time (20 min), elution was performed in the gradient mode, using a flow rate 0.8 mL/min and a mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile (A) and 20mM phosphate buffer (pH 6.5) (B) set at a variable gradient program: 0-5 min, 10% A and 90% B; 5-7 min, 15% A and 85% B; 7-10 min, 20% A and 80% B; 10-15 min, 35% A and 65% B; 15-22 min, 50% A and 50% B; 22-25 min, 10% A and 90% B. Sensitivity was optimized by using the wavelengths of maximal chromatographic response for the analytes (*viz.* 233 nm for cocaine, BZE and CCE; 285 nm for morphine, codeine and 6AM) [33].

2.3. Hair sample preparation

Real hair samples were collected from 46 people ranging in age from 17 to 63 years (23 men and 23 women). All of the subjects were screened positive for drug abuse. Drug-free control hair was taken from 10 volunteers who had never used drugs and spiked with a standard solution containing all the drugs before extraction. The hairs were collected from the vertex posterior area as close as possible to the scalp and submitted to an initial procedure of decontamination by washing three times in 5 mL of a 0.1% solution of neutral soap (Tween 80), for 10 min each wash, rinsing three times with 5 mL of distilled water to eliminate any external contamination. The last wash cycle was analyzed to exclude external contamination. After drying at 40°C, the hair was cut into 1-mm segments. Then, 50 mg were weighted into a PTFE-lined extraction vessel.

2.4. Microwave extraction procedure

The nature of solvent (DCM) and the effect of the presence of a polar modifier like MeOH were fixed according to preliminary experiments and the results of a previous study on the determination of six drugs of abuse from plasma samples [32]. The other experimental conditions were established on the basis of the results of the optimization studies. In the optimized method, 0.5 mL of MeOH was added to 50 mg of hair sample in the extraction vessels, being in equilibrium with the matrix before the addition of 11 mL of DCM. Extraction was carried out in 9 min at 60°C. Following extraction, the vessel contents were filtered and the organic solvent was removed for evaporation to dryness under a N₂ stream at 40°C. Finally, the dry extract was reconstituted in 100 µL of mobile phase and a 20 µL aliquot was injected into the chromatographic system for analysis.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Preliminary experiments

Preliminary studies were carried out in order to decide on the extraction solvent to be used, the type of modifier to be added to the sample before extraction, as well as to examine the effect of HCl on the MAE yields.

Three organic solvents were studied to select the ones that would be most suitable in this case. Chloroform, MeOH and DCM were tested, using MAE general conditions of 80°C and 6 min. Owing to their electric characteristics, it was expected that the larger the dielectric constant and the dipole moment of the solvent, the more optimal the thermal energy would be [29]. However, the extracting selectivity and the ability of the medium to interact with microwaves can be modulated by the interactions of the matrix itself with microwaves. In this case, maximum efficiency was observed when DCM (dielectric constant, 8.9, and dipole moment, 1.16 Debye) was used as solvent since all the drugs were quantitatively extracted. In contrast, they could not be extracted using MeOH (dielectric constant, 32.6, and dipole moment, 2.87 Debye) or chloroform (dielectric constant, 5.5, and dipole moment, 1.1 Debye).

The use of microwave energy for accelerating the acid hydrolysis of human hair for extracting illicit drugs was tested, using MAE general conditions (80°C, 6 min and 10 mL DCM) by adding different volumes and concentrations of HCl in extraction vessels and evaluating the effect on MAE yields. The results (n=2) were compared with those obtained by MAE without HCl (Figure 1) and it was observed that several drugs were not extracted when acid hydrolysis was used simultaneously with MAE. In the case of MAE without HCl, microwave heating was sufficient for the disruption of weak hydrogen bonds promoted by the dipole rotation of the molecules [29], providing the best extraction responses.

The suitability of MAE (at general conditions of 80°C, 6 min and 10 mL DCM) with and without an added polar modifier prior to extraction of the studied drugs from human hair was assessed. We tested both water and MeOH as modifiers for MAE, and the results were compared to those reported for the extraction of hair with MAE in the absence of a polar modifier (Figure 2). When MeOH was added to hair samples in the vessel before extraction, the presence of the modifier helped remove drugs from hair more easily than with unmodified MAE. Due to the responses obtained, further research work has focused on the use of MeOH.

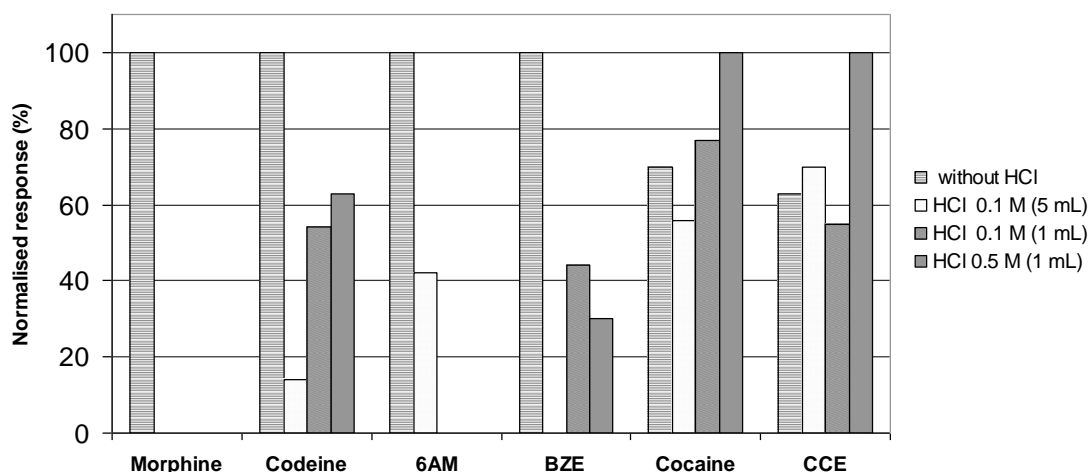


Figure 1. Influence of hydrochloric acid presence on responses obtained for each drug.

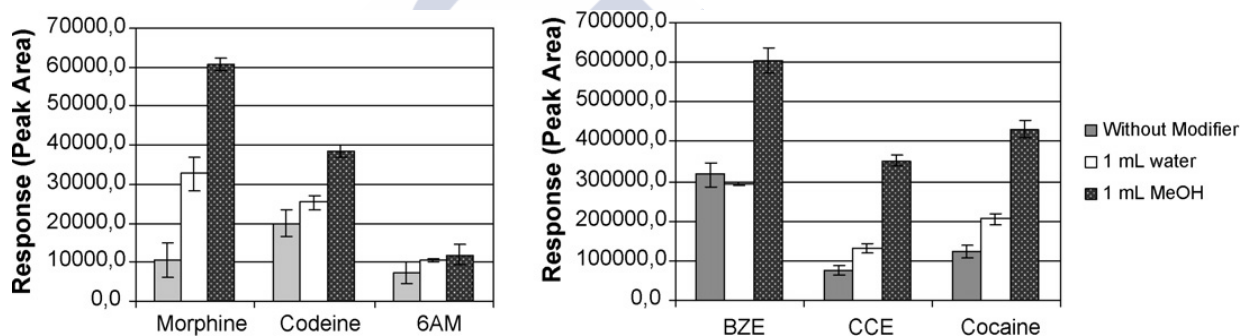


Figure 2. Effect of polar modifier utilization on the extraction efficiency of MAE.

3.2. Optimization of MAE procedure

We used a hybrid design of a spherical domain to optimize the responses (analyte peak area) directly related to MAE. The design consisted of three factors with five levels and one factor with four levels: extraction temperature (40, 53, 80, 107 and 120°C), extraction time (4, 5, 7, 9 and 10 min), DCM solvent volume (5, 6, 8, 10 and 11 mL) and MeOH volume added to the sample as modifier (0.2, 0.5, 0.7 and 1 mL). The proposed experimental design (15 experiments + 2 central points) is shown in Table 1.

Table 1. Experimental plan for hybrid design and responses obtained (areas) in each experiment for drugs.

Run	Temp (°C)	Time (min)	DCM volume (mL)	MeOH volume (mL)	Responses (areas)					
					MRP	COD	6AM	BZE	COC	CCE
1	80	7	8	1.0	31,025	18,398	20,417	431,505	119,838	212,019
2	53	5	6	0.7	36,736	23,171	23,794	513,110	150,488	287,900
3	53	5	10	0.7	42,214	25,839	27,849	541,685	161,006	349,425
4	107	5	6	0.7	45,650	25,126	29,076	546,336	175,910	350,473
5	107	5	10	0.7	46,098	24,775	29,273	593,236	188,204	322,328
6	53	9	6	0.7	37,869	22,119	24,898	512,465	143,715	311,048
7	53	9	10	0.7	51,732	34,266	39,387	614,132	250,627	504,727
8	107	9	6	0.7	42,061	23,174	28,089	557,541	171,569	360,001
9	107	9	10	0.7	43,693	25,075	27,184	590,478	177,153	293,746
10	80	7	5	0.2	46,201	27,820	29,595	577,865	186,336	350,563
11	80	7	11	0.2	46,057	29,517	35,399	573,307	223,788	431,355
12	40	7	8	0.2	48,928	28,581	32,968	622,096	190,822	368,085
13	120	7	8	0.2	43,123	27,534	29,748	573,436	193,059	386,466
14	80	4	8	0.2	46,262	27,996	30,958	586,399	192,853	361,745
15	80	10	8	0.2	46,104	27,971	28,970	563,587	198,055	394,929
16	80	7	8	0.5	45,137	26,374	28,416	557,318	173,603	365,812
17	80	7	8	0.5	46,231	25,643	27,745	602,048	155,735	294,046

NEMROD[®]W software was used for the generation and evaluation of the experimental design [43]. The three-dimensional response surface shows the effect of two independent variables on a given response, at a constant value (central value) of the other two independent variables. Thus, for cocaine (Figure 3A), morphine and CCE, higher responses were obtained when temperature and DCM volume were at their opposite levels, whereas for codeine, 6AM and BZE (Figure 3B) extraction efficiency was favoured by high DCM volume and low temperature values. Similar opposite behaviours were observed when temperature and time factors were considered for morphine, BZE, cocaine and CCE. Also, better responses were obtained when time and MeOH volume were at their lowest level for 6AM and cocaine (Figure 3C). However, middle values of MeOH volume without significant time effect, for morphine, codeine, BZE (Figure 3D) and CCE produced higher results. The

response contour plots serve as a preliminary graphical approach to optimization, but the use of multicriteria optimization based on the construction of a desirability function for each individual response provided the identification of the best-compromise conditions for the simultaneous extraction of drugs using MAE [44]. Each individual desirability function was chosen from a family of linear or exponential continuous functions, and ranged from zero (undesirable response) to one (optimal response). The overall desirability function (D) was estimated as the geometric average of the individual desirability functions (d_i) using NEMROD[®]W without additional experiments. In this case, MAE efficiency was maximised ($d_i = 1$ for the highest areas) and the D function acquires its maximum value of 1 (Figure 4) under the following optimal conditions: 60°C, 9 min, 11 mL of DCM and 0.5 mL of MeOH.

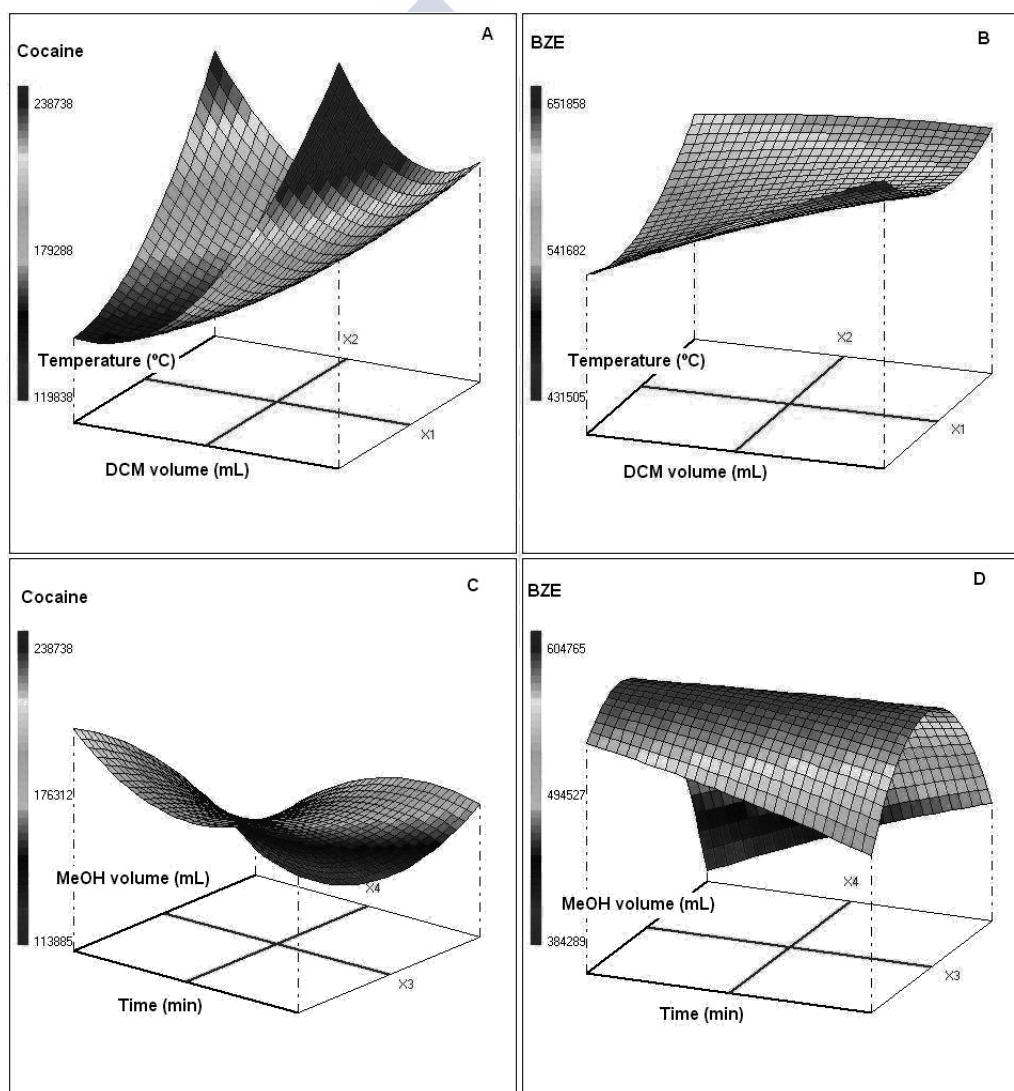


Figure 3. Response surfaces of extraction efficiency (peak area) as function of temperature and DCM solvent volume for cocaine (A) and BZE (B) and as function of MeOH modifier volume and time for cocaine (C) and BZE (D).

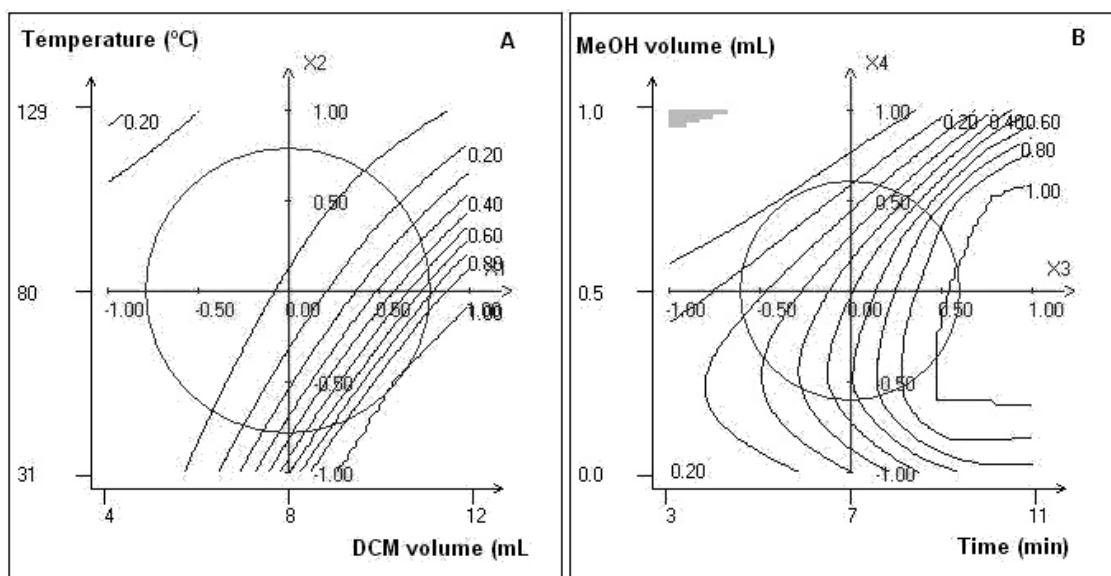


Figure 4. Global desirability contour plots obtained in the optimization of MAE using a hybrid design.

3.3. MAE-HPLC/DAD method validation

The analytes were identified from their retention times (*viz.* 6.35 min for morphine, 9.22 min for codeine, 10.53 min for BZE, 11.89 min for 6AM, 14.78 min for cocaine, 15.83 min for CCE) and absorption spectra. This gives the method a high specificity as it provides information about the purity of the corresponding peaks.

Linearity was assessed by injecting each sample five times over a concentration range of 0.5 to 40 ng/mg. Results obtained for the correlation coefficients (R^2) varied between 0.9992 and 0.9999. Quantification was based on the standard addition method using hair samples spiked with a multistandard mixture of a known concentration, in order to avoid matrix effects. Precision was investigated studying intra-day repeatability and inter-day reproducibility. Relative standard deviations (RSD), and accuracy (relative error), were evaluated at three concentration levels (1, 10 and 40 ng/mg) to the MAE procedure described above. The results showed low RSD, from 0.98 to 6.3% ($n=5$) for intra-day precision and from 0.43 to 3.6% ($n=5$) for inter-day precision. Intra-day relative errors were less than 7% in all cases while inter-day relative errors were less than 4%. Quantification limits (LOQ) were calculated for a S/N ratio of 10 [45]. The LOQs achieved were 0.2 ng/mg for all the drugs. These limits are in the range of ng/mg, suggested for these drugs on the recommendations for hair testing in forensic cases by the Society of Hair Testing [46].

3.4. Comparison between MAE and two different digestion procedures

Acid and enzymatic preparations always show higher drug recoveries compared with methanol and ultrasonic extraction. Moreover, it is not possible to differentiate between the medical intake of codeine or morphine from heroin abuse by means of alkaline digestion. Therefore, the analytical precision and recovery of the MAE technique were studied in quintuplicate and compared with enzymatic digestion and acid digestion. The results were analysed by HPLC-DAD after subjecting 50 mg of drug-free hair samples spiked at two concentration levels for each drug to the three procedures described in Table 2. Data in Table 3 show the relative effectiveness of the three extraction procedures applied. As shown, all the tested extraction procedures gave good analytical results, with recoveries ranging from 86 to 102%. The statistical comparison between the different extraction procedures exhibited a significant effect (95% confidence level) between-methods variance (ANOVA test, using Statgraphics Plus version 5.1 for windows (Manugistics, Inc., Rockville, MD, USA)). Enzymatic and acid digestion presented similar recoveries (within 86-102% range) and RSD (within 1.1-9% range) values, while MAE recoveries were more efficient (ranging between 99 and 101%) and precision values (ranging between 0.4 and 3.6%) were lower than conventional methods. According to the ANOVA, no significant effects were found in between-drugs variance ($p=0.45$) or between-concentration level ($p=0.22$).

Also, a multifactor analysis of variance (ANOVA) was performed to compare the results obtained with enzymatic digestion, acid digestion and MAE from real hair sample of six forensic cases. Positive results were obtained only for the two most commonly found drugs or metabolites (BZE and cocaine) (Table 4). The absence of statistical significance (95% confidence level) for the factor extraction method was demonstrated. However, the results obtained for the analysed samples were statistically different ($p \leq 0.05$) depending on the origin of the forensic case. Thus, there were two homogeneous sample groups formed for the following samples: 1, 2, 3, 4 and 6; and sample 5 constituted a separate single group. On the other hand, the results obtained for the analysed drugs were also statistically different ($p \leq 0.05$) because the concentrations range (1.67-34.63 ng/mg) for cocaine, as expected, was higher than the range obtained for BZE (0.40-2.21 ng/mg).

Table 2. Comparison of the proposed method with conventional procedures: working conditions.

Enzymatic digestion (Ref [23])	Acid digestion (Ref [18])	Microwave-assisted extraction (this paper)
<i>Temperature:</i> 37°C	<i>Temperature:</i> 60°C	<i>Temperature:</i> 60°C
<i>Time:</i> 2 h + overnight	<i>Time:</i> 12 h	<i>Time:</i> 9 min
<i>Reagents:</i> 500 µL of 12 mg/mL DTT and 500 µL of 2 mg/mL pronase E in Tris-HCl buffer 0.1M, pH 7.2	<i>Reagents:</i> 1 mL HCl 0.01M, 1mL NaOH 0.01M, 1 mL phosphate buffer, pH 7	<i>Reagents:</i> 0.5mL MeOH as modifier and 11mL DCM as extraction solvent
<i>Ultracentrifugation:</i> 5 min	<i>Ultracentrifugation:</i> 5 min	<i>Ultracentrifugation:</i> No
<i>Cleanup:</i> SPE (Oasis HLB) with 1mL borax buffer, pH 9.2	<i>Cleanup:</i> SPE (Oasis MCX)	<i>Cleanup:</i> No
Rinsed with 2 mL MeOH: water (5:95) and 2 mL NH ₄ OH: MeOH: water (20:2:78)	Rinsed with 2 mL water, 1 mL acetate buffer, pH 4 and 2 mL MeOH	
Vacuum-dried for 20 min	Vacuum-dried for 20 min.	
Elution: 2 mL 2% acetic acid in MeOH	Elution: 2 mL methylene chloride: isopropanol: ammonium hydroxide (80:18:2)	
<i>Extract:</i> Evaporated under a stream of N ₂ at 40°C to dryness	<i>Extract:</i> Evaporated under a stream of N ₂ at 40°C to dryness	<i>Extract:</i> Evaporated under a stream of N ₂ at 40°C to dryness

Table 3. Precision and accuracy for analysis of drugs in fortified hair. Comparison of sample preparation procedures.

Drug	Target concentration (ng/mg)	Enzymatic digestion (n=5)		Acid digestion (n=5)		MAE (n=5)	
		1.0	40.0	1.0	40.0	1.0	40.0
Morphine	Mean concent. (ng/mg)	0.86	37.9	0.88	38.3	1.00	40.0
	%Recovery	86	95	88	96	100	100
	%RSD	6.6	4.3	1.8	5.2	1.8	0.8
Codeine	Mean concent. (ng/mg)	0.89	39.0	0.91	36.1	1.01	39.98
	%Recovery	89	98	91	90	101	100
	%RSD	8.1	5.7	5.1	3.0	3.6	0.4
6AM	Mean concent. (ng/mg)	0.87	40.3	0.92	37.6	0.99	40.0
	%Recovery	87	101	92	94	99	100
	%RSD	6.6	6.9	6.0	7.0	2.1	0.7
BZE	Mean concent. (ng/mg)	0.89	36.3	0.97	39.6	0.99	40.0
	%Recovery	89	91	97	99	99	100
	%RSD	3.4	3.4	9.0	1.1	3.1	0.6
Cocaine	Mean concent. (ng/mg)	0.96	36.0	1.02	35.3	1.00	40.0
	%Recovery	96	90	102	88	100	100
	%RSD	6.5	4.0	6.7	4.2	2.7	0.6
Cocaethylene	Mean concent. (ng/mg)	0.87	35.8	0.86	35.2	1.00	40.0
	%Recovery	87	89	86	88	100	100
	%RSD	6.8	6.0	1.1	2.8	2.2	0.8

Table 4. Concentration range of drugs in human hair samples (n=6) from forensic cases obtained by different extraction methods. ANOVA analysis demonstrating the absence of statistical significance (95% confidence level) for the factor extraction method.

Procedure	Concentration range (ng/mg)	
	BZE	Cocaine
Acid digestion	0.40-1.92	1.67-28.29
Enzymatic digestion	0.57-2.21	2.12-33.86
Microwave-assisted extraction	0.42-2.03	1.76-34.63

Factor	ANOVA	
	F-ratio	p-Value
Extraction procedure	0.11	0.90
Drug	11.74	0.00
Sample	5.72	0.00

3.5. Application of the method to hair samples from multidrug abusers

The applicability of the MAE-HPLC/DAD proposed method was checked by analysing in duplicate N= 46 real hair samples from drug abusers who consumed different types of drugs under study (Table 5). The only drug detected in 35 samples was cocaine; heroin was found in only 2 cases, and the 2 drugs combined in 9 cases. In most of the hair samples positive for opiates, the concentration of 6AM was higher (8 cases) than that of its metabolite morphine (6 cases). Cocaine also tended to be found in higher concentrations than its two metabolites, BZE and CCE. The overwhelming presence of BZE, in 44 cases, may be attributed to the rapid biotransformation of cocaine, while the presence of CCE in 5 cases would suggest the combined use of cocaine and ethyl alcohol. These findings demonstrate that 6AM and BZE are good markers of the consumption of heroin and cocaine, respectively. Figure 5 shows the two chromatograms obtained after the optimization of the MAE process for a hair sample from a drug user, determining cocaine (27.3 ng/mg), BZE (3.6 ng/mg) at $\lambda = 233$ nm, and 6AM (7.4 ng/mg) and morphine (4.8 ng/mg) at $\lambda = 285$ nm.

Table 5. Analytical results from N=46 real hair samples from multidrug abusers using the proposed MAE-HPLC-DAD method.

Case sample number	Concentration values (ng/mg)					
	Morphine	Codeine	6AM	BZE	Cocaine	Cocaethylene
1	-	2.57	9.85	-	-	-
2	-	-	-	1.85	11.52	-
3	-	-	-	0.45	3.23	-
4	-	-	-	0.42 ^a	1.76	-
5	-	-	-	7.95	34.63	-
6	-	-	-	0.57	2.97	-
7	-	-	-	2.03	6.43	-
8	-	-	-	6.44	29.32	-
9	-	-	-	17.29	56.25 ^b	-
10	-	-	-	3.65	23.90	-
11	-	-	-	0.76	4.54	-
12	7.42	-	4.80	36.11	171.09 ^b	-
13	-	-	-	1.51	7.41	-
14	-	-	-	13.18	157.94 ^b	-
15	-	-	-	3.67	25.60	-
16	-	-	-	4.29	52.99 ^b	-
17	-	-	-	4.03	48.71 ^b	-
18	-	-	-	31.38	141.33 ^b	-
19	-	-	-	1.93	4.79	-
20	-	-	-	16.07	64.49 ^b	-
21	3.61	1.34	-	-	-	-
22	-	-	-	7.32	29.97	-
23	-	-	-	3.63	27.30	-
24	-	-	-	0.78	-	-
25	-	-	-	2.80	5.23	-
26	-	-	-	2.93	-	-
27	-	0.31	0.94	5.22	3.16	-
28	0.62	-	-	16.35	10.68	-
29	0.71	-	-	29.11	17.43	-
30	0.85	-	2.74	4.99	3.39	-
31	-	-	3.97	0.69	2.32	0.66
32	-	-	-	0.39 ^a	-	0.41
33	-	-	-	0.36 ^a	-	4.32
34	3.41	8.91	12.93	4.14	5.90	2.87
35	-	-	-	15.20	7.96	-
36	-	-	-	0.34 ^a	-	-
37	-	-	-	0.57	-	-
38	-	-	-	0.51	-	-
39	-	-	1.58	7.10	8.89	-
40	-	-	-	4.59	5.04	-
41	-	-	-	17.48	8.30	-
42	-	-	-	0.77	2.92	<LOQ
43	-	-	-	1.15	-	<LOQ
44	-	-	-	0.39 ^a	-	1.14
45	-	-	-	0.39 ^a	1.27	-
46	-	-	7.50	45.83 ^b	25.05	-

-: Not detected.

^a Results obtained by MAE using 100 mg of hair sample. ^b Results obtained by MAE using a dilution step.

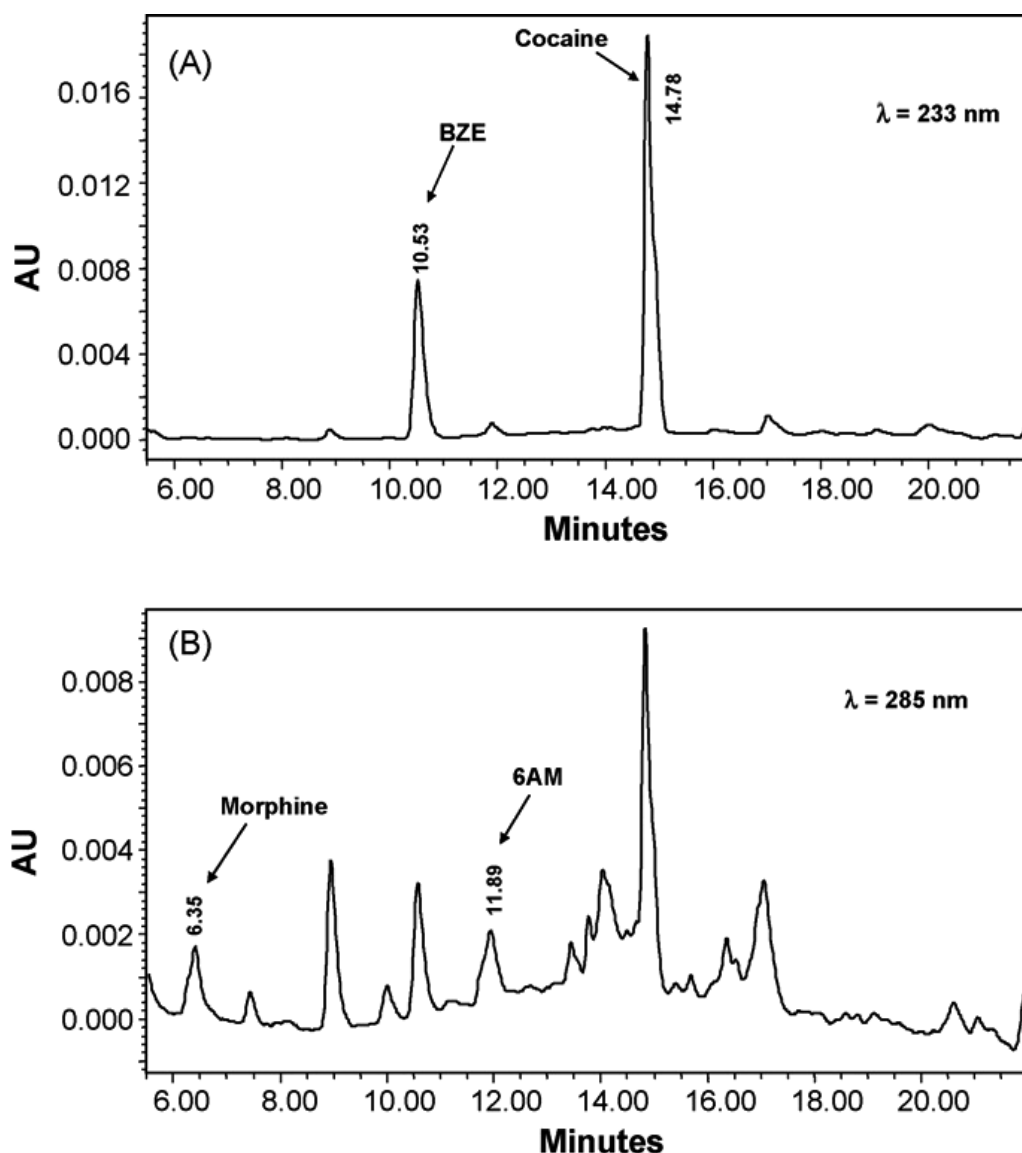


Figure 5. Chromatograms for drug separation after MAE-HPLC/DAD method corresponding to a hair sample from consumer, monitoring at $\lambda=233 \text{ nm}$ (A) and at $\lambda=285 \text{ nm}$ (B). MAE optimal conditions: 60°C , 9 min, 11 mL DCM, 0.5 mL methanol.

4. CONCLUSIONS

This paper describes a simple and fast sample preparation method based on a microwave-assisted extraction with HPLC/DAD determination and has proved that it is an efficient and quantitative procedure for the simultaneous detection and analysis of six drugs of abuse in the hair of heroin and/or cocaine users.

Application of a hybrid design and desirability functions allowed the optimization of MAE parameters. The variables investigated were extraction temperature, extraction time, solvent volume and MeOH, as modifier, volume. The total time of analysis, which is now becoming one of the most important factors, was significantly decreased when microwave energy was applied. MAE is faster (9 min) than the conventional digestion procedures and besides, simultaneous extractions can be performed in a microwave oven while only sequential extractions can be conducted with conventional hydrolysis. With regard to the straightforward methodology used, the MAE technique is clearly better than traditional procedures since MAE does not require additional cleanup steps.

The use of DAD does not require previous derivatization and improves the method's selectivity by facilitating the selection of the optimal wavelength for the maximal chromatographic response of the analytes.

Although methods such LC-MS/MS do provide high selectivity and sensitivity, not all laboratories have access to these instruments. For this reason and on the basis of the levels usually found in real samples, the method proposed here is a good analytical tool that will be useful in determining the previous history of drug abuse and it meets all the necessary requisites to be implemented in a clinical and/or forensic Toxicology Laboratory.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors gratefully acknowledge funding from Spain's CICYT (Project BF12002-03385).

REFERENCES

- [1] M. Montagna, A. Poletini, C. Stramesi, A. Groppi, C. Vignali, *Forensic Sci. Int.* 128 (2002) 79.
- [2] W.E. Brewer, R.C. Galipo, K.W. Sellers, S.L. Morgan, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2371.
- [3] C. Gambelungho, R. Rossi, C. Ferranti, R. Rossi, M. Bacci, *J. Appl. Toxicol.* 25 (2005) 205.
- [4] M. Felli, S. Martello, R. Marsili, M. Chiarotti, *Forensic Sci. Int.* 154 (2005) 96.

- [5] M. Kłys, S. Rojek, J. Kulikowskab, E. Bożek, M. Scisłowski, *J. Chromatogr. B* 854 (2007) 299.
- [6] K.B. Scheidweiler, M.A. Huestis, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4358.
- [7] F. Pragst, M.A. Balikova, *Clin. Chim. Acta* 370 (2006) 17.
- [8] C. Hoelzle, F. Scheufler, M. Uhl, H. Sachs, D. Thieme, *Forensic Sci. Int.* 176 (2008) 13.
- [9] C. Jurado, H. Sachs, *Forensic Sci. Int.* 133 (2003) 175.
- [10] V.A. Boumba, K.S. Ziavrou, T. Vougiouklakis, *Int. J. Toxicol.* 25 (2006) 143.
- [11] L. Skender, V. Karačić, I. Brčić, A. Bagarić, *Forensic Sci. Int.* 125 (2002) 120.
- [12] K.B. Scheidweiler, E.J. Cone, E.T. Moolchan, M.A. Huestis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313 (2005) 909.
- [13] K.M. Clauwaert, J.F. Van Bocxlaer, W.E. Lambert, E.G. Van den Eeckhout, F. Lemièere, E.L. Esmans, A.P. De Leenheer, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2336.
- [14] R.B. Paulsen, D.G. Wilkins, M.H. Slawson, K. Shaw, D.E. Rollins, *J. Anal. Toxicol.* 25 (2001) 490.
- [15] R. Gottardo, F. Bortolotti, G. De Paoli, J.P. Pascali, I. Mikšík, F. Tagliaro, *J. Chromatogr. A* 1159 (2007) 185.
- [16] C. Girod, C. Staub, *Forensic Sci Int.* 117 (2001) 175.
- [17] E. Cognard, S. Rudaz, S. Bouchonnet, C. Staub, *J. Chromatogr. B* 826 (2005) 17.
- [18] C. Girod, C. Staub, *Forensic Sci Int.* 10 (2000) 261.
- [19] M. Deveaux, P. Kintz, J.P. Goullé, J. Bessard, G. Pépin, D. Gosset, *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 389.
- [20] V. Hill, T. Cairns, M. Schaffer, *Forensic Sci. Int.* 176 (2008) 23.
- [21] M. Schaffer, V. Hill, T. Cairns, *J. Anal. Toxicol.* 29 (2005) 319.
- [22] M. Míguez-Framil, A. Moreda-Piñeiro, P. Bermejo-Barrera, P. López, M.J. Tabernero, A.M. Bermejo, *Anal. Chem.* 79 (2007) 8564.
- [23] P. López, A.M. Bermejo, M.J. Tabernero, P. Fernández, I. Álvarez, *Anal. Lett.* 39 (2006) 2307.

- [24] V. Cirimele, P. Kintz, P. Mangin, *Biomed. Chromatogr.* 10 (1996) 179.
- [25] J.F. Morrison, S.N. Chesler, W.J. Yoo, C.M. Selavka, *Anal. Chem.* 70 (1998) 163.
- [26] C. Moore, C. Coulter, K. Crompton, *J. Chromatogr. B* 859 (2007) 208.
- [27] M. Ventura, C. Stramesi, S. Pichini, R. Ventura, M. Pujadas, R. Di Giovannandrea, P. Zuccaro, R. Pacifici, K. Langohr, R. De la Torre, *Forensic Sci. Int.* 176 (2008) 2.
- [28] P. Edder, C. Staub, J.L. Veuthey, I. Pierroz, W. Haerdi, *J. Chromatogr. B* 658 (1994) 75.
- [29] B. Kaufmann, P. Christen, *Phytochem. Anal.* 13 (2002) 105.
- [30] L. Chen, D. Song, Y. Tian, L. Ding, A. Yu, H. Zhang, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 151.
- [31] V. Mandal, Y. Mohan, S. Hemalatha, *Pharmacogn. Rev.* 1 (2007) 7.
- [32] P. Fernández, M. Lago, R.A. Lorenzo, A.M. Carro, A.M. Bermejo, M.J. Taberero, *J. Anal. Toxicol.* 31(2007) 388.
- [33] P. Fernández, M. Lago, R.A. Lorenzo, A.M. Carro, A.M. Bermejo, M.J. Taberero, *J. Appl. Toxicol.* 27 (2007) 373.
- [34] K. Blau, J. Halket (Eds.), *Handbook of Derivatives for Chromatography*, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 1997.
- [35] S. Paterson, N. McLachlan-Troup, R. Cordero, M. Dohnal, S. Carman, *J. Anal. Toxicol.* 25 (2001) 203.
- [36] R.A. Anderson, M.M. Ariffin, P.A.G. Cormack, E.I. Miller, *Forensic Sci. Int.* 174 (2008) 40.
- [37] M.R. Brunetto, Y. Delgado Cayama, L. Gutiérrez García, M. Gallignani, M.A. Obando, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 115.
- [38] Y. Gaillard, G. Pepin, *J. Chromatogr. A* 762 (1997) 251.
- [39] M. Concheiro, A. de Castro, O. Quintela, M. López-Rivadulla, A. Cruz, *J. Chromatogr. B* 832 (2006) 81.
- [40] E. Fuentes, M.E. Báez, R. Labra, *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 40.
- [41] C. Pizarro, J.M. González-Sáiz, N. Pérez-del-Notario, *J. Chromatogr. A* 1132 (2006) 8.

- [42] M. Careri, C. Corradini, L. Elvira, A. Mangia, J. Chromatogr. A 1152 (2007) 274.
- [43] D. Mathieu, J. Nony, R. Phan-Tan-Luu, NemrodW, ver. 2001, LPRAI, Marseille.
- [44] G.A. Lewis, D. Mathieu, R. Phan-Tan-Luu, Pharmaceutical Experimental Design, Marcel Dekker, Inc., New York, 1999.
- [45] F.T. Peters, H.H. Maurer, Accred. Qual. Assur. 7 (2002) 441.
- [46] Society of Hair Testing, Forensic Sci. Int. 145 (2004) 83.





III.2. DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PSICOFÁRMACOS EN MATRICES BIOLÓGICAS

Publicaciones relacionadas:

- P Fernández, M Lago, I Álvarez, AM Carro, RA Lorenzo. *Chromatographic Determination of Benzodiazepines in Vitreous Humor after Microwave-Assisted Extraction*. **Anal. Methods** 5: 4999-5004 (2013).

Comunicaciones relacionadas:

- C Vázquez, M Lago, P Fernández, RA Lorenzo, AM Carro, AM Bermejo, MJ Tabernero. *Determinación de varias Benzodiazepinas en Plasma por HPLC-DAD*. **XVII Congreso Español de Toxicología. Santiago de Compostela. Septiembre, 2007.**

- P Fernández, C Vázquez, M Lago, RA Lorenzo, AM Carro, AM Bermejo. *Microwave Assisted Extraction and HPLC Determination of Benzodiazepines in Human Plasma*. **32nd International Symposium on Capillary Chromatography. Riva del Garda. Mayo, 2008.**



III.2.1. Determinación cromatográfica de benzodiazepinas en humor vítreo después de optimizar su extracción asistida por microondas usando diseño experimental

El objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de un nuevo método de determinación simultánea de bromacepam, alprazolam, loracepam, lormetacepam, diacepam y tetracepam en muestras de humor vítreo humano, utilizando un procedimiento de extracción asistida por microondas y un método de cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos (MAE/HPLC-DAD), que no requiere ningún pretratamiento químico de los analitos en estudio. En los últimos años, las intoxicaciones por benzodiazepinas van en aumento debido a su bajo coste y su seguridad (las dosis tóxicas son mucho más altas que las dosis terapéuticas), pero al no hacer un correcto seguimiento de su prescripción se están convirtiendo en drogas de abuso. El humor vítreo es una matriz muy usada en la actualidad, cuando no se dispone de orina y/o sangre, sobre todo en casos de quemados o de cadáveres en descomposición; se trata de una muestra limpia, de fácil acceso, poco contaminada y de irrigación escasa que le defiende de infecciones por vía hemática. Estas características de las benzodiazepinas y de la muestra a estudiar justifican el abordaje de esta investigación, novedosa por ser la primera vez que se aplica la MAE para el aislamiento de estos fármacos a partir de esta muestra forense tan importante para el esclarecimiento de muertes sospechosas.

En los primeros experimentos realizados se han evaluado diferentes disolventes para probar su capacidad de extracción de las drogas en estudio, mostrando los mejores resultados para todas las benzodiazepinas cuando se usa el acetato de etilo. También se realizaron extracciones utilizando diferentes temperaturas, tiempos y volúmenes de disolvente, llegando a la conclusión de que el dominio experimental a estudiar se encuentra entre 60 y 120°C para la temperatura de extracción, entre 5 y 15 minutos para el tiempo de extracción, y entre 5 y 15 mL del disolvente previamente seleccionado (acetato de etilo). Para estudiar la influencia de los factores sobre el proceso de extracción se realiza un *diseño de superficie de respuesta central compuesto*, que estudia 5 niveles de cada uno de ellos e implica 16 experimentos. A la vista de los gráficos de superficie de respuesta, no es posible obtener las condiciones óptimas para todos los analitos estudiados; por ello se hace uso del algoritmo basado en funciones de deseabilidad (no lineales y de tipo unilateral izquierdo), observando los mejores resultados cuando se realiza la extracción con 10 mL de acetato de etilo, 98°C de temperatura y 10 minutos de tiempo de extracción (para una deseabilidad del 100%).

Paralelamente, se procedió a la validación del método cromatográfico para determinar las benzodiazepinas en humor vítreo humano, después de optimizar la separación de los analitos en base a la composición y flujo de la fase móvil, y al tipo de columna usada. Los resultados obtenidos son adecuados considerando los objetivos propuestos. La linealidad se cumple en el rango de concentraciones 0.05-5 $\mu\text{g/mL}$ en humor vítreo, los límites de detección oscilaron entre 10 y 13 ng/mL , los coeficientes de variación siempre fueron menores de 8%, y las recuperaciones medias estaban incluidas en el intervalo comprendido entre 88 y 101%.

Finalmente, se demostró la utilidad del método propuesto (MAE/HPLC-DAD) sobre 16 muestras de humor vítreo recibidas en el laboratorio de Toxicología Forense de la USC para su análisis e interpretación toxicológica. En primer lugar, se realizó un screening de las orinas procedentes de los mismos individuos, utilizando sucesivamente un inmunoensayo y una cromatografía de gases-espectrometría de masas, para confirmar la presencia de benzodiazepinas. A continuación, se procedió a la aplicación de nuestro método, obteniendo unos resultados que indican un mayor número de consumidores de alprazolam (nivel medio 0.44 $\mu\text{g/mL}$), lormetacepam (nivel medio 1.04 $\mu\text{g/mL}$) y diacepam (nivel medio 0.21 $\mu\text{g/mL}$), cada uno de ellos presente en cinco de los 16 casos estudiados.

CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF BENZODIAZEPINES IN VITREOUS HUMOR AFTER MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION

Purificación Fernández^a, Marta Lago^a, Iván Álvarez^a, Antonia M. Carro^b, Rosa A. Lorenzo^{*b}

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

^b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Avda. de las Ciencias s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain. Email: rosaantonia.lorenzo@usc.es

ABSTRACT

An analytical method was developed for the simultaneous determination of bromazepam, alprazolam, lorazepam, lormetazepam, diazepam and tetrazepam in vitreous humor, using microwave-assisted extraction (MAE) optimized by a central composite design followed by desirability functions, and high performance liquid chromatography coupled to a photodiode array detector (HPLC-PDA). The optimal conditions were 98°C for extraction temperature, 10 min for extraction time, and ethyl acetate (10 mL) as solvent. The extract was evaporated to dryness, redissolved in 100 µL of mobile phase, and injected (30 µL) into a XBridge™ Shield RP18 column (250 x 4.6 mm id, 5 µm particle size). The mobile phase, composed of acetonitrile and 0.02M phosphate buffer pH 6, was eluted at a flow rate of 0.8 mL/min in gradient mode. The response of the detector was linear in the range of 0.05 to 5 µg/mL vitreous humor, the limits of detection ranged between 10 and 13 ng/mL, and the coefficients of variation were always lower than 10%. The mean recoveries oscillated between 87.6% for diazepam and 101.2% for lormetazepam. Finally, the MAE/HPLC-PDA method was successfully applied to 16 vitreous humor samples from individuals intoxicated with benzodiazepines, being alprazolam, lormetazepam and diazepam the most frequently found of these substances.

Keywords: Benzodiazepines, Vitreous humor, MAE, HPLC-PDA

INTRODUCTION

Poisoning by benzodiazepines (BZDs) is a health hazard because of their addictive nature, discovered in 1961. Over the years, the consumption of benzodiazepines spread among the drug dependent population and became noticeable in drug facilitated assault cases and road accidents. Improvement of the analytical methodology required for detecting the presence of these drugs in biological samples is of great importance for forensic toxicology, in order to correctly diagnose an exposure or a poisoning.¹

Microwave-assisted extraction (MAE) is simple, rapid and selective, with better or similar recoveries than those obtained in conventional extraction processes. It requires less energy and lower solvents volumes and generates less waste, being considered as a clean technique.² The effect of microwave energy depends strongly on the nature of the solvent and the matrix. The solvent chosen must have a high dielectric constant in order to absorb large quantities of microwave energy, to heat and to improve the effectiveness of extraction. However, in some cases it is convenient to heat only the biological matrix, maintaining the drugs in a cold solvent to prevent degradation of thermolabile compounds.³ The suitability of MAE has been demonstrated for the analysis of drugs of abuse in urine,⁴ hair,⁵ plasma⁶ and vitreous humor;⁷ analgesic and anti-inflammatory drugs in plasma and urine⁸ and benzodiazepines in plasma.⁹

Toxicological studies are usually affected by a wide range of variables and involve a large number of experiments to optimize the analytical methodology, but this problem can be overcome using experimental designs that apply a mathematical model to define a cause-effect relationship between factors affecting the system and the responses obtained.¹⁰ When it is not possible to have a mass spectrometry detector, high performance liquid chromatography with photodiode array detector (HPLC-PDA) is one of the techniques most employed because it is relatively inexpensive, and has suitable chemical selectivity associated to absorption spectra.¹¹ HPLC with PDA or other detectors has been previously used for the determination of benzodiazepines in different biological matrices such as blood, serum or plasma,¹²⁻¹⁸ urine^{19,20} and hair.²⁰⁻²² However, vitreous humor is a less studied postmortem material, although it is very useful, particularly when there is no blood and/or urine (burned or decomposing corpses), because it has a low protein content, is very stable, accessible and unpolluted.²³⁻²⁷ A HPLC-PDA method (30 min of analysis time) to determine

benzodiazepines in vitreous humor using a solid-phase extraction (SPE) procedure (2 h) was previously published by our group.²⁸ To improve these conditions, alternative methods can be developed. This paper presents, for the first time, a MAE procedure, optimized using an experimental design, to extract six benzodiazepines (bromazepam, alprazolam, lorazepam, lormetazepam, diazepam and tetrazepam) from vitreous humor. MAE involves fewer stages and less sample handling and time consumption (10 min) than the conventional SPE procedures. MAE is a good alternative approach since no cleanup step is required and among its advantages is a high extraction rate, automation feasibility, and simultaneous processing of different samples can be performed. A method of HPLC-PDA was developed to determine the analytes in a shorter analysis time of 20 min. The optimized methodology was applied to several vitreous humor samples obtained from benzodiazepine consumers which had been received in our laboratory for toxicological interpretation.

EXPERIMENTAL

Chemicals

Standards of benzodiazepines were from Cerilliant (Round Rock, TX). Gradient-grade acetonitrile, ethyl acetate and methanol were from Merck (Darmstadt, Germany). Purified water was obtained from a Milli-Q water system (Millipore, Le Mont-sur-Lausane, Switzerland). A phosphate buffer 0.02M was prepared dissolving 2.72 g of potassium dihydrogen phosphate in one litre of Milli-Q water and adjusting pH to 6.0 with potassium hydroxide. Individual stock solutions containing 1 mg/mL of each drug were prepared in methanol. Working-strength solutions containing the six benzodiazepines were made by successive dilutions of the stock solutions to obtain final concentrations of 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 and 5.0 µg/mL in vitreous humor. All solutions were stored frozen.

Instrumentation

The microwave extractor system equipped with a solvent detector was an ETHOS PLUS MPR300/12S from Milestone® (Agrigento, Italy). The system was able to extract 12 samples simultaneously in PTFE-lined extraction closed vessels under the same conditions (temperature and pressure), with simultaneous magnetic stirring of the sample and solvent inside. An inboard pressure control system was installed for monitoring and controlling

pressure and conditions inside the extraction vessels. This oven allowed a maximum of 1000 W, and the power adjusted automatically to reach and maintain the temperature selected. In this study a power of 1000 W was selected. The temperature and power conditions provided a pressure of 35 bar in the system.

Analyses were carried out with a Waters[®] 2695 chromatograph (Milford, MA) connected to a Model 996 photodiode array detector, also from Waters. Data were processed with the software Empower Pro[®]. Samples were injected onto an XBridge[™] Shield RP18 (250 x 4.6 mm id, 5 µm particle size) stainless steel column from Waters. The chromatographic separation of the benzodiazepines was optimized studying different gradients (variation of the percentages of acetonitrile and phosphate buffer throughout the time of analysis). The best peak resolution in the chromatograms was obtained when the elution was done with a mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile (A) and 0.02M phosphate buffer pH 6 (B), at a flow of 0.8 mL/min, in gradient mode: 0-1 min, 34% A and 66% B; 10 min, 46% A and 54% B; 15 min, 60% A and 40% B, and 20 min, 34% A and 66% B.

Vitreous humor samples

Drug-free vitreous humor was used for the preparation of calibration standards. Vitreous humor samples were obtained from individuals whose death was associated with benzodiazepines and heroin or benzodiazepines and cocaine. The samples were stored at 4°C, unless the analysis was delayed, in which case the samples were frozen. All studies were conducted in accordance with the World Medical Association's "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects".²⁹

Microwave-assisted extraction

After mixing 0.5 mL of vitreous humor with 1 mL of acetonitrile and centrifuging for 10 min at 14000 rpm to eliminate proteins, the supernatant was separated, and 2 mL of borate buffer (pH 9) were added to ensure that the benzodiazepines were in their non-ionized forms and could easily transfer to the organic phase. The extraction was done by stirring at 98°C for 10 min and using 10 mL of ethyl acetate. After cooling, the extraction vessels were opened and the extracts were centrifuged for 10 min at 4000 rpm to separate the organic phase from the aqueous one. The former was dried under a nitrogen stream at 40°C and the dry extract

was redissolved in 100 μL of mobile phase, consisting of 34% acetonitrile and 66% phosphate buffer (pH 6), and 30 μL were injected into the chromatograph.

Experimental design

Experimental design is applied to determine, in an efficient and informative way, the set of conditions that are required to obtain a product or process with desirable, often optimal, characteristics. Response surface methodology was selected to maximize MAE efficiency.^{30,31} Central composite design (CCD) provides a great deal of information on experiment variable effects and overall experimental error in a minimum number of required runs.^{10,31} A CCD with two central points was chosen to investigate the influence of solvent volume, extraction time and extraction temperature on the responses (peak area of each benzodiazepine) directly related to MAE. Each factor was tested at five levels: 5, 7, 10, 13 and 15 mL of solvent; 5, 7, 10, 13, and 15 min; and 60, 72, 90, 108 and 120°C. The design consisted of eight points of the full factorial design, six axial points at a distance $\alpha=1.682$, and a centred point tested two times. The experiments were randomly conducted to provide protection against the effects of lurking variables. A second-order polynomial model was fitted for each benzodiazepine response, giving an equation in the following form:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n b_{ij} x_i x_j$$

where x_i is the coded value of the factors studied (extraction temperature, time, and solvent volume) and y is the response function (peak area) obtained for each benzodiazepine. The b values are the estimated polynomial coefficients: b_0 is the intercept term, the b_i coefficients represent the main effect for each variable, the b_{ij} coefficients in the quadratic terms are responsible for the curvature effects, and b_{ij} ($i \neq j$) coefficients describe the interaction effects. The response values obtained were used to estimate the model coefficients b_i through multilinear regression by the least-squares method. The validation of the model was performed through analysis of variance (ANOVA). To establish practical compromise settings for the simultaneous compound extraction conditions, a multicriteria decision was applied, conducting the procedure using desirability functions based on partial Derringer functions.^{10,32} Each analyte response was transformed using a dimensionless partial desirability (d_i) scale, which ranged between $d=0$ for a completely undesirable response and $d=1$ for a fully desired response, without additional experiments. Non-linear left unilateral desirability functions were

required to maximize each response efficiency. A global desirability function (D), which represents the global quality of the common optimum, was calculated by combining single desirability functions, usually as the geometric mean.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of MAE

Before applying the experimental design, five different extraction solvents were evaluated under intermediate conditions: 89°C, 12 min and 8 mL of solvent. It was demonstrated that dichloromethane, methanol and hexane only extract low quantities of lorazepam, lormetazepam, alprazolam, bromazepam and/or diazepam, while the recovery of tetrazepam is low when the mixture chloroform-isopropanol (4:1, v/v) is used. Maximum efficiency was observed using ethyl acetate that enabled quantitative extraction of all benzodiazepines studied (provided in electronic supplementary information, figure S1).

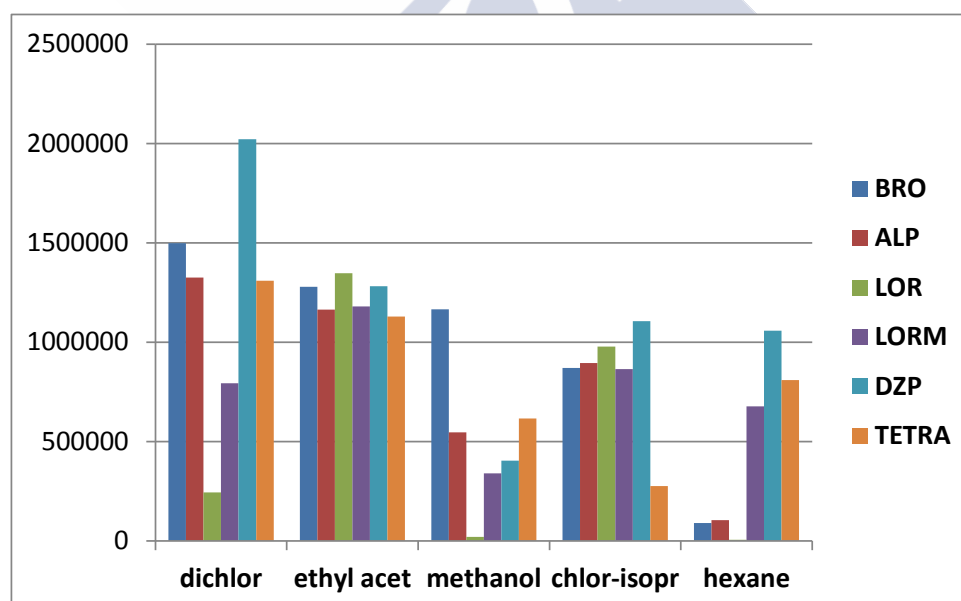


Figure S1. Influence of extraction solvent: dichloromethane, ethyl acetate, methanol, chloroform-isopropanol (4:1, v/v) and hexane.

The responses obtained from the design experiments were analyzed with the NemrodW program.³² ANOVA showed no statistical significance of the effects associated with factors and interactions. The extraction efficiency is good for the analytes, except for

tetrazepam and lorazepam, which presented a different behaviour for the volume of solvent. Figure 1 shows the three-dimensional response surfaces for values of desirability from 0.0 to 1.0. The optimum conditions of MAE for all benzodiazepines in vitreous humor correspond to the medium-high values of the three factors: a temperature of 98°C, 10 min of extraction time and 10 mL of solvent (ethyl acetate).

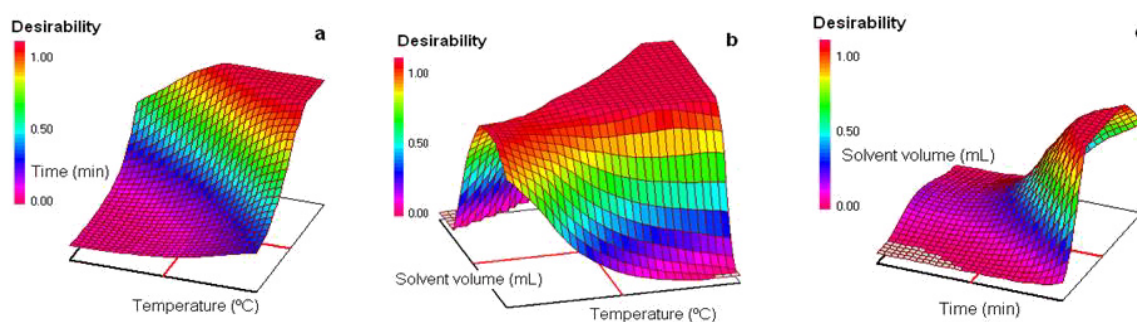


Figure 1. Response surfaces of global desirability obtained using a central composite design for the target benzodiazepines (BZDs) *versus* time and temperature (a), solvent volume and temperature (b) and solvent volume and time (c).

Validation of method

To verify the validity of the analytical methods developed and check whether they are appropriate for solving analytical problems, it is necessary to demonstrate compliance to a number of quality parameters. The criteria used in this paper are those recommended by several organizations^{33,34} and other published works,^{35,36} which study linearity, limits of detection and quantification, selectivity, precision, and accuracy (in terms of recovery).

The working wavelength was set at 230 nm, and the retention times were 8.05 min for bromazepam, 10.66 min for alprazolam, 11.99 min for lorazepam, 14.84 min for lormetazepam, 16.80 min for diazepam, and 19.41 min for tetrazepam (Figure 2a). The final analysis time was 20 min, less than the 30 min obtained by Cabarcos *et al.*²⁸ The calibration curves were established with vitreous humor samples spiked at seven concentration levels with five replicates for each level, in the range 0.05–5 µg/mL. Linearity was satisfactory for all compounds, with regression coefficients higher than 0.99 (Table 1). The limits of detection

(LOD) and quantitation (LOQ) were determined from the lowest concentrations with a signal to noise ratios of at least 3 and 10, respectively. LOD values ranged from 10 to 13 ng/mL. Table 1 shows the LOQ values. Cabarcos *et al.*²⁸ found similar LOQs for several benzodiazepines in vitreous humor, using HPLC-PDA. The selectivity is the ability of an analytical method to distinguish and quantify the analyte in the presence of endogenous components of the sample. Analyses of five drug-free vitreous humor samples showed that there are no interferences because of the lack of response at the retention times of the compounds studied (lower chromatogram in Figure 2a), proving that this method is sufficiently selective for the determination of benzodiazepines in vitreous humor.

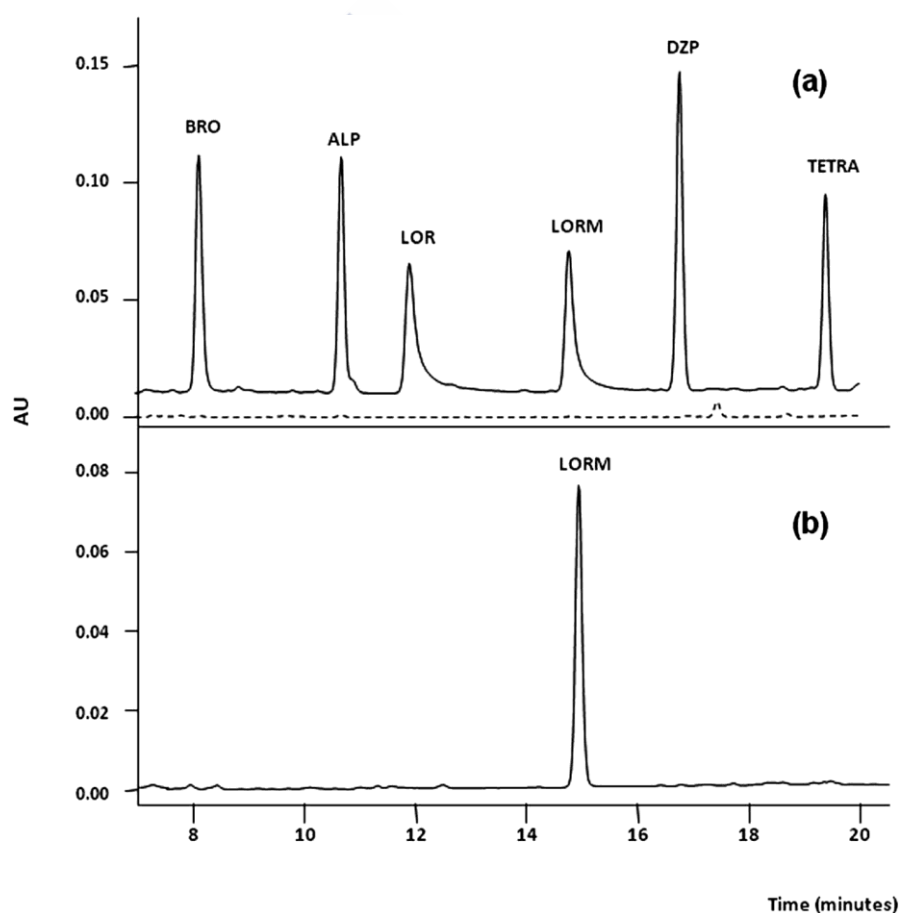


Figure 2. Chromatograms of: (a) vitreous humor containing 3 $\mu\text{g/mL}$ of all BZDs and a blank sample (---); and (b) a real vitreous humor sample containing 3.45 $\mu\text{g/mL}$ of lormetazepam. BRO: bromazepam; ALP: alprazolam; LOR: lorazepam; LORM: lormetazepam; DZP: diazepam; TETRA: tetrazepam.

The precision and accuracy (in terms of recovery) for the six benzodiazepines studied were calculated from five replicate analyses in blank vitreous humor samples spiked at three concentrations, 0.1, 1.0 and 5.0 $\mu\text{g/mL}$. The intraday precision ranged from 1.1 to 6.2% and the interday precision ranged from 3.6 to 7.9%, both expressed as relative standard deviations. The mean recoveries oscillated between $87.6 \pm 7.1\%$ for diazepam and $101.2 \pm 4.9\%$ for lormetazepam (Table 1). In view of the results, it can be stated that this is a precise and accurate method, since the relative standard deviations were below 10% and the recoveries were satisfactory with values always higher than 87%. Cabarcos *et al.*²⁸ reported higher coefficients of variation (1.6-16.8%) and lower yields (68-97%) for the same benzodiazepines in vitreous humor using SPE, a procedure more tedious than the proposed in this paper.



Table 1. Validation parameters of BZDs in vitreous humor (range 0.05-5 µg/mL).

Analyte	Linearity	r	LOQ ± SD ^a (%)(ng/mL)	Intraday precision RSD ^b (%) (n=5)			Interday precision RSD ^b (%) (n=5)			Accuracy (% recovery±RSD ^b) (n=5)		
				Low ^c	Med ^d	High ^e	Low ^c	Med ^d	High ^e	Low ^c	Med ^d	High ^e
Bromazepam	$Y = 1.82 \times 10^5 X + 2.89 \times 10^3$	0.999	32±2	2.6	2.2	1.7	7.8	5.3	6.6	100.1±1.7	95.5±3.5	98.8±6.6
Alprazolam	$Y = 1.74 \times 10^5 X + 6.58 \times 10^3$	0.999	32±2	6.2	3.9	3.4	7.9	4.9	4.0	91.6±4.0	90.9±6.1	88.5±7.3
Lorazepam	$Y = 1.52 \times 10^5 X + 1.43 \times 10^4$	0.999	34±3	4.8	3.0	2.9	7.0	6.9	3.6	95.4±4.8	94.8±4.0	96.0±9.9
Lormetazepam	$Y = 1.27 \times 10^5 X - 3.50 \times 10^3$	0.999	35±2	6.1	4.9	1.1	6.6	5.2	4.9	94.5±0.2	96.9±3.3	101.2±4.9
Diazepam	$Y = 1.98 \times 10^5 X + 2.95 \times 10^4$	0.999	30±5	2.9	3.3	2.8	6.4	6.6	6.0	87.6±7.1	89.5±6.0	93.7±2.9
Tetrazeepam	$Y = 1.14 \times 10^5 X + 5.10 \times 10^4$	0.998	35±5	3.7	3.4	2.7	7.2	7.3	7.8	100.3±2.7	97.2±4.8	99.1±5.3

^aStandard deviation. ^bRelative standard deviation. ^cLow level, 0.1 µg/mL. ^dMedium level, 1 µg/mL. ^eHigh level, 5 µg/mL.

Analyses of real cases

The optimized methodology was applied to 16 vitreous humor samples, obtained from benzodiazepine users, and the results (Table 2) indicate that the most consumed benzodiazepines were alprazolam (mean 0.44 $\mu\text{g/mL}$), lormetazepam (mean 1.04 $\mu\text{g/mL}$) and diazepam (mean 0.21 $\mu\text{g/mL}$). A chromatogram corresponding to a real case of lormetazepam poisoning is shown in Figure 2b. Screening analysis from urine of the same individuals was also carried out by immunoassay methods and GC-MS and the presence of these drugs was confirmed.³⁷

Table 2. Concentration of BZDs in 16 real vitreous humor samples.

BZD	Frequency	Concentration range ($\mu\text{g/mL}$)
Bromazepam	1/16	0.50
Alprazolam	5/16	0.08-1.17
Lorazepam	1/16	0.14
Lormetazepam	5/16	0.11-3.45
Diazepam	5/16	0.06-0.41
Tetraazepam	2/16	0.10-0.19

Teixeira *et al.*²⁵ reported a pharmacokinetic study of diazepam in rabbits, obtaining mean levels (n=4) from 0.024 to 0.014 $\mu\text{g/mL}$ at 0.5 and 6 h post-administration, respectively. Scott and Oliver²⁶ applied supercritical fluid extraction and HPLC-UV to analyze 12 human vitreous humor samples, showing diazepam concentrations between 0.01 and 2.48 $\mu\text{g/mL}$. Cabarcos *et al.*²⁸ analyzed 50 vitreous humor samples from deaths related to benzodiazepines, heroin and/or cocaine, and found concentrations ranging from 0.03 $\mu\text{g/mL}$ for bromazepam to 1.08 $\mu\text{g/mL}$ for tetrazepam. Jenkins *et al.*³⁸ published a SPE/HPLC-UV method to study a fatality due to alprazolam intoxication, with levels of 0.58 $\mu\text{g/mL}$ in vitreous humor and 2.1 $\mu\text{g/mL}$ in blood. Pelander *et al.*³⁹ applied SPE and Liquid Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry (LC-TOFMS) to 50 vitreous humor samples from individuals whose deaths could be attributed to drugs, and detected three benzodiazepines and two metabolites in 16 cases (32%).

The dose administered and the time elapsed from ingestion to death and from death to sample collection is frequently unknown, complicating the interpretation of the results. Furthermore, there are few published reports in which concentrations of these substances in vitreous humor were determined. So far it is only possible to correlate the presence of benzodiazepines in vitreous humor with a consumption of these drugs, but this information could be important for the investigation of the death.

CONCLUSION

This work describes for the first time how MAE-HPLC/PDA can be used to extract and determine benzodiazepines in vitreous humor, a biological material of easy access that is not frequently contaminated, thus being very useful when blood is unavailable. The technique is rapid since twelve extractions can be made simultaneously and it does not require a clean-up step after MAE. Analysis of vitreous humor samples confirms the suitability of MAE-HPLC/PDA for routine determination of benzodiazepines in postmortem toxicological analyses, due to its adequate selectivity and sensitivity.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Xunta de Galicia (Projects: 10PXIB208089PR and 10TAL209005PR).

REFERENCES

1. O. H. Drummer, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **388**, 1495.
2. R. Cela, E. Martinez and A. M. Carro, *Técnicas de separación en química analítica*, Editorial Síntesis, Madrid, 2002.
3. C. S. Eskilsson and E. Björklund, *J. Chromatogr. A*, 2000, **902**, 227.
4. P. Fernández, M. Lago, R. A. Lorenzo, A. M. Carro, A. M. Bermejo and M. J. Tabernero, *J. Appl. Toxicol.*, 2007, **27**, 373.
5. P. Fernández, M. Lago, R. A. Lorenzo, A. M. Carro, A. M. Bermejo and M. J. Tabernero, *J. Anal. Toxicol.*, 2007, **31**, 388.

6. P. Fernández, M. Lago, R. A. Lorenzo, A. M. Carro, A. M. Bermejo and M. J. Taberero, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2009, **877**, 1743.
7. P. Fernández, S. Seoane, C. Vázquez, A. M. Bermejo, A. M. Carro and R.A. Lorenzo, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **401**, 2177.
8. P. Fernández, A. M. Fernández, A. M. Bermejo, R. A. Lorenzo and A. M. Carro, *J. Sep. Sci.*, 2013, **36**, 1446.
9. P. Fernández, C. Vázquez, R. A. Lorenzo, A. M. Carro, I. Álvarez and P. Cabarcos, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **397**, 677.
10. G. A. Lewis, D. Mathieu and R. Phan-Tan-Luu, *Pharmaceutical experimental design*, Marcel Dekker, New York, 1999.
11. F. Pragst, M. Herzler and B.-T. Erxleben, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2004, **42**, 1325.
12. A. Bugey and C. Staub, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, **35**, 555.
13. F. Dussy, C. Hamberg and T. Briellman, *Int. J. Legal Med.*, 2006, **120**, 323.
14. A. El Mahjoub and C. Staub, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, **23**, 447.
15. T. Laurito, G. Mendes, V. Santagada and G. Caliendo, *J. Mass Spectrom.*, 2004, **39**, 168.
16. L. Mercolini, R. Mandrioli and C. Iannello, *Talanta*, 2009, **80**, 279.
17. M. R. Rouini, Y. H. Ardakani, K. A. Moghaddam and F. Solatani, *Talanta*, 2008, **75**, 671.
18. V. Samanidou, A. Pechlivanidou and I. Papadoyannis, *J. Sep. Sci.*, 2007, **30**, 679.
19. S. M. El-Gizawy, *Anal. Lett.*, 2000, **33**, 629.
20. M. Laloup, M. Ramirez, M. Wood and V. Maes, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **388**, 1545.
21. K. S. Scott and Y. Nakahara, *Forensic Sci. Int.*, 2003, **133**, 47.
22. K. Y. Rust, M. R. Baumgartner, N. Meggiolaro and T. Kraemer, *Forensic Sci. Int.*, 2012, **215**, 64.

23. N. Fucci, N. De Giovanni, F. De Giorgio, R. Liddi and M. Chiarotti, *Forensic Sci. Int.*, 2006, **156**, 102.
24. A. Thierauf, F. Musshoff and B. Madea, *Forensic Sci. Int.*, 2009, **192**, 78.
25. H. M. Teixeira, F. Reis, P. Proença, P. Ramos, O. Quintela, M. López-Rivadulla, E. Marqués and D. N. Vieira, *Hum. Exp. Toxicol.*, 2004, **23**, 571.
26. K. S. Scott and J. S. Oliver, *Forensic Sci. Int.*, 2001, **46**, 694.
27. N. Cartiser, F. Bévalot, C. Le Meur, Y. Gaillard, D. Malicier, N. Hubert and J. Guittou, *J. Chromatogr. B*, 2011, **879**, 2909.
28. P. Cabarcos, M. J. Taberner, I. Álvarez, P. López, P. Fernández and A. M. Bermejo, *J. Anal. Toxicol.*, 2010, **34**, 539.
29. J. R. Williams, *Bull. W. H. O.*, 2008, **86**, 650.
30. T. P. Ryan, *Modern Experimental Design*, Wiley, New Jersey, 2007.
31. R. H. Myers, D. C. Montgomery and C. N. Anderson-Cook, *Response surface methodology*, Wiley, Totowa, 2009.
32. D. Mathieu, J. Nony and R. Phan-Tan-Luu, *NemrodW[®]*, versión 2000, LPRAI, Marseille, 2000.
33. Food and Drug Administration, US Department of Health and Human Services, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2001. <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>
34. International Conference of Harmonization, Validation of analytical procedures: Methodology ICH Q2B, 2005. <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>
35. V. P. Shah, K. K. Midha, J. W. A. Findlay, H. M. Hill, J. D. Hulse, I. J. McGilveray, G. McKay and K. J. Miller, *Pharm. Research.*, 2000, **17**, 1551-1557.
36. F. T. Peters and H. H. Maurer, *Accredit. Qual. Assur.*, 2002, **7**, 441.
37. J. A. Baz, M. J. Taberner, A. M. Bermejo, I. Álvarez, P. Cabarcos, *Rev. Toxicol.*, 2011, **28**, 56.
38. A. J. Jenkins, B. Levine, J. L. Lock and J. E. Smialek, *J. Anal. Toxicol.*, 1997, **21**, 218.
39. A. Pelander, J. Ristimaa and I. Ojamperä, *J. Anal. Toxicol.*, 2010, **34**, 312.



CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES



IV. CONCLUSIONES

Drogas de abuso en plasma

1. Se ha puesto a punto un método de cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos (HPLC-DAD) para la identificación y determinación simultáneas de morfina, codeína, 6-acetilmorfina, benzoilecgonina, cocaína, cocaetileno, metadona y EDDP en plasma. La validación del método cromatográfico arrojó unos resultados satisfactorios para la linealidad en el rango 0.05-2 $\mu\text{g/mL}$, los límites de detección estaban comprendidos entre 10 y 40 ng/mL , los coeficientes de variación fueron inferiores al 7.5%, y los errores relativos se encontraban en el rango 0.1-6.9%.

2. Se optimizó un procedimiento de preparación de la muestra basado en la energía de microondas, una técnica sencilla, rápida y muy novedosa en su aplicación a muestras biológicas. Se aplicó un diseño factorial parcial ($2^1.3^2 // 9$), concluyendo que las condiciones más favorables para la extracción son: 1 mL de plasma, 10 mL de cloroformo, 10 minutos y 75°C. Se obtuvieron unas recuperaciones comprendidas entre 68 y 83%.

3. El método analítico propuesto (MAE/HPLC-DAD) ha sido aplicado con éxito a muestras de plasma, procedentes de 20 sujetos intoxicados vivos y 18 muertos, tras el consumo de drogas de abuso. Del total de los individuos estudiados, 7 consumieron las tres drogas (heroína, cocaína y metadona), 26 tomaron dos drogas y 5 estuvieron expuestos a una sola droga.

Drogas de abuso en orina

4. Se ha desarrollado un método de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de red de diodos (HPLC-DAD) para la separación de morfina, codeína, 6-acetilmorfina, benzoilecgonina, cocaína, cocaetileno, metadona y EDDP en orina. Los parámetros de validación obtenidos fueron aceptables en el rango 0.1-4 $\mu\text{g/mL}$, como reflejan los coeficientes de correlación superiores a 0.997, los coeficientes de variación inferiores al 8%, los errores relativos en el rango $\pm 6.1\%$, y los límites de detección entre 20 y 80 ng/mL .

5. La extracción asistida por microondas presentó numerosas ventajas en la separación de las drogas de abuso a partir de la orina: buenas recuperaciones y escasa manipulación de la muestra que no necesita tratamientos previos. La utilización de un diseño factorial completo ($2^2 \cdot 3^1 // 12$) permitió obtener las condiciones más favorables: 1 mL de orina, pH 9, 100°C, 10 minutos y 10 mL de cloroformo. Las recuperaciones obtenidas estaban en el rango 61-109%.

6. La utilidad del método desarrollado (MAE/HPLC-DAD) fue demostrada después de su aplicación a 38 muestras de orina procedentes de 21 intoxicados vivos y 17 muertos, tras el consumo de drogas de abuso. Se detectaron las tres drogas y/o sus metabolitos en 12 sujetos (8 vivos y 4 muertos), dos drogas en 23 sujetos (12 vivos y 11 muertos) y una droga en 3 sujetos (1 vivo y 2 muertos).

Drogas de abuso en saliva

7. En primer lugar, se ha validado un método de cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos para la determinación simultánea de morfina, 6-acetilmorfina, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metadona y EDDP en saliva. Se obtuvo una buena linealidad en el rango 0.05-2 µg/mL, unos límites de detección entre 10 y 35 ng/mL, y unos coeficientes de variación siempre inferiores al 4.6%.

8. Paralelamente se optimizaron dos procedimientos de extracción y se compararon los resultados obtenidos. La extracción líquido-líquido se realizó en Toxitubos A, usando 1 mL de saliva a pH 9. Para la extracción asistida por microondas (MAE), se mezcló 1 mL de saliva con 10 mL de cloroformo y se mantuvo a 100°C durante 10 minutos. Se demostró una buena selectividad en ambos procesos, y las recuperaciones se situaron en los rangos 53-95% para LLE y 83-100% para MAE, lo que demuestra la mayor eficacia de la extracción asistida por microondas frente a la extracción líquido-líquido.

9. Los dos métodos propuestos (LLE/HPLC-DAD y MAE/HPLC-DAD) fueron aplicados a 24 muestras de saliva procedentes de usuarios crónicos de opiáceos y/o cocaína, detectándose consumo de cocaína en 22 casos, de metadona en 12 casos y de heroína en 8 casos. Los niveles de las drogas originales resultaron ser mayores que los de sus metabolitos, aunque se observaron diferencias interindividuales, atribuibles a la dosis, pH de la saliva y la forma de recogida de la muestra.

Drogas de abuso en pelo

10. Se ha optimizado un método de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de red de diodos (HPLC-DAD) para la determinación de morfina, codeína, 6-acetilmorfina, benzoilecgonina, cocaína y cocaetileno en pelo. La linealidad se cumple en el rango de 0.5-40 ng/mg, con coeficientes de correlación superiores a 0.999, el límite de cuantificación es 0.2 ng/mg para todas las drogas estudiadas, los coeficientes de variación siempre son menores del 4%, y las recuperaciones medias están incluidas en el intervalo 99-101%.

11. Después de seleccionar el diclorometano como disolvente de extracción, se optimizó un proceso de extracción asistida por microondas, realizando un diseño híbrido de dominio esférico. Las mejores respuestas fueron obtenidas mezclando 50 mg de pelo, 0.5 mL de metanol y 11 mL de diclorometano, y calentando a 60°C, durante 9 minutos. Por tanto, requiere menos tiempo y menos coste que las extracciones convencionales usadas para esta matriz.

12. Se verificó la aplicabilidad del método (MAE/HPLC-DAD), analizando 46 muestras de pelo procedentes de sujetos consumidores de heroína, cocaína y/o metadona. Se puso de manifiesto un consumo predominante de cocaína frente a las otras drogas, gracias a la detección de benzoilecgonina en 44 casos, lo que confirma su utilidad como marcador del consumo de cocaína.

Benzodiacepinas en humor vítreo

13. En primer lugar, se realizó la validación de un método de cromatografía líquida con detector de red de diodos (HPLC-DAD) para la identificación y determinación de bromacepam, alprazolam, loracepam, lormetacepam, diacepam y tetracepam en humor vítreo humano. La linealidad se cumple en el rango de concentraciones 0.05-5 µg/mL, los límites de detección oscilaron entre 10 y 13 ng/mL, y los coeficientes de variación siempre fueron menores del 8%.

14. Después de seleccionar el acetato de etilo como disolvente, se ha optimizado un procedimiento de extracción asistida por microondas para la extracción simultánea de las seis benzodiazepinas a partir de humor vítreo mediante un diseño de superficie de respuesta central compuesto. Los parámetros que consiguen las mejores respuestas para todos los analitos en estudio son: 0.5 mL de humor vítreo, 10 mL de acetato de etilo, 98°C y 10 minutos. Las recuperaciones medias variaron entre 88 y 101%.

15. Finalmente, se aplicó con éxito el método propuesto (MAE/HPLC-DAD) a 16 muestras de humor vítreo procedentes de sujetos muertos por una sobredosis de drogas de abuso y/o benzodiazepinas. Las benzodiazepinas más consumidas resultaron ser: alprazolam, lormetacepam y diacepam, cada una de ellas detectada en 5 de los 16 casos estudiados.





ANEXO

**PUBLICACIONES CIENTÍFICAS
DERIVADAS DE LA TESIS
DOCTORAL**



Microwave-Assisted Extraction and HPLC–DAD Determination of Drugs of Abuse in Human Plasma

Purificación Fernández^{1,*}, Marta Lago¹, Rosa Antonia Lorenzo², Antonia María Carro², Ana María Bermejo¹, and María Jesús Taberero¹

¹Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, Santiago de Compostela, Spain and

²Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Santiago de Compostela, Spain

Abstract

A sample preparation procedure using microwave energy is proposed for the determination of morphine, 6-acetylmorphine, codeine, cocaine, cocaethylene, benzoylecgonine, methadone, and 2-ethylene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine in human plasma. A screening asymmetrical factorial design was used to identify the most suitable extraction conditions as regards solvent, temperature, and extraction time. The target drugs were quantified by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. The use of microwave energy was found to reduce solvent consumption and extraction time compared with solid-phase extraction. The detector response was linear over the drug concentration range of 0.05–2.0 µg/mL in human plasma. The precision and accuracy were good, with values less than 8% and 7%, respectively. Drug recoveries from spiked samples ranged from 69 to 81%. The proposed method was successfully applied to a number of forensic cases.

Introduction

Sample preparation is possibly the most important step of the analytical process inasmuch as it has a direct influence on accuracy, representativeness and precision, and hence a direct impact on the quality of the results. Microwave-assisted extraction (MAE) is especially useful with a view to reducing solvent consumption and the preparation time for complex clinical and environmental samples.

The reliability of forensic toxicological analyses depends heavily on appropriate preparation of the samples. There have been major recent developments in extraction methodology including improved solid-phase extraction (SPE) methods (1–3), and new solid-phase microextraction (SPME) (4–6) and microwave-based methods (7–12). Microwaves constitute a non-ionizing type of radiation spanning the frequency region between radio frequencies and the infrared spectrum. Currently commercially available microwave equipment allows

the safe, rapid, selective separation of analytes from complex matrices (e.g., the extraction of drugs of abuse from human fluids) at high pressures and temperatures.

This paper reports a new method to prepare human plasma for the determination of morphine, 6-acetylmorphine (6AM), codeine, methadone and its metabolite 2-ethylene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP), and cocaine and its metabolites benzoylecgonine (BEG) and cocaethylene by the use of microwave energy. The operating conditions were selected as regards solvent, temperature, and extraction time by using a factorial experimental design.

Experimental

Reagents

Standards of morphine, 6AM, cocaine, cocaethylene, BEG, methadone, and EDDP were supplied by Cerilliant (Round Rock, TX). Gradient-grade acetonitrile, methanol, chloroform, and dichloromethane were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Purified water was obtained from a Milli-Q water system from Millipore (Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland).

Plasma samples

Drug-free plasma from Transfusion Galician Centre was used for preparation of calibration standards. Plasma samples were obtained from patients on a methadone-maintenance program (MMP), patients in legal custody, patients in Galician Hospitals, and others from fatally poisoned individuals. They were stored refrigerated at 4°C, unless the analysis was delayed, in which case the samples were frozen at –18°C. All studies were conducted in accordance with the World Medical Association's "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects" and the Spanish National Law.

Preparation of calibration standards

Standards containing a 1 mg/mL concentration of each drug in methanol (morphine, codeine, BEG, methadone, and EDDP)

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: imlpuri@usc.es.

or acetonitrile (6AM, cocaine and cocaethylene) were used to prepare working-strength solutions containing a 0.5, 1, 2, 5, 10, or 20 µg/mL concentration of each drug in mobile phase (10:90, v/v, acetonitrile/phosphate buffer, pH 6.5) by appropriate dilution.

Apparatus

The microwave extractor system was an ETHOS PLUS MPR300/12S from Milestone® (Agrigento, Italy) equipped with a solvent detector. The microwave was able to extract 12 samples simultaneously in PTFE-lined extraction closed vessels under the same conditions (temperature and pressure), with simultaneous magnetic stirring of the sample and solvent inside. An in board pressure control system was installed for monitoring and controlling pressure and conditions inside the extraction vessels. This oven allows a maximum of 1000 W and the power changes in order to reach and maintain the temperature selected.

The analyses of the extracts were performed on a model 2695 chromatograph from Waters® (Milford, MA) connected to a model 996 photodiode array detector, also from Waters. Data were processed by using the software Millennium 32® v. 3.05.01 for Windows 98. Samples were injected onto an XTerra® RP8 stainless steel column (250 mm × 4.6-mm i.d., 5-µm particle size) supplied by Waters.

In order to optimize peak resolution in the chromatograms and efficient separation of the analytes in a reasonably short time (22 min), elution was done in the gradient mode, using a mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile and 20mM phosphate buffer (pH 6.5) at a variable flow rate (Table I).

The diode-array detector allowed the wavelength range 200–400 nm to be scanned in order to obtain three-dimensional (wavelength × absorbance × time) chromatograms. The sensitivity was optimized by using the wavelengths of maximal chromatographic response for the analytes (specifically, 233 nm for cocaine, BEG, and cocaethylene; 285 nm for morphine, codeine, and 6AM; and 292 nm for methadone and EDDP).

Experimental design

The extraction conditions were selected in an experimental design constructed with the aid of the software Nemrod W. 2000, LPRAI (University of Aix-Marseille III, Marseille, France). Because of the large number of variables potentially affecting

Table I. Eluent Gradient

Time (min)	Flow (mL/min)	A* (%)	B (%)
0	0.7	10	90
5	0.7	2	98
7	0.8	20	80
10	0.8	35	65
15	0.8	50	50
20	0.8	50	50
22	0.7	10	90

* A = acetonitrile and B = 20mM phosphate buffer (pH 6.5).

the efficiency of microwave assisted extraction, only a few were examined, all others being set at the optimum values found in earlier tests. A screening asymmetrical factorial design of the 2¹3²/9 type was used for this purpose (Table II). The proposed model is not predictive; rather, it measures response changes at each factor level and then determines interactions. This type of design discards non-significant factors, which reduces the number of tests needed and saves time and expenses as a result (13). We studied three factors at variable numbers of levels, namely a qualitative factor (solvent) at two levels and two quantitative factors (extraction temperature and time) at three levels each. Variables and levels were selected from a test series conducted prior to constructing the design. In these tests, we tried organic solvents with high affinity with the analytes, such as chloroform, dichloromethane, hexane, toluene, and ethyl acetate. The best results were obtained with chloroform and dichloromethane; therefore, they were included in the design. After analyzing the effect of temperature and time on the process we found that the stability of the studied drugs is not affected in the ranges studied in the design. The experimental domain comprised the following specific variables and levels: solvent (chloroform or dichloromethane), temperature (50, 75, or 100°C), and extraction time (1, 5, or 10 min).

Extraction procedure

A 1-mL sample was mixed with 10 mL of solvent and placed in the vessel of the microwave oven for extraction under the conditions of the particular test as dictated by the experimental

Table II. Design Matrix (2¹.3²)

No. Exp.	Solvent	Temperature (°C)	Time (min)
1	Chloroform	50	1
2	Chloroform	75	5
3	Chloroform	100	10
4	Dichloromethane	50	5
5	Dichloromethane	75	10
6	Dichloromethane	100	1
7	Chloroform	50	10
8	Chloroform	75	1
9	Chloroform	100	5

Table III. Linearity Data for the Standard Curves of Each Analyte (n = 5)

Compound	Linearity	Coefficient of Correlation
Morphine	y = 1737x - 934	0.9997
Codeine	y = 1800x + 679	0.9983
6AM	y = 2974x + 843	0.9995
BEG	y = 22320x + 2204	0.9989
Cocaine	y = 29470x - 5852	0.9969
Cocaethylene	y = 7765x + 4672	0.9998
EDDP	y = 285x + 77	0.9986
Methadone	y = 339x + 57	0.9996

design. Following extraction, the vessel contents were centrifuged at 4000 rpm for 20 min and the organic layer was removed for evaporation to dryness under a nitrogen stream in a thermostated bath at 40°C. Finally, the dry extract was reconstituted in 100 μL of mobile phase, and a 20- μL aliquot was injected into the chromatograph for analysis.

Results and Discussion

Once the extraction conditions were selected, plasma solutions containing the eight drugs at concentrations of 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, and 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were prepared and extracted in accordance with the described procedure for analysis by HPLC-DAD and construction of calibration curves.

The analytes were identified from their retention times (approximately 6.6 min for morphine, 11.4 min for codeine, 12.5 min for BEG, 13.0 min for 6AM, 15.0 min for cocaine, 16.0 min for cocaethylene, 17.6 min for EDDP, and 18.6 min for methadone) and absorption spectra. The HPLC-DAD technique exhibited a high specificity by virtue of its allowing the analytes to be discriminated from other substances with identical retention times potentially present in plasma. Also, it provided a high sensitivity as a result of it allowing the maximum absorption wavelength for each analyte (specifically 233 nm for BEG, cocaine, and cocaethylene; 285 nm for morphine, codeine, and 6AM; and 292 nm for EDDP and methadone) to be monitored.

The calibration curves for the analytes were linear over the concentration range 0.05–2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in plasma, and their correlation coefficients were all greater than 0.997. A linear regression analysis of the type $y = ax + b$ provided additional useful parameters such as the slope and intercept (Table III). By way of example, Figure 1 shows the chromatogram for a plasma sample containing a 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration of each analyte as monitored at 233 nm.

The chromatographic conditions used to separate the studied drugs were selected from a series of tests involving various types of columns, mobile phases and gradients.

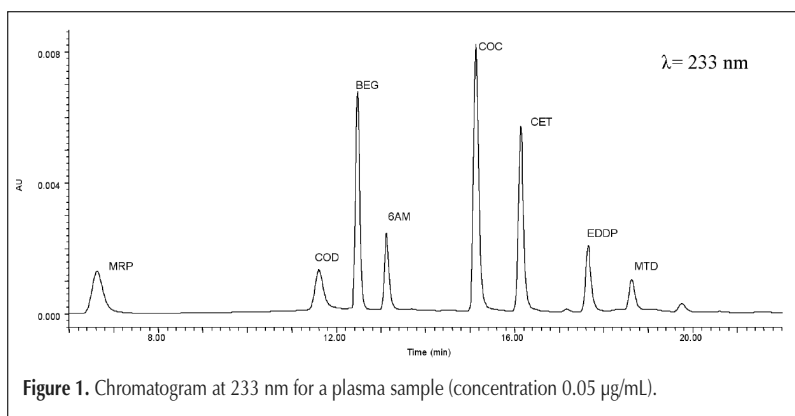


Figure 1. Chromatogram at 233 nm for a plasma sample (concentration 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

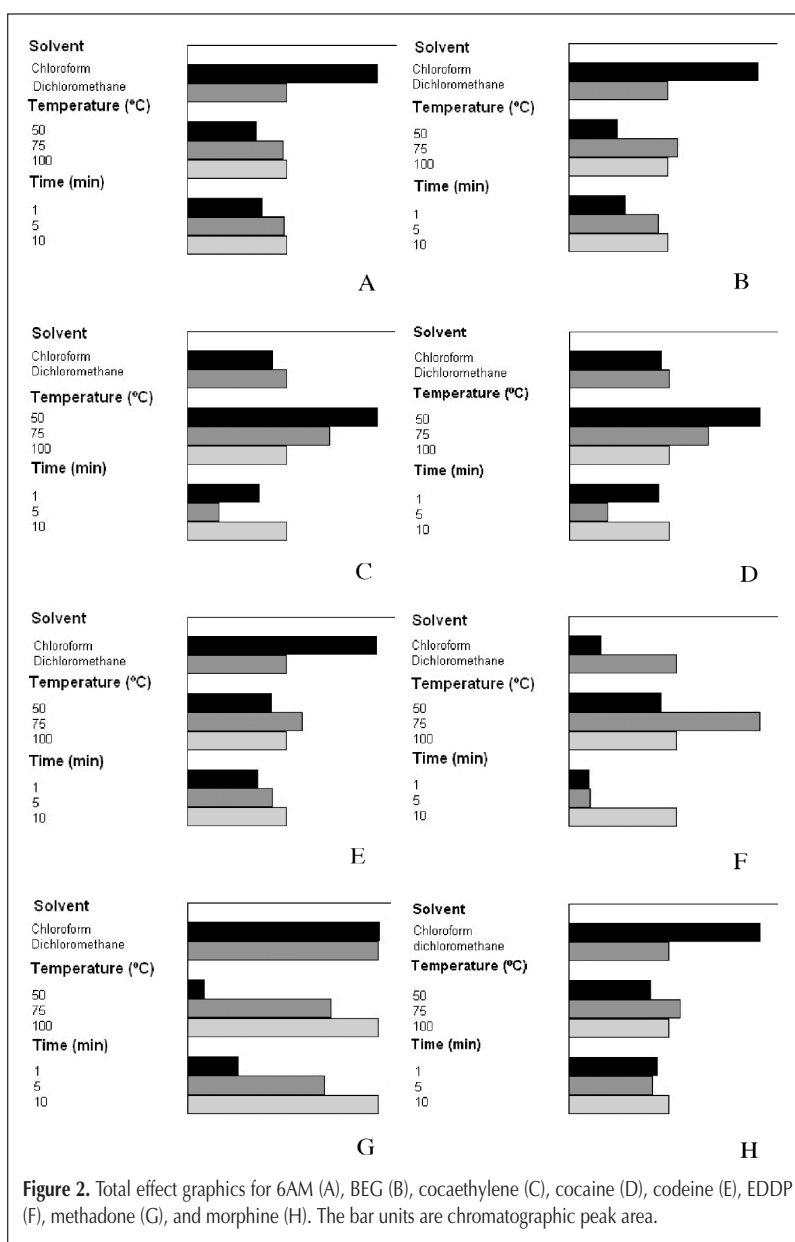


Figure 2. Total effect graphics for 6AM (A), BEG (B), cocaethylene (C), cocaine (D), codeine (E), EDDP (F), methadone (G), and morphine (H). The bar units are chromatographic peak area.

Application of the described extraction procedure to drug-free plasma samples revealed the absence of interferences in the chromatographic regions of interest for the analytes.

The results obtained in this work were examined with the aid of graphic tools supplied by the software used (Nemrod) including the total effects graph, the bars in which are propor-

tional in length to the effect of each factor level on the analytical response.

As can be seen in Figure 2, chloroform provides better responses for 6AM (A), BEG (B), codeine (E), and morphine (H); it appeared as statistically significant effect for these drugs. This solvent practically provides the same effect as dichloromethane

Table IV. Within-Day and Between-Day Precision and Accuracy and Recoveries

Compound	Concentration (µg/mL)	Precision RSD (%)		Accuracy		Recovery (%)
		Within-Day (n = 5)	Between-Day (n = 5)	Rel. Error (%) Within-Day (n = 5)	Rel. Error (%) Between-Day (n = 5)	
Morphine	0.05	2.09	7.22	0.62	5.12	80.60
	0.5	6.94	3.97	2.25	3.44	
	2.0	3.91	1.55	3.37	1.88	82.96
Codeine	0.05	0.77	2.18	2.80	4.20	76.58
	0.5	6.01	4.30	3.65	2.80	
	2.0	2.85	0.88	1.26	1.84	77.94
6AM	0.05	2.08	7.14	0.37	5.52	70.10
	0.5	5.49	4.95	3.20	1.24	
	2.0	2.38	1.23	3.81	1.63	68.42
BEG	0.05	0.96	2.81	1.89	4.64	75.69
	0.5	6.25	3.16	3.05	6.89	
	2.0	1.94	0.85	2.88	0.93	78.35
Cocaine	0.05	1.38	3.04	0.52	3.92	71.01
	0.5	2.26	4.79	3.15	4.36	
	2.0	1.82	1.56	0.62	0.65	69.73
Cocaethylene	0.05	3.25	4.43	0.88	5.72	78.10
	0.5	4.90	1.91	3.20	0.64	
	2.0	1.96	1.29	2.17	0.73	82.02
EDDP	0.05	0.97	6.08	0.12	3.72	72.18
	0.5	4.56	2.11	1.75	2.80	
	2.0	2.43	1.54	0.20	0.13	77.50
Methadone	0.05	1.53	3.29	0.39	2.00	77.83
	0.5	2.09	1.56	0.62	1.99	
	2.0	6.94	1.36	2.25	0.15	71.33

Table V. Drug Concentrations (µg/mL) Found in Human Plasma from Drug Addicts

	Morphine	Codeine	6AM	BEG	Cocaine	Cocaethylene	EDDP	Methadone
Positive cases	12	5	7	14	8	9	8	10
Maximum level	1.60	1.26	0.96	1.76	1.96	1.16	1.09	1.53
Minimum level	0.05	0.06	0.05	0.05	0.08	0.08	0.32	0.07
Mean	0.71	0.80	0.38	0.77	0.84	0.42	0.66	0.63
Standard deviation	0.57	0.45	0.31	0.53	0.60	0.40	0.27	0.48

Table VI. Drug Concentrations (µg/mL) Found in Human Plasma from Fatally Poisoned Individuals

	Morphine	Codeine	6AM	BEG	Cocaine	Cocaethylene	EDDP	Methadone
Positive cases	10	3	9	15	11	7	6	8
Maximum level	1.59	1.52	1.41	2.08	1.92	2.08	1.50	1.65
Minimum level	0.09	0.11	0.06	0.12	0.15	0.25	0.13	0.16
Mean	0.75	0.99	0.72	1.21	1.03	1.06	0.73	0.91
Standard deviation	0.50	0.77	0.54	0.77	0.61	0.65	0.55	0.57

for cocaethylene (C), cocaine (D), and methadone (G). Only EDDP (F) presented better responses when dichloromethane was used in MAE.

Medium level of temperature (75°C) supplied the best responses for four of the drugs: EEDP, BEG, morphine, and codeine. The methadone has shown a better response with 100°C, but very short response with 50°C. Cocaine and cocaethylene have presented better responses for low value (50°C) than medium level (75°C), but good responses were also achieved at 75°C; both of values were statistically significant for these drugs, but also 75°C has shown statistical signification for morphine and 6AM and almost statistical signification for BEG.

All of the considered drugs show the best responses when high level of time (10 min) was used in MAE. This level of time was also statistically significant for cocaine, cocaethylene and 6AM. So the most suitable conditions for extracting the eight drugs were as follows: chloroform as solvent, a temperature of 75°C and a time of 10 min.

Under these conditions, the proposed method was validated in accordance with the recommendations of Shah et al. (14) and Peters and Maurer (15). The within-day and between-day precision (RSD), and accuracy (relative error), were estimated by subjecting five samples containing the eight drugs at different concentration levels (0.05, 0.5, and 2 g/mL) to the described extraction procedure. The results thus obtained were acceptable; the RSDs were less than 8% and relative errors less than 7% in all cases (Table IV). These values are similar to those previously obtained by Caulfield and Stewart (2) and Foulon et al. (16).

The limit of quantitation (LOQ) of the method was taken to be the lowest concentration in the calibration curve (0.05 µg/mL). The limit of detection (LOD), which was taken to be the lowest concentration giving a signal three times as high as the signal-to-noise ratio, was 0.01 µg/mL for cocaine, cocaethylene and BEG; 0.03 µg/mL for morphine, 6AM and methadone; and 0.04 µg/mL for codeine and EDDP. These LOD values are similar to those previously reported by Brunetto et al. (17).

Analyte recoveries were determined at two different concentration levels (0.05 and 2.0 µg/mL). To this end, the mean area under the peak obtained from five replicate analyses of plasma spiked and extracted as described were compared with the mean area under the peak obtained from five replicate samples containing the same analyte concentrations in mobile phase using the following expression:

$$\text{Recovery (\%)} = (\text{mean area}_{\text{plasma}} / \text{mean area}_{\text{mobile phase}}) \times 100$$

The recoveries thus calculated ranged from 68% for 6AM to 83% for morphine (Table IV). These values are similar to those obtained by other authors (18,19) using SPE. The proposed MAE method is therefore quite robust and can be used for the determination of opiates and cocaine in human plasma. Microwave energy expedites extraction of the analytes while maintaining analyte recovery rates. Because the technique uses standard laboratory equipment, it can be an effective method relative to potential alternatives such as liquid-liquid extraction and SPE; in fact, MAE reduces solvent consumption and

extraction time, compared with the method published by Fernandez et al. (20).

Once validated, the proposed method was applied to 20 human plasma samples obtained from Galician hospitals and courts (Table V) and 18 others from fatally poisoned individuals obtained from the Institute of Legal Medicine of Galicia (Table VI). The results obtained testify to the usefulness of the simultaneous determination of the studied drugs. Thus, three drug consumers (Table V) were found to be consuming heroin, cocaine, and methadone; four heroin and methadone; five cocaine and methadone; and six others heroin and cocaine. Cocaethylene was detected in seven cases, suggesting the simultaneous use of cocaine and alcohol. The average concentrations of the drugs in the plasma samples that tested positive for them were as follows: 0.71 µg/mL for morphine, 0.80 µg/mL for codeine, 0.38 µg/mL for 6AM, 0.76 µg/mL for BEG, 0.84 µg/mL for cocaine, 0.42 µg/mL for cocaethylene, 0.62 µg/mL for EDDP, and 0.48 µg/mL for methadone.

The average drug concentrations in the positive samples from fatally poisoned individuals were 0.89 µg/mL for morphine, 0.99 µg/mL for codeine, 0.69 µg/mL for 6AM, 1.21 µg/mL for BEG, 1.03 µg/mL for cocaine, 1.06 µg/mL for cocaethylene, 0.73 µg/mL for EDDP, and 0.90 µg/mL for methadone. Four individuals (Table VI) were found to have used 3 drugs (heroin, cocaine and methadone), 11 used 2 drugs, and 3 others only 1 drug. The results for cocaine are within the ranges previously obtained by Kroener et al. (21).

Based on the results, the time elapsed between consumption of the drugs and collection of the samples was quite long. In fact, 6AM, which is the main metabolite of heroin, was detected in fewer cases and at lower concentrations than was morphine (a product of the metabolism of 6AM). The fast metabolism of cocaine resulted in its being detected in fewer cases than was BEG, its main metabolite.

Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge funding from Spain's CICYT (Project BFI2002-03385).

References

1. B. Maralíková and W. Weinmann. Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification. *J. Chromatogr. B* **811**: 21–30 (2004).
2. W.V. Caulfield and J.T. Stewart. Rapid determination of selected drugs of abuse in human plasma using a monolithic silica HPLC column and solid phase extraction. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* **25(19)**: 2977–2998 (2002).
3. E. Brandsteterová, E. Blahová, and J. Netrová. Simple generic SPE assay for HPLC analysis of morphine and its glucuronides in serum samples. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* **25(16)**: 2521–2534 (2002).
4. G. Theodoridis, M.A. Lontou, F. Michopoulos, M. Sucha, and T. Gondova. Study of multiple solid-phase microextraction combined off-line with high performance liquid chromatography:

- application in the analysis of pharmaceuticals in urine. *Anal. Chim. Acta* **516(1-2)**: 197–204 (2004).
5. M. Walles, W.M. Mullett, and J. Pawliszyn. Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1025(1)**: 85–92 (2004).
 6. S. Paterson, N. McLachlan-Troup, R. Cordero, M. Dohnal, and S. Carman. Qualitative screening for drugs of abuse in hair using GC–MS. *J. Anal. Toxicol.* **25(3)**: 203–208 (2001).
 7. K. Ganzler, A. Salgó, and K. Valkó. Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography. *J. Chromatogr.* **371**: 299–306 (1986).
 8. J.R.J. Paré and J.M.R. Belanger. Microwave assisted process (MAP): a new tool for the analytical laboratory. *Trends Anal. Chem.* **13**: 176–184 (1994).
 9. L.G. Croteau, M.H. Akhtar, J.M.R. Bélanger, and J.R.J. Paré. High performance liquid chromatography determination following microwave assisted extraction of 3-nitro-4-hydroxyphenylarsonic acid from swine liver, kidney and muscle. *J. Liq. Chromatogr.* **17(13)**: 2971–2981 (1994).
 10. M. Franke, C.L. Winek, and H.M. Kingston. Extraction of selected drugs from serum using microwave irradiation. *Forensic Sci. Int.* **81**: 51–59 (1996).
 11. C.S. Eskilsson, E. Björklund, L. Mathiasson, L. Karlsson, and A. Tortensson. Microwave assisted extraction of felodipine tablets. *J. Chromatogr. A* **840**: 59–70 (1999).
 12. A. Brachet, P. Christen, and J.L. Veuthey. Focused microwave assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Phytochem. Anal.* **13**: 162–169 (2002).
 13. G.A. Lewis, D. Mathieu, and R. Phan-Tan-Luu. *Pharmaceutical Experimental Design*. Marcel Dekker, New York, NY, 1999.
 14. V.P. Shah, K.K. Midha, J.W.A. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonelli, C.T. Viswanathan, and A. Yacobi. Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress. *Pharm. Res.* **17(12)**: 1551–1557 (2000).
 15. F.T. Peters and H.H. Maurer. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology—a review. *Accred. Qual. Assur.* **7**: 441–449 (2002).
 16. C. Foulon, M.C. Menet, N. Manuel, C. Pham-Huy, H. Galons, J.R. Claude, and F. Guyon. Rapid analysis of benzoylecgonine, cocaine and cocaethylene in urine, serum and saliva by isocratic high performance liquid chromatography with diode array detection. *Chromatographia* **50(11/12)**: 721–727 (1999).
 17. R. Brunetto, L. Gutiérrez, Y. Delgado, M. Galignani, J.L. Bruguera, and M. Bruguera. High performance liquid chromatographic determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human blood plasma sample into an alkyl-diol-silica precolumn. *Anal. Bioanal. Chem.* **375**: 534–538 (2003).
 18. R. Dams, T. Benijts, W. Lambert, and A.P. De Leenheer. Simultaneous determination of in total 17 opium alkaloids and opioids in blood and urine by fast liquid chromatography diode array detection fluorescence detection, after solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B* **733**: 53–61 (2002).
 19. A. Klingmann, G. Skoop, and R. Aderjan. Analysis of cocaine, benzoilecgonine, ecgonine methyl ester, and ecgonine by high-pressure liquid chromatography–API mass spectrometry and application a short-term degradation study of cocaine in plasma. *J. Anal. Toxicol.* **25**: 425–430 (2001).
 20. P. Fernández, L. Morales, C. Vázquez, and A.M. Bermejo. HPLC–DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma. *Forensic Sci. Int.* **161(1)**: 31–35 (2006).
 21. L. Kroener, F. Musshoff, and B. Madea. Evaluation of immunochemical drug screenings of whole blood samples. A retrospective optimization of cutoff levels after confirmation analysis on GC–MS. *J. Anal. Toxicol.* **27**: 205–212 (2003).

Manuscript received February 6, 2007;
revision received March 30, 2007.



Microwave assisted extraction of drugs of abuse from human urine

Purificación Fernández,^{1,*} Marta Lago,¹ Rosa Antonia Lorenzo,² Antonia María Carro,² Ana María Bermejo¹ and María Jesús Tabernero¹

¹ Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, Santiago de Compostela, Spain

² Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Santiago de Compostela, Spain

Received 11 October 2006; Revised 28 November 2006; Accepted 29 November 2006

ABSTRACT: Microwave assisted extraction (MAE) was used to extract drugs of abuse from urine samples for the simultaneous determination of morphine, codeine, 6-acetylmorphine (6AM), cocaine, cocaethylene, benzoylecgonine (BEG), methadone and 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP) by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). The working wavelengths used were 285 nm for morphine, codeine and 6AM; 233 nm for cocaine, cocaethylene and BEG; and 292 nm for methadone and EDDP. The mobile phase was a gradient of acetonitrile and phosphate buffer at pH 6.5. A full factorial design was used to identify the most suitable extraction conditions as regards pH, solvent and time of extraction. The optimum conditions thus established provided analyte recoveries from 61% to 109%. The detector response was linear over the drug concentration range 0.1–4.0 µg ml⁻¹ in urine. The within- and between-day precision and accuracy were less than 8% and 6.5%, respectively. The method was applied successfully to samples obtained from Galician hospitals and courts. Copyright © 2007 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS: MAE; HPLC-DAD; gradient; urine; drugs of abuse

Introduction

Urine analyses are routinely used to detect the presence of drugs of abuse and certify their consumption; in fact, urine is an easily collected biological fluid that can contain many drugs — and, especially, their metabolites — at higher concentrations than in blood for several days.

Immunological techniques (Cone *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2000; Schramm *et al.*, 1993) are the most widely used for detecting drugs in biological fluids by virtue of their simplicity and expeditiousness; however, they are poorly sensitive and specific, which has compelled the development of alternative methods for the efficient identification and determination of drugs of abuse. One of the most widely used, gas chromatography-mass spectrometry (Cone *et al.*, 1994; Cárdenas *et al.*, 1996; McCambly *et al.*, 1997) requires the prior derivatization of non-volatile analytes. High performance liquid chromatography has emerged as an effective alternative in this context as it allows a large number of analytes to be

separated with no chemical pretreatment (Antollini *et al.*, 2001; Brunetto *et al.*, 2005; Dams *et al.*, 2002; Foulon *et al.*, 1999; Concheiro *et al.*, 2006).

Drugs of abuse are usually extracted from samples by using liquid–liquid (Elliot and Hale, 1998) or solid phase extraction (Schänzle *et al.*, 1999; Maralíková and Weinmann, 2004). 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 the extraction of organic pollutants from sediments, soil, water and other types of materials (Ganzler *et al.*, 1986; Paré and Belanger, 1994; Croteau *et al.*, 1994). By contrast, MAE has scarcely been used to extract drugs of abuse from different materials such as serum, tablets or coca leaves (Franke *et al.*, 1996; Eskilsson *et al.*, 1999; Brachet *et al.*, 2002).

This work developed a new fast method based on microwave assisted extraction and high performance liquid chromatography–diode array detection (HPLC-DAD) for the determination of morphine, codeine, 6-acetylmorphine (6AM), cocaine, benzoylecgonine (BEG), cocaethylene, methadone and 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP) in urine. The MAE procedure was optimized using an experimental design in order to establish the relative influence of three considered qualitative and quantitative factors for the operating conditions (Miller and Miller, 2000).

* Correspondence to: P. Fernández, Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, C/ San Francisco s/n, 15782, Santiago de Compostela, Spain.
E-mail: imlpuri@usc.es
Contract/grant sponsor: CICYT; contract/grant number BF12002-03385.

Experimental

Chemicals

All tests were conducted with gradient-grade solvents. The drug standards used (morphine, 6AM, cocaine, cocaethylene, BEG, methadone and EDDP) were supplied by Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Gradient grade acetonitrile, methanol, chloroform and dichloromethane were from Merck (Darmstadt, Germany). Purified water was obtained in the laboratory using a Milli-Q water system (Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland).

Drug-free urine samples were obtained from non-drug users, and real samples from opiate and/or cocaine users. All were stored refrigerated at 4 °C until analysis.

Preparation of Calibration Standard Solutions

Standards containing 1 mg ml⁻¹ of each drug in methanol (morphine, codeine, BEG, methadone and EDDP) or acetonitrile (6AM, cocaine and cocaethylene) were used. Working-strength solutions were prepared by appropriate dilution of the previous standards to obtain 0.5, 1, 2, 5, 10 and 20 µg ml⁻¹ of each drug in mobile phase (acetonitrile-phosphate buffer pH 6.5, 10:90, v/v).

Chromatographic Conditions

Analyses were carried out on a Waters® 2695 chromatograph (Milford, MA, USA) connected to a Model 996 photodiode array detector, also from Waters® (Milford, MA, USA). Data were processed with the software Millennium 32®. 3.05.01 for Windows 98. Samples were injected onto an XTerra® RP8 (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) stainless steel column (Milford, MA, USA).

In order to ensure optimal peak resolution in the chromatograms, and hence efficient separation of the analytes in a reasonably short time (22 min), elution was done in the gradient mode, using a mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile and 0.02 M phosphate buffer (pH 6.5) at a variable flow rate (Table 1).

Table 1. Eluent gradient. Eluent A consisted of acetonitrile and eluent B of 20 mM potassium phosphate (pH 6.5)

Time (min)	Flow (ml min ⁻¹)	A (%)	B (%)
0	0.7	10	90
5	0.7	2	98
7	0.8	20	80
10	0.8	35	65
15	0.8	50	50
20	0.8	50	50
22	0.7	10	90

The diode array detector allowed the wavelength range 200–400 nm to be scanned in order to obtain three-dimensional (wavelength × absorbance × time) chromatograms. The sensitivity was optimized by using the wavelengths where the chromatographic responses of the analytes were maximal, namely: 233 nm for cocaine, BEG and cocaethylene; 285 nm for morphine, codeine and 6AM; and 292 nm for methadone and EDDP.

Experimental Design

The extraction conditions were evaluated using an experimental design constructed with the software Nemrod W. Version 2000, LPRAI (University of Aix-Marseille III, Marseille, France).

The proposed model is not predictive; rather, it measures response changes at each factor level and determines interactions — albeit with an aim other than mapping the response over the domain; this type of design discards non-significant factors, which reduces the number of tests to be performed and saves time and expense as a result. A full factorial matrix was used (Table 2) including three factors at a different number of levels that were chosen from a test series conducted prior to constructing the design: a qualitative factor (solvent) at two levels, a quantitative factor (pH) at two levels and another quantitative factor (extraction time) at three levels. Therefore, the matrix will be 2².3¹ = 12 (Lewis *et al.*, 1999).

Extraction Procedure

Prior to extraction, the drug-free control sample was diluted twofold with Milli-Q water in order to minimize matrix effect, the pH was modified up to 9 and then the sample was centrifuged at 14 000 rpm for 10 min.

Under these conditions, the sample (1 ml) was mixed with 10 ml of chloroform and placed in the vessel of an ETHOS PLUS MPR300/12S microwave oven (Milestone®, Agrigento, Italy) for extraction at 100 °C for 10 min. After extraction, the vessel contents were centrifuged at

Table 2. Design matrix (2².3¹)

Experiment	Solvent (A)	pH (B)	Time (min) (C)
1	Chloroform	5.5	5
2	Dichloromethane	5.5	5
3	Chloroform	9	5
4	Dichloromethane	9	5
5	Chloroform	5.5	10
6	Dichloromethane	5.5	10
7	Chloroform	9	10
8	Dichloromethane	9	10
9	Chloroform	5.5	20
10	Dichloromethane	5.5	20
11	Chloroform	9	20
12	Dichloromethane	9	20

4000 rpm for 20 min and the organic layer was removed for evaporation to dryness under a nitrogen stream in a thermostatic bath at 40 °C. Finally, the dry extract was reconstituted in 100 µl of mobile phase and a 20 µl aliquot was injected into the chromatograph for analysis.

Subsequently, solutions containing the eight drugs at concentrations of 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0 and 4.0 µg ml⁻¹ in urine were prepared and extracted following the previous procedure for analysis by HPLC-DAD and construction of calibration curves.

Results and Discussion

The analytes were identified from their retention times (namely 6.6 min for morphine, 11.4 min for codeine, 12.5 min for BEG, 13.0 min for 6AM, 15.0 min for cocaine, 16.0 min for cocaethylene, 17.6 min for EDDP and 18.6 min for methadone) and absorption spectra. In this way, the HPLC-DAD is a technique with a high specificity because it allows the analytes to be discriminated from other substances with the same retention times potentially present in urine. In addition, this technique provided a high sensitivity as it allowed the maximum absorption wavelength for each analyte to be monitored, namely: 233 nm for BEG, cocaine and cocaethylene; 285 nm for morphine, codeine and 6AM; and 292 nm for EDDP and methadone.

The chromatographic conditions used to separate the studied drugs were selected following testing of various types of columns, mobile phases and gradients.

Application of the above-described extraction procedure to drug-free urine samples revealed the absence of interference in the chromatographic regions where the analytes appear.

Based on the graphs provided by the design (Figs 1 and 2), the final conditions for the simultaneous extraction of the studied drugs were found to be chloroform as the solvent, pH 9 for the urine samples and 10 min as the extraction time. For all the analytes, no interactions between factors were found, as shown in Fig. 1 (parallel lines representing no first order interaction) for morphine. Figure 2 is a delta weight plot which allowed the relative

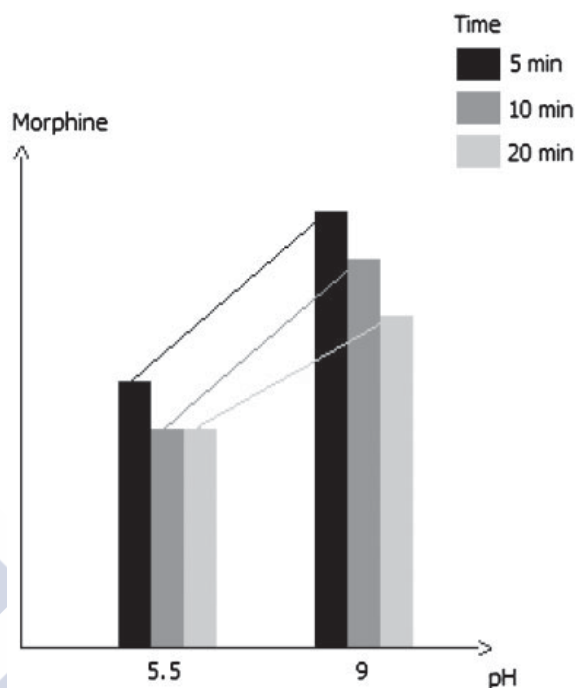


Figure 1. pH time interaction plot (morphine)

effects of a level change in a variable on the response to be compared; the effects are shown as bars, the length of which are proportional to the relative magnitude of the effect, being negative for bars going leftwards and positive for those going rightwards. The dotted lines represent the statistical significance levels as determined using the method of Lenth; when the effect bars surpass the line, the effect of the factor level concerned on the response is statistically significant. Figure 2 shows for cocaine the statistical significance on the response (Lewis *et al.*, 1999) when the factor B (pH) changes its level.

The calibration curves for the analytes were linear over the concentration range 0.1–4.0 µg ml⁻¹ in urine, and their correlation coefficients were greater than 0.997 in all cases. A linear regression analysis based on the equation $y = ax + b$ provided additional parameters such as the slope and intercept (Table 3). By way of example, Fig. 3

Table 3. Linearity data for the standard curves of each analyte ($n = 5$)

Compound	Linearity	Slope standard error	Intercept standard error	Coefficient of correlation
Morphine	$y = 4977x - 2682$	75	701	0.9975
Codeine	$y = 2800x - 767$	35	303	0.9984
6AM	$y = 4870x - 718$	44	287	0.9992
BEG	$y = 21773x - 1412$	79	643	0.9999
Cocaine	$y = 48364x + 2362$	182	1015	0.9999
Cocaethylene	$y = 38228x - 12850$	488	4586	0.9982
EDDP	$y = 106x + 18$	1	7	0.9993
Methadone	$y = 1091x - 392$	13	126	0.9983

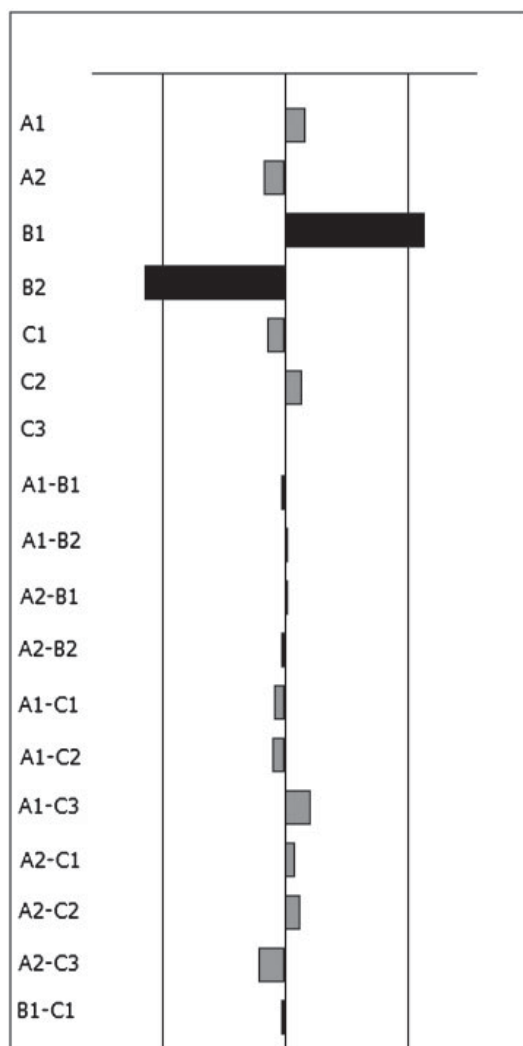


Figure 2. Delta weights plot (cocaine)

shows the chromatogram at 233 nm for a urine sample containing a $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ analytes concentration.

The analytical validation was performed according to the recommendations of Shah *et al.* (2000) and Peters and Maurer (2002). The within-day and between-day precision and accuracy were calculated by subjecting five samples containing the eight studied drugs at two different concentration levels (0.4 and $2.0 \mu\text{g ml}^{-1}$) to the above-described extraction procedure. The results thus obtained were acceptable (Bresolle *et al.*, 1996); in fact, the relative standard deviations were less than 8% and the relative errors were less than 6.5% (Table 4).

The quantitation limit for the method was taken to be the lowest concentration in the calibration curve (namely $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$). On the other hand, the limit of detection was taken to be the lowest concentration giving a signal three times as high as the signal-to-noise ratio and was 20 ng ml^{-1} for cocaine, 40 ng ml^{-1} for BEG, 50 ng ml^{-1} for 6AM, 60 ng ml^{-1} for morphine, 70 ng ml^{-1} for codeine, cocaethylene and methadone and 80 ng ml^{-1} for EDDP; these values are similar to those previously reported by Brunetto *et al.* (2005).

Analyte recoveries were determined at two concentration levels (namely 0.4 and $2.0 \mu\text{g ml}^{-1}$) by comparing the peak areas obtained in five replicate analyses of urine samples extracted as described above with those obtained in five replicate samples containing the same analyte concentrations in mobile phase. The equation used was:

$$\text{Recovery (\%)} = (\text{area}_{\text{urine}} / \text{area}_{\text{mobile phase}}) \times (10/8) \times 100$$

and included the correction factor 10/8 in order to consider the volume of chloroform used (10 ml) and that recovered (8 ml).

The average recoveries ranged from 61% for BEG to 109% for 6AM (Table 4). These values are similar to those previously obtained by other authors using solid phase extraction (Dams *et al.*, 2002). Based on the

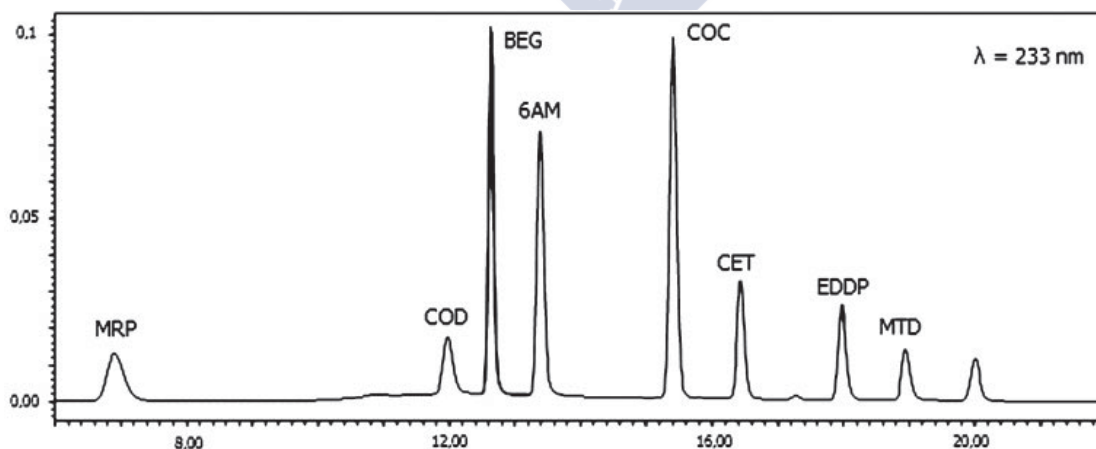


Figure 3. Chromatogram at 233 nm for a urine sample (concentration $4 \mu\text{g ml}^{-1}$)

Table 4. Within-day and between-day precision and accuracy and recoveries

Compound	Concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Precision RSD (%) within-day ($n = 5$)	Accuracy Rel. error (%) within-day ($n = 5$)	Precision RSD (%) between-day ($n = 5$)	Accuracy Rel. error (%) between-day ($n = 5$)	Recovery (%)
Morphine	0.4	2.14	1.52	5.87	2.30	93.98
	2.0	1.41	0.46	2.16	1.34	73.37
Codeine	0.4	1.88	1.23	6.15	3.20	82.58
	2.0	2.45	1.14	2.16	3.20	88.41
6AM	0.4	2.10	0.81	4.05	1.70	109.00
	2.0	2.61	0.46	2.41	3.50	88.31
BEG	0.4	2.24	1.43	4.43	1.70	61.01
	2.0	3.22	1.99	2.84	3.04	62.57
Cocaine	0.4	2.85	1.79	5.88	3.80	82.64
	2.0	1.90	6.09	3.10	2.32	88.20
Cocaethylene	0.4	2.28	2.29	7.62	1.70	69.91
	2.0	1.91	0.67	1.23	1.48	87.65
EDDP	0.4	1.93	0.71	6.55	1.80	74.68
	2.0	3.13	4.18	2.15	1.80	67.07
Methadone	0.4	1.63	1.22	4.30	3.60	66.63
	2.0	2.26	0.63	2.07	2.26	66.59

Table 5. Drug concentrations found in urine from drug addicts

Case	Morphine	Codeine	6AM	BEG	Cocaine	Cocaethylene	EDDP	Methadone
1	1.84	4.10	0.32	4.11	0.42	0.28	4.12	1.93
2	1.08	–	0.34	3.88	0.75	–	3.99	1.80
3	3.09	–	–	3.49	0.53	–	–	2.69
4	0.57	–	–	–	–	–	0.69	0.23
5	3.70	–	–	–	2.96	–	0.54	–
6	–	–	1.84	3.62	0.85	0.12	3.47	3.49
7	0.41	–	0.57	0.44	–	–	4.03	3.95
8	–	–	–	3.24	–	–	–	2.16
9	0.14	0.11	–	–	–	–	3.06	–
10	–	–	0.37	–	–	–	4.04	4.15
11	3.73	–	–	–	0.74	–	–	3.84
12	3.05	–	0.52	–	–	0.33	3.43	2.91
13	–	–	–	–	4.15	–	–	3.30
14	1.45	–	–	–	–	–	4.37	3.55
15	4.22	–	0.15	–	–	–	2.09	3.60
16	1.02	–	–	4.14	–	–	–	2.79
17	1.33	–	–	4.22	–	–	–	–
18	0.46	–	0.21	4.33	–	–	–	–
19	3.41	0.93	–	–	2.57	2.16	–	–
20	1.60	0.80	–	–	–	–	0.31	1.53
21	–	–	–	1.92	–	–	2.44	3.06

favorable recoveries provided by microwave assisted extraction, and its expeditiousness, cleanliness and reproducibility, the proposed method is an effective choice for the separation of analytes in biological matrices.

Once validated, the method was applied to 21 urine samples from drug addicts on a methadone detoxification program (Table 5) and 17 others from fatally poisoned individuals (Table 6). All samples were previously analysed by enzyme immunoassay (EMIT), which affords no quantitation or discrimination between different compounds and their metabolites.

The results testify to the usefulness of the simultaneous determination of these drugs. In fact, eight individuals shown in Table 5 were found to consume heroin, cocaine and methadone; six consumed heroin and metha-

done; three consumed cocaine and methadone; and another three heroin and cocaine. Only in four cases was cocaethylene detected, suggesting the combined use of cocaine and alcohol. The average concentration of each drug in the urine samples that tested positive for them was as follows: $1.94 \mu\text{g ml}^{-1}$ for morphine, $1.48 \mu\text{g ml}^{-1}$ for codeine, $0.54 \mu\text{g ml}^{-1}$ for 6AM, $3.34 \mu\text{g ml}^{-1}$ for BEG, $1.62 \mu\text{g ml}^{-1}$ for cocaine, $0.72 \mu\text{g ml}^{-1}$ for cocaethylene, $2.81 \mu\text{g ml}^{-1}$ for EDDP and $2.80 \mu\text{g ml}^{-1}$ for methadone. As can be seen, the morphine levels exceeded the 6AM levels; because morphine is a metabolite of 6AM, this result suggests that the time elapsed between consumption of the heroin and analysis of the urine was quite long. The results for BEG and cocaine confirm that the latter is rapidly metabolized to the former.

Table 6. Drug concentrations found in urine from fatally poisoned individuals

Case	Morphine	Codeine	6AM	BEG	Cocaine	Cocaethylene	EDDP	Methadone
1	–	–	–	5.39	–	–	1.59	0.63
2	–	1.37	–	–	–	–	–	6.27
3	1.50	–	–	–	3.27	–	4.35	–
4	–	–	–	3.60	–	–	0.36	5.79
5	0.24	–	–	3.03	8.13	–	–	–
6	0.18	–	5.68	4.78	–	2.17	–	–
7	–	–	–	5.81	1.62	0.96	0.12	0.16
8	1.10	–	–	–	–	–	–	–
9	–	–	–	1.68	–	–	–	0.94
10	0.76	–	2.63	3.40	0.33	–	2.71	9.16
11	–	–	–	0.21	–	0.15	0.95	1.81
12	–	0.27	–	–	4.61	–	–	–
13	4.63	–	–	–	4.92	–	–	1.03
14	–	2.06	–	5.07	–	–	3.27	0.32
15	5.24	–	0.31	–	–	–	–	–
16	–	0.84	1.15	–	3.12	–	–	–
17	3.47	–	–	–	–	–	0.49	3.17

The average concentrations of the drugs in the positive samples from fatally poisoned individuals were 2.16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for morphine, 1.13 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for codeine, 2.44 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for 6AM, 3.66 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for BEG, 3.71 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for cocaine, 1.09 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for cocaethylene, 1.73 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for EDDP and 2.93 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for methadone. Four such individuals (Table 6) were found to use the three drugs (heroin, cocaine and methadone), eleven used two drugs, and two used only one.

Acknowledgements—This work was supported by CICYT, project number BF12002-03385.

References

- Antollini L, Suriano C, Grassi MC, Nencini P. 2001. Analysis of cocaethylene, benzoylecgonine and cocaine in human urine by high performance thin layer chromatography with ultraviolet detection: a comparison with high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **751**: 19–27.
- Brachet A, Christen P, Veuthey JL. 2002. Focused microwave assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Phytochem. Anal.* **13**: 162–169.
- Bresolle F, Bromet-Petit M, Audran M. 1996. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr.* **686**: 3–10.
- Brunetto MR, Delgado Cayama Y, Gutiérrez García L, Gallignani M, Obando MA. 2005. Determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human urine into a column switching liquid chromatography system with diode array detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37**: 115–120.
- Cardenas S, Gallego M, Valcarcel M. 1996. An automated preconcentration-derivatization system for the determination of cocaine and its metabolites in urine and illicit cocaine samples by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**: 631–636.
- Concheiro M, de Castro A, Quintela O, López-Rivadulla M, Cruz A. 2006. Determination of drugs of abuse and their metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. An application to 156 road-fatalities. *J. Chromatogr. B* **832**: 81–89.
- Cone EJ, Hillsgrove M, Darwin WD. 1994. Simultaneous measurement of cocaine, cocaethylene, their metabolites, and crack pyrolysis products by gas chromatography-mass spectrometry. *Clin. Chem.* **40**: 1299–1305.
- Cone EJ, Lange R, Darwin WD. 1998. *In vivo* adulteration: excess fluid ingestion causes false-negative marijuana and cocaine urine test results. *J. Anal. Toxicol.* **22**: 460–473.
- Croteau LG, Akhtar MH, Bélanger JMR, Paré JRJ. 1994. High performance liquid chromatography determination following microwave assisted extraction of 3-nitro-4-hydroxyphenylarsonic acid from swine liver, kidney and muscle. *J. Liquid Chromatogr.* **17**: 2971–2981.
- Dams R, Benijts T, Lambert W, De Leenheer AP. 2002. Simultaneous determination of in total 17 opium alkaloids and opioids in blood and urine by fast liquid chromatography diode array detection fluorescence detection, after solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B* **733**: 53–61.
- Elliott SP, Hale KA. 1998. Applications of an HPLC-DAD drugs screening system based on retention indices and UV spectra. *J. Anal. Toxicol.* **22**: 279–289.
- Eskilsson CS, Björklund E, Mathiasson L, Karlsson L, Tortensson A. 1999. Microwave assisted extraction of felodipine tablets. *J. Chromatogr. A* **840**: 59–70.
- Foulon C, Menet MC, Manuel N, Pham-huy C, Galons H, Claude JR, Guyon F. 1999. Rapid analysis of benzoylecgonine, cocaine and cocaethylene in urine, serum and saliva by isocratic high performance liquid chromatography with diode array detection. *Chromatographia* **50**: 721–727.
- Franke M, Winek CL, Kingston HM. 1996. Extraction of selected drugs from serum using microwave irradiation. *Forensic Sci. Int.* **81**: 51–59.
- Ganzler K, Salgó A, Valkó K. 1986. Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography. *J. Chromatogr.* **371**: 299–306.
- Lewis GA, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. 1999. *Pharmaceutical Experimental Design*. Marcel Dekker: New York.
- Maraliková B, Weinmann W. 2004. Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification. *J. Chromatogr. B* **811**: 21–30.
- McCambly K, Kelly RC, Johnson T, Johnson JE, Brown WC. 1997. Robotic solid-phase extraction of amphetamines from urine for analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **21**: 438–444.
- Miller JN, Miller JC. 2002. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Prentice Hall: Harlow.
- Paré JRJ, Belanger JMR. 1994. Microwave assisted process (MAP): a new tool for the analytical laboratory. *Trends Anal. Chem.* **13**: 176–184.
- Peters FT, Maurer HH. 2002. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology — A review. *Accred. Qual. Assur.* **7**: 441–449.
- Schänzle G, Li S, Mikus G, Hofmann U. 1999. Rapid, highly sensitive method for the determination of morphine and its metabolites in body

- fluids by liquid chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **721**: 55–65.
- Schramm W, Craig PA, Smith RH, Berger GE. 1993. Cocaine and benzoylecgonine in saliva, serum and urine. *Clin. Chem.* **39**: 481–487.
- Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, Miller KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A. 2000. Bioanalytical method validation — a revisit with a decade of progress. *Pharm. Res.* **17**: 1551–1557.
- Williams RH, Maggiore JA, Shah SM, Erickson TB, Negrusz A. 2000. Cocaine and its major metabolite in plasma and urine samples from patients in an emergency medicine setting. *J. Anal. Toxicol.* **24**: 478–482.





Comparison of two extraction procedures for determination of drugs of abuse in human saliva by high-performance liquid chromatography

P. Fernández,* L. Morales, C. Vázquez, M. Lago and A. M. Bermejo

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

Received 27 March 2008; Revised 8 May 2008; Accepted 8 May 2008

ABSTRACT: High performance liquid chromatography in combination with diode array detection (HPLC-DAD) was used to determine morphine, 6-acetylmorphine, cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene, methadone and 2-ethylene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine in human saliva. For comparison, samples were prepared by either liquid–liquid extraction in Tox tubes A[®] or microwave-assisted extraction (MAE), by mixing 1 ml of saliva with 10 ml of chloroform and operating at 100 °C for 10 min. Acetonitrile and 0.02 M phosphate buffer at pH 6.5 were used as mobile phase in HPLC in gradient mode. The detector response was linear over the drug concentration range of 0.05–2.0 µg ml⁻¹ in human saliva. The analytical method was validated by determining its precision and accuracy ($n = 5$), which were lower than 5% as relative standard deviation and 6% as relative error. Limits of detection ranged from 10 to 35 ng ml⁻¹; mean recoveries of drugs were from 53 to 95% with Tox tubes A and from 83 to 100% with MAE at two different concentrations (0.1 and 1.0 µg ml⁻¹). The proposed method was applied to 24 saliva samples from individuals poisoned with opiates and/or cocaine. Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS: HPLC-DAD; opiates; cocaine; Tox tubes; MAE; human saliva

Introduction

Most psychotropic drugs have traditionally been determined in blood and urine by virtue of these compounds and their metabolites being easily detected in these biological matrices. Over the past two decades, however, saliva has been increasingly employed to monitor drug use in the workplace and schools and for criminal justice purposes (Kadehjian, 2005). Saliva has a number of advantages over blood and urine, including ease of collection, and it contains the parent drugs in high proportions relative to their metabolites. However, saliva has some disadvantages, such as a relatively low concentration range, variable pH and the risk of contamination from drug residues present in the nasal cavity (Aps and Martens, 2005).

The increasing simultaneous use of several drugs of abuse has required the development of convenient, expeditious methods for their detection in small amounts of sample. Properly preparing samples, which includes clean-up and pre-concentration of the target analytes, is a crucial step in the analysis of biological fluids for illicit drugs. The extraction techniques typically used for this purpose provide acceptable results, but are labour-intensive. These shortcomings have been circumvented by using alternative procedures such as those based on microwave-assisted extraction (MAE), which have enabled the successful

extraction of various types of compounds from matrices including sediments, soil, plants and water (Ganzler *et al.*, 1990; Paré and Belanger, 1994; López-Avila *et al.*, 1995; Eskilsson *et al.*, 1999; Carro *et al.*, 2000; Christen and Veuthey, 2001; Barriada-Pereira *et al.*, 2004).

Opiates and cocaine in saliva have so far been determined using a variety of extraction procedures and analytical techniques (Speckl *et al.*, 1999; Niedbala *et al.*, 2001; Cone *et al.*, 2002; Mortier *et al.*, 2002; De Jager and Andrews, 2002; Jones *et al.*, 2002; Fucci *et al.*, 2003; Clauwaert *et al.*, 2004; Drummer, 2005; Jufer *et al.*, 2006; Cognard *et al.*, 2006) but none to date has used microwave-assisted extraction (MAE).

In this work, we have developed a method for the simultaneous determination of opiates, cocaine and their metabolites in saliva using Tox tubes[®] and MAE to prepare the samples, and liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) for their subsequent analysis.

Experimental

Material

Standards of the studied drugs [morphine, 6-acetylmorphine (6AM), cocaine, cocaethylene, benzoylecgonine (BEG), methadone and 2-ethylene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP)] were supplied by Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Gradient-grade acetonitrile, methanol and

* Correspondence to: P. Fernández, Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, Santiago de Compostela, Spain. E-mail: imlpuri@usc.es

chloroform were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Purified water was obtained in the laboratory using a Milli-Q water system from Millipore (Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland). Tox tubes A[®] were obtained from Dipesa (Madrid, Spain) and the Salivettes[®], used to collect the test samples, from Sarstedt (Numbrecht, Germany).

Preparation of Calibration Solutions

Standard solutions containing a 1 mg ml⁻¹ concentration of each drug in methanol (morphine, BEG, methadone and EDDP) or acetonitrile (6AM, cocaine and cocaethylene) were used for calibration. Working-strength solutions containing all drugs were prepared by appropriate dilution of the previous standards to obtain concentrations of 0.5, 1, 2, 5, 10 and 20 µg ml⁻¹ in mobile phase (10:90 v/v acetonitrile–phosphate buffer, pH 6.5), or 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 µg ml⁻¹ in saliva.

Instrumentation

Analyses were performed on a model 2695 chromatograph from Waters[®] (Milford, MA) connected to a model 996 photodiode array detector, also from Waters[®]. Data were processed with Millennium 32[®] v. 3.05.01 for Windows 98 software. Samples were injected onto an XTerra[®] RP-8 (250 × 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) stainless steel column also supplied by Waters[®]. In order to ensure optimum peak resolution in the chromatograms, and hence efficient separation of the analytes within a reasonably short time (22 min), elution was carried out in gradient mode, using a mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile and potassium dihydrogen phosphate (pH 6.5; 0.02 M) at a variable flow rate (Table 1). The diode array detector allowed the wavelength range 200–400 nm to be scanned in order to obtain three-dimensional (wavelength/absorbance/time) chromatograms. The sensitivity was optimized using the wavelengths where the chromatographic responses of the analytes were maximal, namely: 233 nm for cocaine, BEG and cocaethylene; 285 nm for morphine and 6 AM; and 292 nm for methadone and EDDP.

Table 1. Eluent gradient used

Time (min)	Flow rate (ml min ⁻¹)	Acetonitrile (%)	Phosphate buffer pH 6.5 (%)
0	0.7	10	90
5	0.7	15	85
7	0.8	20	80
10	0.8	35	65
15	0.8	50	50
20	0.8	50	50
22	0.7	10	90

The microwave extraction system was an Ethos Plus MPR300/12S oven, from Milestone[®] (Agrigento, Italy), equipped with a solvent detector. This system allows up to 12 samples to be simultaneously extracted in PTFE-lined extraction closed vessels under identical conditions of pressure and temperature, with simultaneous magnetic stirring of the sample and solvent inside. An in-board pressure control system was used to monitor and control pressure and other conditions inside the vessels. The oven provides a maximum power of 1000 W which can be changed in order to reach and maintain the desired temperature.

Saliva Samples

Drug-free saliva samples were obtained from our laboratory coworkers, and test samples from opiate and/or cocaine users in a detoxification programme of the Drug Addict Health Care Unit of Galicia (NW Spain). All samples were stored refrigerated at 4 °C unless their analysis was delayed, in which case they were frozen at -18 °C. Saliva samples were collected with the commercial device Salivette[®]; this consists of a cotton swab that is inserted into the mouth and allowed to soak for 2–3 min, after which it is placed in a collecting tube and centrifuged to release the collected saliva for subsequent extraction and chromatographic analysis. All tests were conducted in accordance with the World Medical Association's *Principles for Medical Research Involving Human Subjects* and the Spanish National Law.

Sample Preparation

Tox tubes A

These tubes contain a buffer solution at pH 9 and a mixture of organic solvents (dichloromethane, 1,2-dichloroethane, heptane and isopropanol) to extract organic bases and some neutral drugs from the biological matrix. A volume of 1 ml of saliva was poured into each Tox tube, and the tube was shaken for 10 min and centrifuged at 4000 rpm for 15 min. Then, the organic phase was evaporated to dryness under a nitrogen stream in a thermostated bath at 40 °C, and the residue reconstituted in 100 µl of mobile phase of which a 20 µl aliquot was injected into the chromatograph for analysis.

Microwave-assisted extraction

After testing different solvents (chloroform, dichloromethane, hexane), temperatures (80, 90 and 100 °C) and times (5, 10 and 15 min), the best results were obtained with the following conditions: a volume of 1 ml of saliva was mixed with 10 ml of chloroform and placed in the oven

vessel for extraction at 100 °C for 10 min. Then, the vessel content was centrifuged at 4000 rpm for 15 min and the organic layer was removed by evaporation to dryness under a nitrogen stream in a thermostated bath at 40 °C. Finally, the dry extract was reconstituted in 100 µl of mobile phase and a 20 µl aliquot injected into the chromatograph for analysis.

The previous two extraction methods were applied in parallel to two series of solutions containing the seven target drugs at concentrations of 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 µg ml⁻¹ in saliva. The extracts were analyzed under the above-described chromatographic conditions and the results used to construct a calibration curve for each analyte by plotting chromatographic areas against the respective post-extraction concentrations. Such concentrations were 10 times higher than the initial ones because the final volume was 10 times lower than the starting volume.

Results and Discussion

Firstly, the target drugs were identified from their retention times and UV spectra, checking the purity of each peak and achieving satisfactory specificity and a good peak resolution in an overall analysis time of 22 min. The retention times were found to be 7.02 min for morphine, 12.48 min for BEG, 13.35 min for 6AM, 15.35 min for cocaine, 16.36 min for cocaethylene, 17.73 min for EDDP and 18.71 min for methadone. Figure 1 shows the chromatogram for a saliva sample, prepared by MAE, and containing a 0.1 µg ml⁻¹ concentration of each analyte.

Application of the two above-described extraction procedures to drug-free saliva samples confirmed the absence of any endogenous compounds potentially interfering with the chromatographic analysis of the target drugs.

Calibration standards containing drug concentrations over the range 0.05–2.0 µg ml⁻¹ saliva were extracted in Tox tubes or by MAE and analyzed on five different days. Calibration curves were constructed by plotting the area under the chromatographic peak of each drug against concentration (Table 2). Each point in these curves was obtained in triplicate, and the correlation coefficients were similar using both extraction procedures. On the basis of the slopes corresponding to all compounds except cocaethylene, the MAE method provided to have a higher sensitivity.

The between-day precision and accuracy of the method were estimated by analysis of five saliva samples containing the drugs at two different concentrations (0.1 and 1.0 µg ml⁻¹). The precision was calculated as the relative standard deviation (RSD) and the accuracy was expressed

Table 2. Calibration curves

	Equations	
	Tox tubes A	MAE
Morphine	$y = 2924.1x - 451.8$ $R^2 = 0.999$	$y = 4109.2x - 1972.3$ $R^2 = 0.997$
6AM	$y = 2791.4x - 952.8$ $R^2 = 0.995$	$y = 4339.9x - 392.5$ $R^2 = 0.999$
BEG	$y = 34939x + 305.1$ $R^2 = 0.999$	$y = 39755x + 10276$ $R^2 = 0.999$
Cocaine	$y = 40195x + 278.7$ $R^2 = 0.999$	$y = 47397x - 14084$ $R^2 = 0.999$
Cocaethylene	$y = 40045x + 189.5$ $R^2 = 0.999$	$y = 36493x + 3836.6$ $R^2 = 0.998$
EDDP	$y = 388.4x - 26.7$ $R^2 = 0.999$	$y = 606.9x - 60.5$ $R^2 = 0.997$
Methadone	$y = 1480.3x - 290.4$ $R^2 = 0.998$	$y = 1598.1x - 40.5$ $R^2 = 0.999$

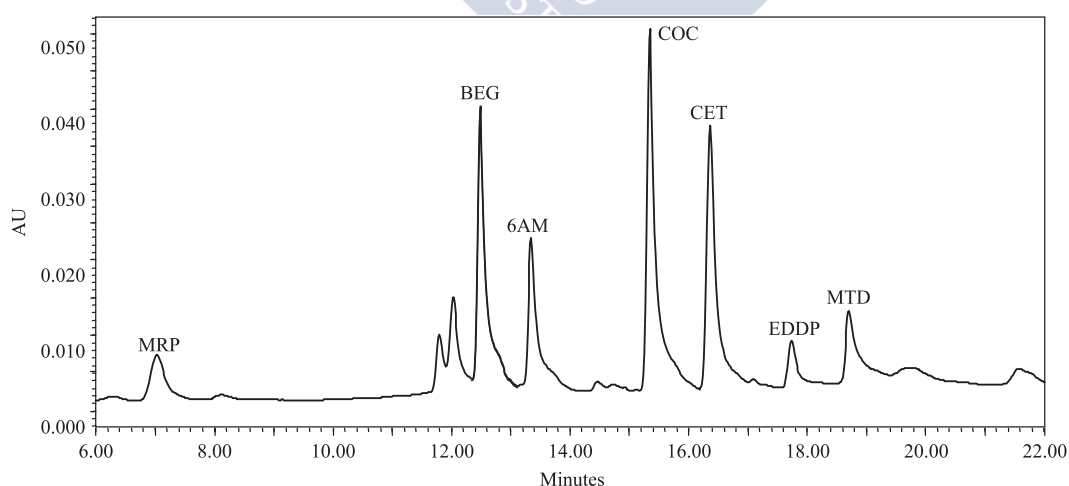


Figure 1. Chromatogram for a saliva sample containing a 0.1 µg ml⁻¹ concentration of each analyte as monitored at 233 nm. (MRP, morphine; BEG, benzoylecgonine; 6AM, 6-acetylmorphine; COC, cocaine; CET, cocaethylene; EDDP, 2-ethylene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine; MTD, methadone)

as a percentage of the difference between the measured concentration and the true value for the same concentration. As can be seen from Table 3, the results were similar with both extraction procedures, with RSD less than 5% and relative error less than 6% in all cases. These values are similar to or even lower than those obtained by other authors (Foulon *et al.*, 1999; Fucci *et al.*, 2003; Cámpora *et al.*, 2003, 2006; Cognard *et al.*, 2006), using different extraction procedures and analytical techniques.

The limit of quantitation of the proposed method was taken to be the lowest concentration in the calibration curve ($0.05 \mu\text{g ml}^{-1}$). On the other hand, the limit of detection was taken to be the lowest concentration causing a signal rise three times as high as the signal-to-noise ratio at the wavelength selected for each compound; they were found to be 10 ng ml^{-1} for cocaine, cocaethylene and BEG; 25 ng ml^{-1} for 6AM and methadone; and 35 ng ml^{-1} for morphine and EDDP in saliva with the two extraction procedures. These drugs have previously been determined in saliva using other techniques; GC-MS allowed opiates to be determined at lower concentrations (Jones *et al.*, 2002; Cámpora *et al.*, 2006) and cocaine at higher (Fucci *et al.*, 2003) or similar levels (Jenkins *et al.*, 1995; Moolchan *et al.*, 2000). On the other hand, LC-MS/MS allowed cocaine and its metabolites to be determined with LODs of *ca* 0.22 ng ml^{-1} (Mortier *et al.*, 2002) or 1 ng ml^{-1} (Clauwaert *et al.*, 2004).

Drug recoveries were calculated by comparing the area under the peak for each drug as obtained from five saliva samples at two concentrations (0.1 and $1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$) with that obtained by direct injection of a mobile phase containing identical analyte concentrations. They were found to range from 53 to 95% with Tox tubes and from 83 to 100% with MAE (Table 3). So microwave-assisted extraction provides recoveries higher than those obtained for opiates (Mortier *et al.*, 2002) and for cocaine (Clauwaert *et al.*, 2004) with solid-phase extraction.

Finally, the two extraction procedures were used to analyze 24 samples of saliva from opiate and/or cocaine users who were under a detoxification programme (Table 4). A total of 22 samples tested positive for cocaine or its metabolites, 12 for methadone or EDDP and eight for heroin metabolites. These results only allow one to confirm the absence of recent consumption, at the time samples were collected, in two cases for cocaine, 12 cases for methadone and 16 cases for heroin. Owing to the different sensitivities and drug recovery according to the applied extraction procedure, morphine, EDDP and methadone were detected in fewer cases when the saliva was processed using Tox tubes. The concentrations were lower than the average value for each drug in more than half of the cases (55–83%). Based on the average concentrations obtained, the parent drug predominated over its metabolites, consistent with the results of other authors (Clauwaert *et al.*, 2004; Moffat *et al.*, 2004). The levels for cocaine and its metabolites found in this work are similar to those reported by Cognard *et al.* (2006) and Foulon *et al.* (1999), but higher than those obtained by Moolchan *et al.* (2000). These differences can be ascribed to various factors including dose, saliva pH and the way samples were collected — which in our case involved using a commercially available device (Salivette®). Kato *et al.* (1993) found oral fluid obtained without stimulation to contain substantially higher drug levels than in samples collected upon stimulation with citric acid.

A comparison of the concentrations for the drugs in the positive samples revealed that the values obtained with microwave-assisted extraction were slightly higher than those obtained with Tox tubes but they were positively correlated, except for cocaethylene (Table 5). The microwave extraction system allows up to 12 samples to be simultaneously extracted, providing an increased analyte recovery within a shorter time than extraction with Tox tubes.

Table 3. Mean precision, accuracy and recoveries

	Sample preparation	RSD (%) between-day (<i>n</i> = 5)	Relative error (%), between-day (<i>n</i> = 5)	Recovery (%)
Morphine	MAE	3.22	3.63	83
	Tox tubes A	2.91	2.70	67
6AM	MAE	3.23	1.50	90
	Tox tubes A	2.79	1.18	53
BEG	MAE	1.89	3.13	89
	Tox tubes A	4.55	2.55	69
Cocaine	MAE	4.51	3.23	94
	Tox tubes A	3.20	5.05	86
Cocaethylene	MAE	2.23	2.73	100
	Tox tubes A	3.64	5.80	95
EDDP	MAE	2.29	5.70	94
	Tox tubes A	4.19	3.05	72
Methadone	MAE	2.53	2.40	96
	Tox tubes A	4.24	1.93	77

RSD, relative standard deviation.

Table 4. Drug concentrations found in 24 real samples of saliva

	Sample preparation	Cases positives	Mean \pm SD ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Maximum ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Minimum ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Morphine	MAE	8	1.79 \pm 1.15	3.49	0.39
	Toxītubes A	7	1.65 \pm 0.81	3.04	0.52
6AM	MAE	3	0.50 \pm 0.59	1.18	0.11
	Toxītubes A	3	0.46 \pm 0.67	1.07	0.12
BEG	MAE	20	0.75 \pm 0.55	1.59	0.05
	Toxītubes A	20	0.58 \pm 0.35	1.57	0.05
Cocaine	MAE	19	0.85 \pm 0.45	4.43	0.05
	Toxītubes A	19	0.69 \pm 0.42	2.99	0.05
Cocaethylene	MAE	6	0.057 \pm 0.014	0.07	0.05
	Toxītubes A	6	0.052 \pm 0.007	0.06	0.05
EDDP	MAE	8	0.97 \pm 0.80	2.10	0.20
	Toxītubes A	7	0.86 \pm 0.65	1.82	0.21
Methadone	MAE	12	1.68 \pm 0.042	5.87	0.10
	Toxītubes A	11	1.68 \pm 0.60	5.80	0.13

Table 5. Correlation between drug concentrations obtained with MAE and Toxītubes A

	Equation ($y = ax + b$) ^a	R ²
Morphine ($n = 7$)	$y = 1.168x + 0.061$	0.982
6AM ($n = 3$)	$y = 1.115x - 0.013$	0.999
BEG ($n = 20$)	$y = 1.083x + 0.120$	0.820
Cocaine ($n = 19$)	$y = 1.321x - 0.053$	0.957
Cocaethylene ($n = 6$)	$y = 1.600x - 0.026$	0.640
EDDP ($n = 7$)	$y = 1.159x + 0.042$	0.933
Methadone ($n = 11$)	$y = 1.001x + 0.193$	0.986

^a x, concentrations with Toxītubes A; y, concentrations with MAE.

Conclusion

The HPLC-DAD technique and microwave-assisted extraction to prepare the saliva samples provide good sensitivity and specificity for the determination of drugs of abuse in saliva, a biological matrix which has proved to be effective and useful in diagnosing overdose.

Acknowledgements—The authors wish to acknowledge funding of this work by Spain's CICYT (Project BFI2002-03385).

References

- Aps JKM, Martens LC. 2005. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci. Int.* **150**: 119–131.
- Barriada-Pereira M, González-Castro MJ, Muniategui-Lorenzo S, López-Mahía P, Prada-Rodríguez D, Fernández-Fernández E. 2004. Determination of 21 organochlorine pesticides in tree leaves using solid-phase extraction clean-up cartridges. *J. Chromatogr. A* **1061**: 133–139.
- Cámpora P, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P. 2003. Quantitation of cocaine and its major metabolites in human saliva using gas chromatography–positive chemical ionization–mass spectrometry (GC/PCI-MS). *J. Anal. Toxicol.* **27**: 270–274.
- Cámpora P, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P. 2006. Use of gas chromatography–mass spectrometry with positive chemical ionization for the determination of opiates in human oral fluid. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**: 1288–1292.

- Carro N, García I, Llompart MP. 2000. Closed-vessel assisted microwave extraction of polychlorinated biphenyls in marine mussels. *Analisis* **28**: 720–724.
- Christen P, Veuthey KL. 2001. New trends in extraction, identification and quantification of artemisinin and its derivatives. *Current Med. Chem.* **8**: 1827–1839.
- Clauwaert K, Decaestecker T, Mortier K, Lambert W, Deforce D, Van Peteghem C, Van Bocxlaer JF. 2004. The determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in small-volume oral fluid samples by liquid chromatography–quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **28**: 655–659.
- Cognard E, Bouchonnet S, Staub C. 2006. Validation of a gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of cocaine and its metabolites in saliva. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**: 925–934.
- Cone EJ, Presley L, Lehrer M, Seiter W, Smith M, Kardos KW, Fritch D, Salamone S, Niedbala RS. 2002. Oral fluid testing for drugs of abuse: positive prevalence rates by intercept immunoassay screening and GC-MS-MS confirmation and suggested cutoff concentrations. *J. Anal. Toxicol.* **26**: 541–546.
- De Jager L, Andrews ARJ. 2002. Development of a screening method for cocaine and cocaine metabolites in saliva using hollow fiber membrane solvent microextraction. *Anal. Chim. Acta* **458**: 311–320.
- Drummer OH. 2005. Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. *Forensic Sci. Int.* **150**: 133–142.
- Esilsson CS, Björklund E, Mathiasson L, Karlsson L, Tortensson A. 1999. Microwave-assisted extraction of felodipine tablets. *J. Chromatogr. A* **840**: 59–70.
- Foulon C, Menet MC, Manuel N, Pham-Huy C, Galons H, Claude JR, Guyon F. 1999. Rapid analysis of benzoylecgonine, cocaine, and cocaethylene in urine, serum, and saliva by isocratic high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Chromatographia* **50**: 721–727.
- Fucci N, De Giovanni N, Chiarotti M. 2003. Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva samples by SPME technique. *Forensic Sci. Int.* **134**: 40–45.
- Ganzler K, Szinai I, Salgó A. 1990. Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique. *J. Chromatogr.* **520**: 257–262.
- Jenkins AJ, Oyler JM, Cone EJ. 1995. Comparison of heroin and cocaine concentrations in saliva with concentrations in blood and plasma. *J. Anal. Toxicol.* **19**: 359–374.
- Jones J, Tomlinson K, Moore C. 2002. The simultaneous determination of codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, 6-acetylmorphine and oxycodone in hair and oral fluid. *J. Anal. Toxicol.* **26**: 171–175.
- Jufer R, Walsh SL, Cone EJ, Sampson-Cone A. 2006. Effect of repeated cocaine administration on detection times in oral fluid and urine. *J. Anal. Toxicol.* **30**: 458–462.
- Kadehjian L. 2005. Legal issues in oral fluid testing. *Forensic Sci. Int.* **150**: 151–160.
- Kato K, Hills Grove M, Weinhold L, Gorelick DA, Darwin WD,

- Cone EJ. 1993. Cocaine and metabolite excretion in saliva under stimulated and nonstimulated conditions. *J. Anal. Toxicol.* **17**: 338–341.
- López-Avila V, Young R, Benedicto J, Ho P, Kim R, Beckert WF. 1995. Extraction of organic pollutants from solid samples using microwave energy. *Anal. Chem.* **67**: 2096–2102.
- Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Galichet LY. 2004. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceutical, Body Fluids and Postmortem Material*. Pharmaceutical Press: London.
- Moolchan ET, Cone EJ, Wstadik A, Huestis MA, Preston KL. 2000. Cocaine and metabolite elimination patterns in chronic cocaine users during cessation: plasma and saliva analysis. *J. Anal. Toxicol.* **24**: 458–466.
- Mortier KA, Maudens KE, Lambert WE, Clauwaert KM, Van Bocxlaer JF, Deforce DL, Van Peteghem CH, De Leenheer AP. 2002. Simultaneous, quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **779**: 321–330.
- Niedbala RS, Kardos K, Fries T, Cannon A, Davis A. 2001. Immunoassay for detection of cocaine/metabolites in oral fluids. *J. Anal. Toxicol.* **25**: 62–68.
- Paré JRJ, Belanger JMR. 1994. Microwave assisted process (MAP): A new tool for the analytical laboratory. *Trends Anal. Chem.* **13**: 176–184.
- Speckl IM, Hallbach J, Guder WG, Meyer LV, Zilker T. 1999. Opiate detection in saliva and urine — a prospective comparison by gas chromatography–mass spectrometry. *Clin. Toxicol.* **37**: 441–445.





Optimization of a rapid microwave-assisted extraction method for the simultaneous determination of opiates, cocaine and their metabolites in human hair

P. Fernández^a, M. Lago^a, R.A. Lorenzo^b, A.M. Carro^{b,*}, A.M. Bermejo^a, M.J. Tabernero^a

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

^b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 December 2008

Accepted 24 April 2009

Available online 3 May 2009

Keywords:

Human hair

Drug of abuse

Microwave-assisted extraction

Experimental design

ABSTRACT

A rapid and cleanup-free microwave-assisted extraction (MAE) method is proposed for the simultaneous extraction of six illegal drugs of abuse – cocaine, benzoylecgonine (BZE), cocaethylene (CCE), morphine, 6-monoacetylmorphine (6AM) and codeine – from human hair samples. The analytes were determined using high performance liquid chromatography (HPLC) with photodiode array UV detection. The influence of several variables on the efficiency of the MAE procedure was investigated in detail by a multi-objective optimization approach based on a hybrid experimental design (17 experiments) and desirability functions. Six drugs were successfully extracted from human hair with recoveries close to 100% and good reproducibility (<3.6% RSD) under the optimal MAE conditions: 11 mL dichloromethane (DCM) extraction solvent, 60 °C extraction temperature, 9 min extraction time and 0.5 mL of methanol (MeOH) added to 50 mg of the hair sample in the extraction vessels. Limits of quantification of 0.2 ng mg⁻¹ were found for the studied compounds. A comparison of sample preparation procedures, including MAE, enzymatic digestion and digestion by aqueous acids, was also conducted. The results indicated that the global behaviour of sample procedures provided similar satisfactory recoveries ranging from 86 to 100%. Indeed, the MAE procedure resulted in a reduction of extraction time by 100-fold and the elimination of cleanup steps. Slightly higher recoveries of morphine, 6AM, BZE and CCE, at 1 ng mg⁻¹ concentration level and cocaine at 40 ng mg⁻¹ concentration level, were achieved using MAE. Lastly, the proposed MAE method was applied to several human hair samples from multidrug abusers.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hair analysis for drugs of abuse is routinely used in many countries in forensic and clinical fields [1]. Hair is an advantageous sample because of its substantially longer detection window (months to years) enabling retrospective investigation of chronic and past consumption. In addition, the collection, storage and transport of hair samples are easier and less invasive than the collection of blood or urine samples [2–4]. Moreover, hair samples may be useful even in post-mortem cases where other bodily fluids are unavailable. The drugs have been selected according to their high consumption, found in our country in recent years. Sample preparation for the extraction of illicit drugs from hair typically involves extraction with any amount of organic solvents such as methanol [3,5–12], acid [1,4,10,13–18] or basic [7,9,10,19] digestion, or enzymatic digestion [7,9,10,20–23]. The major drawback of these methods is the length of time needed to achieve

efficient recoveries. Extended methanol extraction (3–18 h) with ultrasonic bath can provide lower drug recoveries as compared to other procedures [5–8]. Digestion with sodium hydroxide, which completely dissolves the hair matrix, allows the solubilisation of all drugs. Unfortunately, under these conditions, 6AM, a unique proof of heroin abuse, is hydrolysed to morphine. Therefore, the alkaline procedure cannot be recommended for drugs that are not stable under these conditions [7,24]. The use of enzymes for hair analysis targets the destruction of the hair structure, thus promoting the release of the incorporated drugs to the digestion buffer. The hair is dissolved by incubating the sample with an enzyme at 40–60 °C temperature for 6–24 h. For this purpose several enzymes, including proteinase K and pronase E, have been used [7,9,22]. The disadvantages of the enzymatic digestion of hair have been considered given the fact that the resulting digest could, under certain conditions, denature the antibodies used for the preliminary detection of drugs by immunoassays [10]. Overnight digestion in an aqueous solution of 0.01–0.5 M HCl at 40–60 °C temperature or phosphate buffer, followed by post-cleanup using solid phase extraction columns is usually the extraction method of choice [4,7,24–27]. Thus, according to results from the third proficiency

* Corresponding author. Tel.: +34 981 563100; fax: +34 981 547141.
E-mail address: tuchi.carro@usc.es (A.M. Carro).

test organized by the Society of Hair Testing (SoHT), acid hydrolysis can offer higher yields for cocaine, opiates, and their metabolites than those obtained using enzymatic hydrolysis or methanol extraction [9].

More efficient environmentally friendly techniques for the rapid analytical extraction from solid matrices are supercritical fluids (SFE) [2,7,25,28] and microwave-assisted extraction (MAE). Compared with other traditional extraction techniques, MAE presents advantages such as the reduction of extraction time and solvent volume employed. It enables partial or total automation of the analytical process, decreases analyte loss, and increases personal safety [29–31]. Commercial microwave equipment with security systems and closed vessels have made MAE an analytical technique of interest and potential since these instruments enable the simultaneous extraction of drugs of abuse at a high pressure and temperature, facilitating rapid and selective analyte desorption from complex matrices such as human plasma and urine. Moreover, the extraction yields of the analytes are equivalent to those obtained with conventional methods [32,33].

Sensitive analytical technology for the targeted assay is necessary. One of the most widely used procedures – gas chromatography–mass spectrometry – requires prior derivatization of the non-volatile analytes [1,3,9,22,27,34,35]. Liquid chromatography [6–8,12–14,20] and capillary electrophoresis [36] combined with mass spectrometry have emerged as effective and useful approaches in this context, since they allow a large number of analytes to be separated with no derivatization requirements. Despite its advantages, LC–MS/MS remains limited to a small number of forensic toxicological laboratories because of its high cost [7]. The obtained results of drugs analysis by HPLC with photodiode array UV detection [33,37] were comparable to those provided by MS-based methods [38,39].

To the best of the authors' knowledge – at the time of preparation of this paper – no previously published peer review literature detailing the application of MAE for drugs determination in hair matrices was available. In this paper, a new method for extracting cocaine, CCE, BZE, 6AM, morphine and codeine from hair using microwave energy was developed. An experimental design with variations in time, volume of dichloromethane (DCM) extraction solvent, volume of methanol (MeOH) solvent modifier and temperature was employed to optimize the MAE conditions with minimal experimental effort [40–42]. The method presented here is advantageous in terms of total extraction time and handling steps, without the need of any supplemental cleanup. The optimal MAE process was compared with other conventional procedures and then the proposed method for determination of opiates, cocaine and metabolites in hair samples spiked with drugs was used in the validation process. Moreover, the method was applied for the determination of drugs in real-life hair samples from forensic cases involving several drugs of abuse and its robustness was evaluated in terms of recovery.

2. Experimental

2.1. Reagents

Standards of morphine, 6AM, cocaine, CCE and BZE were supplied by Cerilliant (Round Rock, TX, U.S.). Pronase E, dithiothreitol (DTT), sodium hydroxide, ammonium hydroxide (25%), hydrochloric acid (37%), potassium hydroxide, sodium hydrogen phosphate, potassium dihydrogen phosphate, boric acid, acetic acid, gradient-grade acetonitrile, methanol, chloroform, isopropanol and dichloromethane were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Tris(hydroxymethyl) aminomethane chloride (Tris–HCl buffer) was from Scharlau (Barcelona, Spain). Purified water was obtained from a Milli-Q water system from Millipore (Le Mont-sur-

Lausanne, Switzerland). Oasis HLB and MCX cartridges were from Waters® (Milford, MA).

2.2. Instruments and apparatus

Microwave-assisted extraction was performed with an ETHOS PLUS MPR300/12S from Milestone® (Agrigento, Italy) equipped with a solvent detector. The pressurized microwave oven was able to extract 12 samples simultaneously in PTFE-lined closed vessels under the same conditions (temperature and pressure), with simultaneous magnetic stirring of the sample and solvent inside.

The analyses of the extracts were performed on a Model 2695 liquid chromatograph from Waters® connected to a Model 996 diode array UV–vis detector (DAD). Data were processed with Millennium software 32® v. 3.05.01 for Windows 98. Samples were injected onto an XTerra® RP8 column (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) supplied by Waters®. In order to optimize peak resolution in the chromatograms and achieve efficient separation of the analytes in a reasonably short time (20 min), elution was performed in the gradient mode, using a flow rate 0.8 mL min⁻¹ and a mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile (A) and 20 mM phosphate buffer (pH 6.5) (B) set at a variable gradient program: 0–5 min, 10% A and 90% B; 5–7 min, 15% A and 85% B; 7–10 min, 20% A and 80% B; 10–15 min, 35% A and 65% B; 15–22 min, 50% A and 50% B; 22–25 min, 10% A and 90% B. Sensitivity was optimized by using the wavelengths of maximal chromatographic response for the analytes (*viz.* 233 nm for cocaine, BZE and CCE; 285 nm for morphine, codeine and 6AM) [33].

2.3. Hair sample preparation

Real hair samples were collected from 46 people ranging in age from 17 to 63 years (23 men and 23 women). All of the subjects were screened positive for drug abuse. Drug-free control hair was taken from 10 volunteers who had never used drugs and spiked with a standard solution containing all the drugs before extraction. The hairs were collected from the vertex posterior area as close as possible to the scalp and submitted to an initial procedure of decontamination by washing three times in 5 mL of a 0.1% solution of neutral soap (Tween 80), for 10 min each wash, rinsing three times with 5 mL of distilled water to eliminate any external contamination. The last wash cycle was analysed to exclude external contamination. After drying at 40 °C, the hair was cut into 1-mm segments. Then, 50 mg were weighted into a PTFE-lined extraction vessel.

2.4. Microwave extraction procedure

The nature of solvent (DCM) and the effect of the presence of a polar modifier like MeOH were fixed according to preliminary experiments and the results of a previous study on the determination of eight drugs of abuse from plasma samples [32]. The other experimental conditions were established on the basis of the results from the optimization studies. In the optimized method, 0.5 mL of MeOH was added to 50 mg of hair sample in the extraction vessels, being in equilibrium with the matrix before the addition of 11 mL of DCM. Extraction was carried out in 9 min at 60 °C. Following extraction, the vessel contents were filtered and the organic solvent was removed for evaporation to dryness under a N₂ stream at 40 °C. Finally, the dry extract was reconstituted in 100 µL of mobile phase and a 20 µL aliquot was injected into the chromatographic system for analysis.

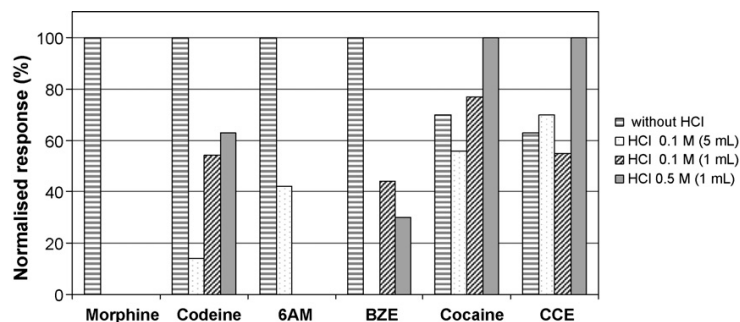


Fig. 1. Influence of hydrochloric acid presence on responses obtained for each drug by MAE.

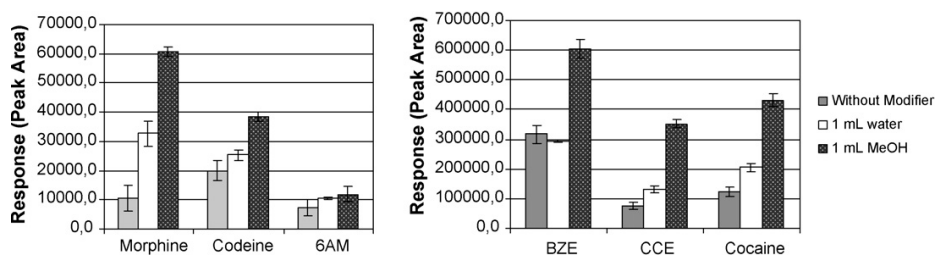


Fig. 2. Effect of polar modifier utilization on the extraction efficiency of MAE.

3. Results and discussion

3.1. Preliminary experiments

Preliminary studies were carried out in order to decide on the extraction solvent to be used, the type of modifier to be added to the sample before extraction, as well as to examine the effect of HCl on the MAE yields.

Three organic solvents were studied to select the ones that would be most suitable in this case. Chloroform, MeOH and DCM were tested, using MAE general conditions of 80 °C and 6 min. Owing to their electric characteristics, it was expected that the larger the dielectric constant and the dipole moment of the solvent, the more optimal the thermal energy would be [29]. However, the extracting selectivity and the ability of the medium to interact with microwaves can be modulated by the interactions of the matrix itself with microwaves. In this case, maximum effi-

ciency was observed when DCM (dielectric constant, 8.9, and dipole moment, 1.16 Debye) was used as a solvent since all the drugs were quantitatively extracted. In contrast, they could not be extracted using MeOH (dielectric constant, 32.6, and dipole moment, 2.87 Debye) or chloroform (electric constant, 5.5, and dipole moment, 1.1 Debye).

The use of microwave energy for accelerating the acid hydrolysis of human hair for extracting illicit drugs was tested, using MAE general conditions (80 °C, 6 min and 10 mL DCM) by adding different volumes and concentrations of HCl in extraction vessels and evaluating the effect on MAE yields. The results ($n = 2$) were compared with those obtained by MAE without HCl (Fig. 1) and it was observed that several drugs were not extracted when acid hydrolysis was used simultaneously with MAE. In the case of MAE without HCl, microwave heating was sufficient for the disruption of weak hydrogen bonds promoted by the dipole rotation of the molecules [29], providing the best extraction responses.

Table 1

Experimental plan for hybrid design and responses obtained (areas) in each experiment for drugs.

Run	Temperature (°C)	Time (min)	DCM volume (mL)	MeOH volume (mL)	Responses (areas)					
					Morphine	Codeine	6-MAM	BEG	Cocaine	Cocaethylene
1	80	7	8	1.0	31,025	18,398	20,417	431,505	119,838	212,019
2	53	5	6	0.7	36,736	23,171	23,794	513,110	150,488	287,900
3	53	5	10	0.7	42,214	25,839	27,849	541,685	161,006	349,425
4	107	5	6	0.7	45,650	25,126	29,076	546,336	175,910	350,473
5	107	5	10	0.7	46,098	24,775	29,273	593,236	188,204	322,328
6	53	9	6	0.7	37,869	22,119	24,898	512,465	143,715	311,048
7	53	9	10	0.7	51,732	34,266	39,387	614,132	250,627	504,727
8	107	9	6	0.7	42,061	23,174	28,089	557,541	171,569	360,001
9	107	9	10	0.7	43,693	25,075	27,184	590,478	177,153	293,746
10	80	7	5	0.2	46,201	27,820	29,595	577,865	186,336	350,563
11	80	7	11	0.2	46,057	29,517	35,399	573,307	223,788	431,355
12	40	7	8	0.2	48,928	28,581	32,968	622,096	190,822	368,085
13	120	7	8	0.2	43,123	27,534	29,748	573,436	193,059	386,466
14	80	4	8	0.2	46,262	27,996	30,958	586,399	192,853	361,745
15	80	10	8	0.2	46,104	27,971	28,970	563,587	198,055	394,929
16	80	7	8	0.5	45,137	26,374	28,416	557,318	173,603	365,812
17	80	7	8	0.5	46,231	25,643	27,745	602,048	153,735	294,046

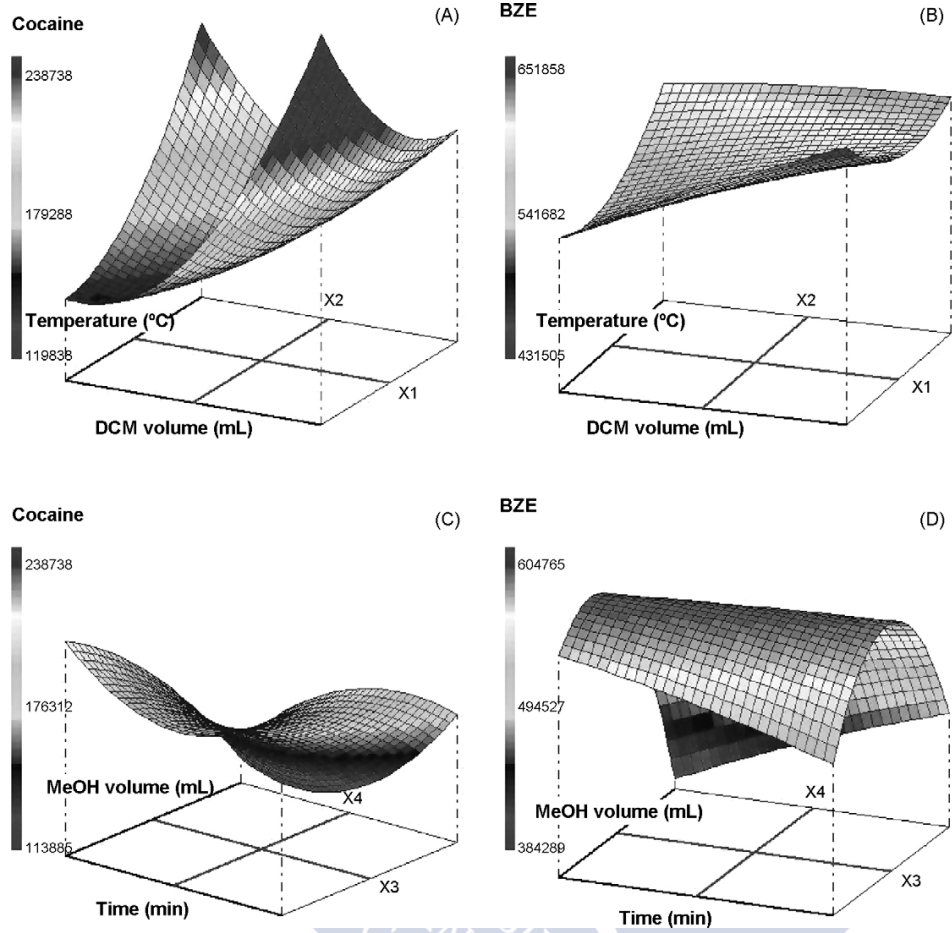


Fig. 3. Response surfaces of extraction efficiency (peak area) as function of temperature and DCM solvent volume for cocaine (A) and BZE (B) and as function of MeOH modifier volume and time for cocaine (C) and BZE (D).

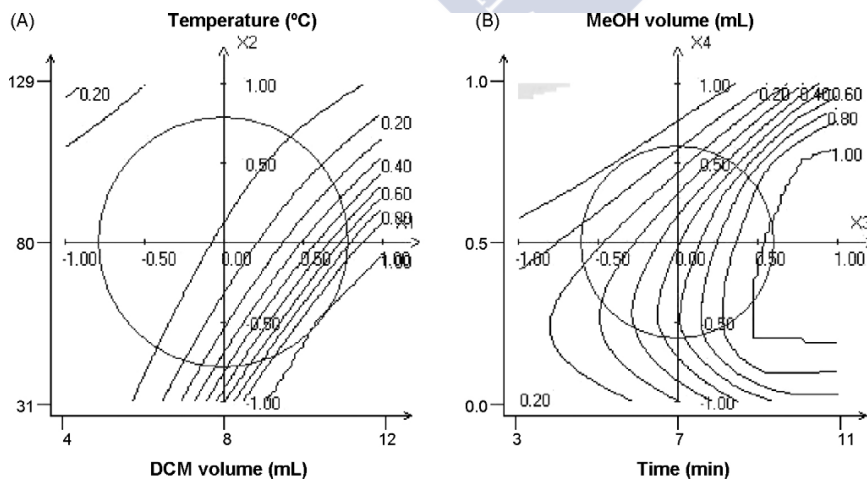


Fig. 4. Global desirability contour plots obtained in the optimization of MAE using a hybrid design.

Table 2
Comparison of the proposed method with conventional procedures: working conditions.

Enzymatic digestion (Ref. [18])	Acid digestion (Ref. [23])	Microwave-assisted extraction (this paper)
Temperature: 37 °C Time: 2 h + overnight Reagents: 500 µL of 12 mg mL ⁻¹ DTT and 500 µL of 2.0 mg mL ⁻¹ pronase E in Tris-HCl buffer 0.1 M, pH: 7.2 Ultracentrifugation: 5 min Cleanup: SPE (Oasis HLB) with 1 mL borax buffer, pH: 9.2 Rinsed with 2 mL MeOH:water (5:95) and 2 mL NH ₄ OH:MeOH:water (20:2:78) Vacuum-dried for 20 min Elution: 2 mL 2% acetic acid in MeOH Extract: Evaporated under a stream of N ₂ at 40 °C to dryness	Temperature: 60 °C Time: 12 h Reagents: 1 mL HCl 0.01 M, 1 mL NaOH 0.01 M, 1 mL phosphate buffer, pH: 7.0 Ultracentrifugation: 5 min Cleanup: SPE (Oasis MCX) Rinsed with 2 mL water, 1 mL acetate buffer, pH: 4 and 2 mL MeOH Vacuum-dried for 20 min Elution: 2 mL methylene chloride:isopropanol:ammonium hydroxide (80:18:2) Extract: Evaporated under a stream of N ₂ at 40 °C to dryness	Temperature: 60 °C Time: 9 min Reagents: 0.5 mL MeOH as modifier and 11 mL DCM as extraction solvent Ultracentrifugation: No Cleanup: No Extract: Evaporated under a stream of N ₂ at 40 °C to dryness

The suitability of MAE (at general conditions of 80 °C, 6 min and 10 mL DCM) with and without an added polar modifier prior to extraction of the studied drugs from human hair was assessed. We tested both water and MeOH as modifiers for MAE, and the results were compared to those reported for the extraction of hair with MAE in the absence of a polar modifier (Fig. 2). When MeOH was added to hair samples in the vessel before extraction, the presence of the modifier helped remove drugs from hair more easily than with unmodified MAE. Due to the responses obtained, further research work has focused on the use of MeOH.

3.2. Optimization of the MAE procedure

We used a hybrid design of a spherical domain to optimize the responses (analyte peak area) directly related to MAE. The design consisted of three factors with five levels and one factor with four levels: extraction temperature (40, 53, 80, 107 and 120 °C), extraction time (4, 5, 7, 9 and 10 min), DCM solvent volume (5, 6, 8, 10, and 11 mL) and MeOH volume added to the sample as a modifier (0.2, 0.5, 0.7 and 1 mL). The proposed experimental design (15 experiments + 2 central points) is shown in Table 1. NEMROD[®]W software was used for the generation and evaluation of the experimental design [43]. The three-dimensional response surface shows the effect of two independent variables on a given response, at a constant value (central value) of the other two independent variables.

Thus, for cocaine (Fig. 3A), morphine and CCE, higher responses were obtained when temperature and DCM volume were at opposite levels, whereas for codeine, 6AM and BZE (Fig. 3B) extraction efficiency was favoured by high DCM volume and low temperature values. Similar opposing behaviours were observed when temperature and time factors were considered for morphine, BZE, cocaine and CCE. Also, better responses were obtained when time and MeOH volume were at their lowest levels for 6AM and cocaine (Fig. 3C). However, middle values of MeOH volume without a significant time effect, for morphine, codeine, BZE (Fig. 3D) and CCE produced higher results. The response contour plots serve as a preliminary graphical approach to optimization, but the use of multicriteria optimization based on the construction of a desirability function for each individual response provided the identification of the best-compromise conditions for the simultaneous extraction of drugs using MAE [44]. Each individual desirability function was chosen from a family of linear or exponential continuous functions, and ranged from zero (undesirable response) to one (optimal response). The overall desirability function (*D*) was estimated as the geometric average of the individual desirability functions (*d_i*) using NEMROD[®]W without additional experiments. In this case, MAE efficiency was maximised (*d_i* = 1 for the highest areas) and the *D* function acquires its maximum value of 1 (Fig. 4) under the following optimal conditions: 60 °C, 9 min, 11 mL of DCM and 0.5 mL of MeOH.

Table 3
Precision and accuracy for analysis of drugs in fortified hair. Comparison of sample preparation procedures.

Drug	Target concentration (ng mg ⁻¹)	Enzymatic digestion (<i>n</i> = 5)		Acid digestion (<i>n</i> = 5)		MAE (<i>n</i> = 5)	
		1.0	40.0	1.0	40.0	1.0	40.0
Morphine	Mean concentration (ng mg ⁻¹)	0.86	37.9	0.88	38.3	1.00	40.00
	% Recovery	86	95	88	96	100	100
	% RSD	6.6	4.3	1.8	5.2	1.8	0.8
Codeine	Mean concentration (ng mg ⁻¹)	0.89	39.0	0.91	36.1	1.01	39.98
	% Recovery	89	98	91	90	101	100
	% RSD	8.1	5.7	5.1	3.0	3.6	0.4
6AM	Mean concentration (ng mg ⁻¹)	0.87	40.3	0.92	37.6	0.99	40.00
	% Recovery	87	101	92	94	99	100
	% RSD	6.6	6.9	6.0	7.0	2.1	0.7
BZE	Mean concentration (ng mg ⁻¹)	0.89	36.3	0.97	39.6	0.99	40.00
	% Recovery	89	91	97	99	99	100
	% RSD	3.4	3.4	9.0	1.1	3.1	0.6
Cocaine	Mean concentration (ng mg ⁻¹)	0.96	36.0	1.02	35.3	1.00	40.00
	% Recovery	96	90	102	88	100	100
	% RSD	6.5	4.0	6.7	4.2	2.7	0.6
Cocaethylene	Mean concentration (ng mg ⁻¹)	0.87	35.8	0.86	35.2	1.00	40.00
	% Recovery	87	89	86	88	100	100
	% RSD	6.8	6.0	1.1	2.8	2.2	0.8

3.3. MAE-HPLC/DAD method validation

The analytes were identified from their retention times (*viz.* 6.35 min for morphine, 9.22 min for codeine, 10.53 min for BZE, 11.89 min for 6AM, 14.78 min for cocaine, 15.83 min for CCE) and absorption spectra. This gives the method a high specificity as it provides information about the purity of the corresponding peaks.

Linearity was assessed by injecting each sample five times over a concentration range of 0.5–40 ng mg⁻¹. Results obtained for the correlation coefficients (R^2) varied between 0.9992 and 0.9999. Quantification was based on the standard addition method using hair samples spiked with a multistandard mixture of a known concentration, in order to avoid matrix effects. Precision was investigated studying intra-day repeatability and inter-day reproducibility. Relative standard deviations (RSD), and accuracy (relative error), were evaluated at three concentration levels (1, 10 and 40 ng mg⁻¹) to the MAE procedure described above. The results showed low RSD, from 0.98 to 6.3% ($n=5$) for intra-day precision and from 0.43 to 3.6% ($n=5$) for inter-day precision. Intra-day relative errors were less than 7% in all cases while inter-day relative errors were less than 4%. Quantification limits (LOQs) were calculated for a S/N ratio of 10 [45]. The LOQs achieved were 0.2 ng mg⁻¹ for all the drugs. These limits are in the range of ng mg⁻¹, suggested for these drugs in the recommendations for hair testing in forensic cases by the Society of Hair Testing [46].

3.4. Comparison between MAE and two digestion procedures

Acid and enzymatic preparations always show higher drug recoveries compared with methanol and ultrasonic extraction. Moreover, it is not possible to differentiate between the medical intake of codeine or morphine from heroin abuse by means of alkaline digestion. Therefore, the analytical precision and recovery of the MAE technique were studied in quintuplicate and compared with enzymatic digestion and acid digestion. The results were analysed by HPLC/DAD after subjecting 50 mg of drug-free hair samples spiked at two concentration levels for each drug to the three procedures described in Table 2. Data in Table 3 shows the relative effectiveness of the three extraction procedures applied. As shown, all the tested extraction procedures gave good analytical results, with recoveries ranging from 86 to 102%. The statistical comparison between the different extraction procedures exhibited a significant effect (95% confidence level) between-methods variance (ANOVA test, using Statgraphics Plus version 5.1 for windows (Manugistics, Inc., Rockville, MD, USA)). Enzymatic and acid digestion presented similar recoveries (within 86–102% range) and RSD (within 1.1–9% range) values, while MAE recoveries were more efficient (ranging between 99 and 101%) and precision values (ranging between 0.4 and 3.6%) were lower than conventional methods. According to the ANOVA, no significant effects were found in between-drug variance ($p=0.45$) or between-concentration level ($p=0.22$).

Also, a multifactor analysis of variance (ANOVA) was performed to compare the results obtained with enzymatic digestion, acid digestion and MAE from real hair samples of six forensic cases. Positive results were obtained only for the two most commonly found drugs or metabolites (BZE and cocaine) (Table 4). The absence of statistical significance (95% confidence level) for the factor extraction method was demonstrated. However, the results obtained for the analysed samples were statistically different ($p \leq 0.05$) depending on the origin of the forensic case. Thus, there were two homogeneous sample groups formed for the following samples: 1, 2, 3, 4 and 6; and sample 5 constituted a separate single group. On the other hand, the results obtained for the analysed drugs were also statistically different ($p \leq 0.05$) because the concentrations range

Table 4

Concentration range of drugs in human hair samples ($n=6$) from forensic cases obtained by different extraction methods. ANOVA analysis demonstrating the absence of statistical significance (95% confidence level) for the factor extraction method.

Procedure	Concentration range (ng mg ⁻¹)	
	BZE	Cocaine
Acid digestion	0.40–1.92	1.67–28.29
Enzymatic digestion	0.57–2.21	2.12–33.86
Microwave-assisted extraction	0.42–2.03	1.76–34.63
Factor	ANOVA	
	F-Ratio	p-Value
Extraction procedure	0.11	0.90
Drug	11.74	0.00
Sample	5.72	0.00

(1.67–34.63 ng mg⁻¹) for cocaine, as expected, was higher than the range obtained for BZE (0.40–2.21 ng mg⁻¹).

3.5. Application of the method to hair samples from multidrug abusers

The applicability of the MAE-HPLC/DAD proposed method was checked by analysing in duplicate $N=46$ real hair samples from drug abusers who consumed different types of drugs under study (Table 5). The only drug detected in 35 samples was cocaine; heroin was found in only 2 cases and the 2 drugs combined in 9 cases. In most of the hair samples, positive for opiates the concentration of 6AM was higher (8 cases) than that of its metabolite, morphine (6 cases). Cocaine also tended to be found in higher concentrations than its two metabolites, BZE and CCE. The overwhelming presence of BZE, in 44 cases, may be attributed to the rapid biotransformation of cocaine, while the presence of CCE in 5 cases would suggest the

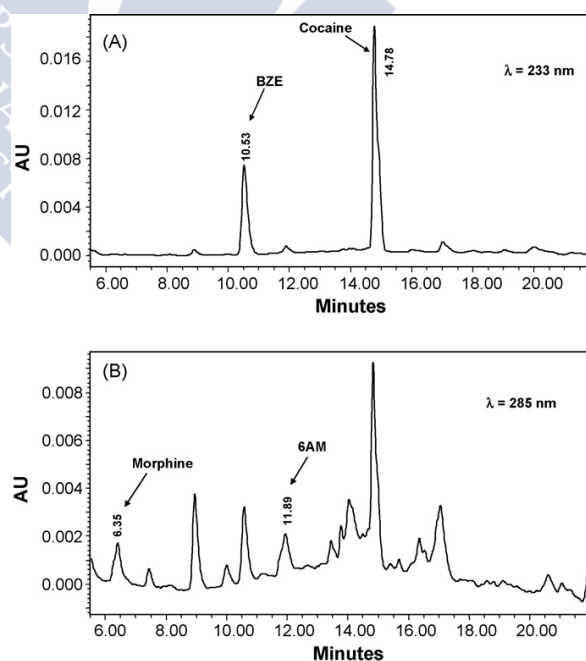


Fig. 5. Chromatograms for drug separation after MAE-HPLC/DAD method corresponding to a hair sample from consumer, monitoring at $\lambda = 233$ nm (A) and at $\lambda = 285$ nm (B), MAE optimal conditions: 60 °C, 9 min, 11 mL DCM, 0.5 mL methanol.

Table 5
Analytical results from $N = 46$ real hair samples from multidrug abusers using the proposed MAE-HPLC-DAD method.

Case sample number	Concentration values (ng mg ⁻¹)					
	Morphine	Codeine	6AM	BZE	Cocaine	Cocaethylene
1	–	2.57	9.85	–	–	–
2	–	–	–	1.85	11.52	–
3	–	–	–	0.45	3.23	–
4	–	–	–	0.42 ^a	1.76	–
5	–	–	–	7.95	34.63	–
6	–	–	–	0.57	2.97	–
7	–	–	–	2.03	6.43	–
8	–	–	–	6.44	29.32	–
9	–	–	–	17.29	56.25 ^b	–
10	–	–	–	3.65	23.90	–
11	–	–	–	0.76	4.54	–
12	7.42	–	4.80	36.11	171.09 ^b	–
13	–	–	–	1.51	7.41	–
14	–	–	–	13.18	157.94 ^b	–
15	–	–	–	3.67	25.60	–
16	–	–	–	4.29	52.99 ^b	–
17	–	–	–	4.03	48.71 ^b	–
18	–	–	–	31.38	141.33 ^b	–
19	–	–	–	1.93	4.79	–
20	–	–	–	16.07	64.49 ^b	–
21	3.61	1.34	–	–	–	–
22	–	–	–	7.32	29.97	–
23	–	–	–	3.63	27.30	–
24	–	–	–	0.78	–	–
25	–	–	–	2.80	5.23	–
26	–	–	–	2.93	–	–
27	–	0.31	0.94	5.22	3.16	–
28	0.62	–	–	16.35	10.68	–
29	0.71	–	–	29.11	17.43	–
30	0.85	–	2.74	4.99	3.39	–
31	–	–	3.97	0.69	2.32	0.66
32	–	–	–	0.39 ^a	–	0.41
33	–	–	–	0.36 ^a	–	4.32
34	3.41	8.91	12.93	4.14	5.90	2.87
35	–	–	–	15.20	7.96	–
36	–	–	–	0.34 ^a	–	–
37	–	–	–	0.57	–	–
38	–	–	–	0.51	–	–
39	–	–	1.58	7.10	8.89	–
40	–	–	–	4.59	5.04	–
41	–	–	–	17.48	8.30	–
42	–	–	–	0.77	2.92	<LOQ
43	–	–	–	1.15	–	<LOQ
44	–	–	–	0.39 ^a	–	1.14
45	–	–	–	0.39 ^a	1.27	–
46	–	–	7.50	45.83 ^b	25.05	–

–: Not detected.

^a Results obtained by MAE using 100 mg of hair sample.

^b Results obtained by MAE using a dilution step.

combined use of cocaine and ethyl alcohol. These findings demonstrate that 6AM and BZE are good markers of the consumption of heroine and cocaine, respectively. Fig. 5 shows the two chromatograms obtained after the optimization of the MAE process for a hair sample from a drug user, determining cocaine (27.3 ng mg⁻¹), BZE (3.6 ng mg⁻¹) at $\lambda = 233$ nm, 6AM (7.4 ng mg⁻¹) and morphine (4.8 ng mg⁻¹) at $\lambda = 285$ nm.

4. Conclusions

This paper describes a simple and fast sample preparation method based on a microwave-assisted extraction with HPLC/DAD determination and has proved that it is an efficient and quantitative procedure for the simultaneous detection and analysis of six drugs of abuse in the hair of heroin and/or cocaine users.

Application of a hybrid design and desirability functions allowed the optimization of MAE parameters. The variables investigated were extraction temperature, extraction time, solvent volume and

MeOH, as modifier, volume. The total time of analysis, which is now becoming one of the most important factors, was significantly decreased when microwave energy was applied. MAE is faster (9 min) than the conventional digestion procedures and besides, simultaneous extractions can be performed in a microwave oven while only sequential extractions can be conducted with conventional hydrolysis. With regard to the straightforward methodology used, the MAE technique is clearly better than traditional procedures since MAE does not require additional cleanup steps.

The use of DAD does not require previous derivatization and improves the method's selectivity by facilitating the selection of the optimal wavelength for the maximal chromatographic response of the analytes.

Although methods such LC-MS/MS do provide high selectivity and sensitivity, not all laboratories have access to these instruments. For this reason and on the basis of the levels usually found in real samples, the method proposed here is a good analytical tool that will be useful in determining the previous history of drug abuse

and it meets all the necessary requisites to be implemented in a clinical and/or forensic Toxicology Laboratory.

Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge funding from Spain's CICYT (Project BF12002-03385).

References

- [1] M. Montagna, A. Poletti, C. Stramesi, A. Groppi, C. Vignali, *Forensic Sci. Int.* 128 (2002) 79.
- [2] W.E. Brewer, R.C. Galipo, K.W. Sellers, S.L. Morgan, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2371.
- [3] C. Gambelunghe, R. Rossi, C. Ferranti, R. Rossi, M. Bacchi, *J. Appl. Toxicol.* 25 (2005) 205.
- [4] M. Felli, S. Martello, R. Marsili, M. Chiarotti, *Forensic Sci. Int.* 154 (2005) 96.
- [5] M. Klys, S. Rojek, J. Kulikowskab, E. Bożek, M. Scisłowski, *J. Chromatogr. B* 854 (2007) 299.
- [6] K.B. Scheidweiler, M.A. Huestis, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4358.
- [7] F. Pragst, M.A. Balikova, *Clin. Chim. Acta* 370 (2006) 17.
- [8] C. Hoelzle, F. Scheufler, M. Uhl, H. Sachs, D. Thieme, *Forensic Sci. Int.* 176 (2008) 13.
- [9] C. Jurado, H. Sachs, *Forensic Sci. Int.* 133 (2003) 175.
- [10] V.A. Boumba, K.S. Ziavrou, T. Vougiouklakis, *Int. J. Toxicol.* 25 (2006) 143.
- [11] L. Skender, V. Karadžić, I. Brčić, A. Bagarić, *Forensic Sci. Int.* 125 (2002) 120.
- [12] K.B. Scheidweiler, E.J. Cone, E.T. Moolchan, M.A. Huestis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313 (2005) 909.
- [13] K.M. Clauwaert, J.F. Van Bocxlaer, W.E. Lambert, E.G. Van den Eeckhout, F. Lemièrre, E.L. Esmans, A.P. De Leenheer, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2336.
- [14] R.B. Paulsen, D.G. Wilkins, M.H. Slawson, K. Shaw, D.E. Rollins, *J. Anal. Toxicol.* 25 (2001) 490.
- [15] R. Gottardo, F. Bortolotti, G. De Paoli, J.P. Pascali, I. Mikšik, F. Tagliaro, *J. Chromatogr. A* 1159 (2007) 185.
- [16] C. Girod, C. Staub, *Forensic Sci. Int.* 117 (2001) 175.
- [17] E. Cognard, S. Rudaz, S. Bouchonnet, C. Staub, *J. Chromatogr. B* 826 (2005) 17.
- [18] C. Girod, C. Staub, *Forensic Sci. Int.* 10 (2000) 261.
- [19] M. Deveaux, P. Kintz, J.-P. Goullé, J. Bessard, G. Pépin, D. Gosset, *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 389.
- [20] V. Hill, T. Cairns, M. Schaffer, *Forensic Sci. Int.* 176 (2008) 23.
- [21] M. Schaffer, V. Hill, T. Cairns, *J. Anal. Toxicol.* 29 (2005) 319.
- [22] M. Míguez-Framil, A. Moreda-Piñeiro, P. Bermejo-Barrera, P. López, M.J. Taberero, A.M. Bermejo, *Anal. Chem.* 79 (2007) 8564.
- [23] P. López, A.M. Bermejo, M.J. Taberero, P. Fernández, I. Álvarez, *Anal. Lett.* 39 (2006) 2307.
- [24] V. Cirimele, P. Kintz, P. Mangin, *Biomed. Chromatogr.* 10 (1996) 179.
- [25] J.F. Morrison, S.N. Chesler, W.J. Yoo, C.M. Selavka, *Anal. Chem.* 70 (1998) 163.
- [26] C. Moore, C. Coulter, K. Crompton, *J. Chromatogr. B* 859 (2007) 208.
- [27] M. Ventura, C. Stramesi, S. Pichini, R. Ventura, M. Pujadas, R. Di Giovannandrea, P. Zuccaro, R. Pacifici, K. Langohr, R. De la Torre, *Forensic Sci. Int.* 176 (2008) 2.
- [28] P. Edder, C. Staub, J.L. Veuthey, I. Pierroz, W. Haerdi, *J. Chromatogr. B* 658 (1994) 75.
- [29] B. Kaufmann, P. Christen, *Phytochem. Anal.* 13 (2002) 105.
- [30] L. Chen, D. Song, Y. Tian, L. Ding, A. Yu, H. Zhang, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 151.
- [31] V. Mandal, Y. Mohan, S. Hemalatha, *Pharmacogn. Rev.* 1 (2007) 7.
- [32] P. Fernández, M. Lago, R.A. Lorenzo, A.M. Carro, A.M. Bermejo, M.J. Taberero, *J. Anal. Toxicol.* 31 (2007) 388.
- [33] P. Fernández, M. Lago, R.A. Lorenzo, A.M. Carro, A.M. Bermejo, M.J. Taberero, *J. Appl. Toxicol.* 27 (2007) 373.
- [34] K. Blau, J. Halket (Eds.), *Handbook of Derivatives for Chromatography*, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 1997.
- [35] S. Paterson, N. McLachlan-Troup, R. Cordero, M. Dohnal, S. Carman, *J. Anal. Toxicol.* 25 (2001) 203.
- [36] R.A. Anderson, M.M. Ariffin, P.A.G. Cormack, E.I. Miller, *Forensic Sci. Int.* 174 (2008) 40.
- [37] M.R. Brunetto, Y. Delgado Cayama, L. Gutiérrez García, M. Gallignani, M.A. Obando, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 115.
- [38] Y. Gaillard, G. Pepin, *J. Chromatogr. A* 762 (1997) 251.
- [39] M. Concheiro, A. de Castro, O. Quintela, M. López-Rivadulla, A. Cruz, *J. Chromatogr. B* 832 (2006) 81.
- [40] E. Fuentes, M.E. Báez, R. Labra, *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 40.
- [41] C. Pizarro, J.M. González-Sáiz, N. Pérez-del-Notario, *J. Chromatogr. A* 1132 (2006) 8.
- [42] M. Careri, C. Corradini, L. Elvira, A. Mangia, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 274.
- [43] D. Mathieu, J. Nony, R. Phan-Tan-Luu, NemrodW, ver. 2001, LPRAI, Marseille.
- [44] G.A. Lewis, D. Mathieu, R. Phan-Tan-Luu, *Pharmaceutical Experimental Design*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1999.
- [45] F.T. Peters, H.H. Maurer, *Accred. Qual. Assur.* 7 (2002) 441.
- [46] Society of Hair Testing, *Forensic Sci. Int.* 145 (2004) 83.

paper presents, for the first time, a MAE procedure, optimized using an experimental design, to extract six benzodiazepines (bromazepam, alprazolam, lorazepam, lormetazepam, diazepam and tetrazepam) from vitreous humor. MAE involves fewer stages and less sample handling and time consumption (10 min) than conventional SPE procedures. MAE is a good alternative approach since no cleanup step is required and among its advantages is a high extraction rate, automation feasibility, and that simultaneous processing of different samples can be performed. A method of HPLC-PDA was developed to determine the analytes in a shorter analysis time of 20 min. The optimized methodology was applied to several vitreous humor samples obtained from benzodiazepine consumers which had been received in our laboratory for toxicological interpretation.

Experimental

Chemicals

Standards of benzodiazepines were from Cerilliant (Round Rock, TX). Gradient-grade acetonitrile, ethyl acetate and methanol were from Merck (Darmstadt, Germany). Purified water was obtained from a Milli-Q water system (Millipore, Le Mont-sur-Lausane, Switzerland). A 0.02 M phosphate buffer was prepared by dissolving 2.72 g of potassium dihydrogen phosphate in one liter of Milli-Q water and adjusting the pH to 6.0 with potassium hydroxide. Individual stock solutions containing 1 mg mL⁻¹ of each drug were prepared in methanol. Working-strength solutions containing the six benzodiazepines were made by successive dilution of the stock solutions to obtain final concentrations of 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 and 5.0 µg mL⁻¹ in vitreous humor. All solutions were stored frozen.

Instrumentation

The microwave extractor system equipped with a solvent detector was an ETHOS PLUS MPR300/12S from Milestone® (Agrigento, Italy). The system was able to extract 12 samples simultaneously in PTFE-lined extraction closed vessels under the same conditions (temperature and pressure), with simultaneous magnetic stirring of the sample and solvent inside. An inboard pressure control system was installed for monitoring and controlling the pressure and conditions inside the extraction vessels. This oven allowed a maximum of 1000 W, and the power adjusted automatically to reach and maintain the temperature selected. In this study a power of 1000 W was selected. The temperature and power conditions provided a pressure of 35 bar in the system.

Analyses were carried out with a Waters® 2695 chromatograph (Milford, MA) connected to a Model 996 photodiode array detector, also from Waters. Data were processed with the software Empower Pro®. Samples were injected onto an XBridge™ Shield RP18 (250 × 4.6 mm id, 5 µm particle size) stainless steel column from Waters. The chromatographic separation of the benzodiazepines was optimized studying different gradients (variation of the percentages of acetonitrile and phosphate buffer throughout the time of analysis). The best peak

resolution in the chromatograms was obtained when the elution was done with a mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile (A) and 0.02 M phosphate buffer pH 6 (B), at a flow of 0.8 mL min⁻¹, in gradient mode: 0–1 min, 34% A and 66% B; 10 min, 46% A and 54% B; 15 min, 60% A and 40% B, and 20 min, 34% A and 66% B.

Vitreous humor samples

Drug-free vitreous humor was used for the preparation of calibration standards. Vitreous humor samples were obtained from individuals whose death was associated with benzodiazepines and heroin or benzodiazepines and cocaine. The samples were stored at 4 °C, unless the analysis was delayed, in which case the samples were frozen. All studies were conducted in accordance with the World Medical Association's "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects".²⁹

Microwave-assisted extraction

After mixing 0.5 mL of vitreous humor with 1 mL of acetonitrile and centrifuging for 10 min at 14 000 rpm to eliminate proteins, the supernatant was separated, and 2 mL of borate buffer (pH 9) was added to ensure that the benzodiazepines were in their non-ionized forms and could easily transfer to the organic phase. The extraction was done by stirring at 98 °C for 10 min and using 10 mL of ethyl acetate. After cooling, the extraction vessels were opened and the extracts were centrifuged for 10 min at 4000 rpm to separate the organic phase from the aqueous one. The former was dried under a nitrogen stream at 40 °C and the dry extract was redissolved in 100 µL of mobile phase, consisting of 34% acetonitrile and 66% phosphate buffer (pH 6), and 30 µL was injected into the chromatograph.

Experimental design

Experimental design is applied to determine, in an efficient and informative way, the set of conditions that are required to obtain a product or process with desirable, often optimal, characteristics. Response surface methodology was selected to maximize MAE efficiency.^{30,31} Central composite design (CCD) provides a great deal of information on experiment variable effects and overall experimental error in a minimum number of required runs.^{10,31} A CCD with two central points was chosen to investigate the influence of solvent volume, extraction time and extraction temperature on the responses (peak area of each benzodiazepine) directly related to MAE. Each factor was tested at five levels: 5, 7, 10, 13 and 15 mL of solvent; 5, 7, 10, 13, and 15 min; and 60, 72, 90, 108 and 120 °C. The design consisted of eight points of the full factorial design, six axial points at a distance $\alpha = 1.682$, and a centered point tested two times. The experiments were randomly conducted to provide protection against the effects of lurking variables. A second-order polynomial model was fitted for each benzodiazepine response, giving an equation in the following form:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n b_{ij} x_i x_j$$

where x_i is the coded value of the factors studied (extraction temperature, time, and solvent volume) and y is the response function (peak area) obtained for each benzodiazepine. The b values are the estimated polynomial coefficients: b_0 is the intercept term, the b_i coefficients represent the main effect for each variable, the b_{ij} coefficients in the quadratic terms are responsible for the curvature effects, and the $b_{ij}(i \neq j)$ coefficients describe the interaction effects. The response values obtained were used to estimate the model coefficients b_i through multilinear regression by the least-squares method. The validation of the model was performed through analysis of variance (ANOVA). To establish practical compromise settings for the simultaneous compound extraction conditions, a multicriteria decision was applied, conducting the procedure using desirability functions based on partial Derringer functions.^{10,32} Each analyte response was transformed using a dimensionless partial desirability (d_i) scale, which ranged between $d = 0$ for a completely undesirable response and $d = 1$ for a fully desired response, without additional experiments. Non-linear left unilateral desirability functions were required to maximize each response efficiency. A global desirability function (D), which represents the global quality of the common optimum, was calculated by combining single desirability functions, usually as the geometric mean.

Results and discussion

Optimization of MAE

Before applying the experimental design, five different extraction solvents were evaluated under intermediate conditions: 89 °C, 12 min and 8 mL of solvent. It was demonstrated that dichloromethane, methanol and hexane only extract low quantities of lorazepam, lormetazepam, alprazolam, bromazepam and/or diazepam, while the recovery of tetrazepam is low when a chloroform-isopropanol mixture (4 : 1, v/v) is used. Maximum efficiency was observed using ethyl acetate, which enabled quantitative extraction of all benzodiazepines studied (provided in ESI, Fig. S1†).

The responses obtained from the design experiments were analyzed with the NemrodW program.³² ANOVA showed no statistical significance of the effects associated with factors and interactions. The extraction efficiency was good for the analytes,

except for tetrazepam and lorazepam, which presented a different behavior for the volume of solvent. Fig. 1 shows the three-dimensional response surfaces for values of desirability from 0.0 to 1.0. The optimum conditions of MAE for all benzodiazepines in vitreous humor correspond to the medium-high values of the three factors: a temperature of 98 °C, 10 min of extraction time and 10 mL of solvent (ethyl acetate).

Validation of method

To verify the validity of the analytical methods developed and check whether they are appropriate for solving analytical problems, it is necessary to demonstrate compliance to a number of quality parameters. The criteria used in this paper are those recommended by several organizations^{33,34} and other published works,^{35,36} which study linearity, limits of detection and quantification, selectivity, precision, and accuracy (in terms of recovery).

The working wavelength was set at 230 nm, and the retention times were 8.05 min for bromazepam, 10.66 min for alprazolam, 11.99 min for lorazepam, 14.84 min for lormetazepam, 16.80 min for diazepam, and 19.41 min for tetrazepam (Fig. 2a). The final analysis time was 20 min, which is less than the 30 min analysis time obtained by Cabarcos *et al.*²⁸ The calibration curves were established with vitreous humor samples spiked at seven concentration levels with five replicates for each level, in the range 0.05–5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Linearity was satisfactory for all compounds, with regression coefficients higher than 0.99 (Table 1). The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were determined from the lowest concentrations with signal to noise ratios of at least 3 and 10, respectively. LOD values ranged from 10 to 13 ng mL^{-1} . Table 1 shows the LOQ values. Cabarcos *et al.*²⁸ found similar LOQs for several benzodiazepines in vitreous humor, using HPLC-PDA. The selectivity is the ability of an analytical method to distinguish and quantify the analyte in the presence of endogenous components of the sample. Analysis of five drug-free vitreous humor samples showed that there are no interferences because of the lack of response at the retention times of the compounds studied (lower chromatogram in Fig. 2a), proving that this method is sufficiently selective for the determination of benzodiazepines in vitreous humor.

The precision and accuracy (in terms of recovery) for the six benzodiazepines studied were calculated from five replicate

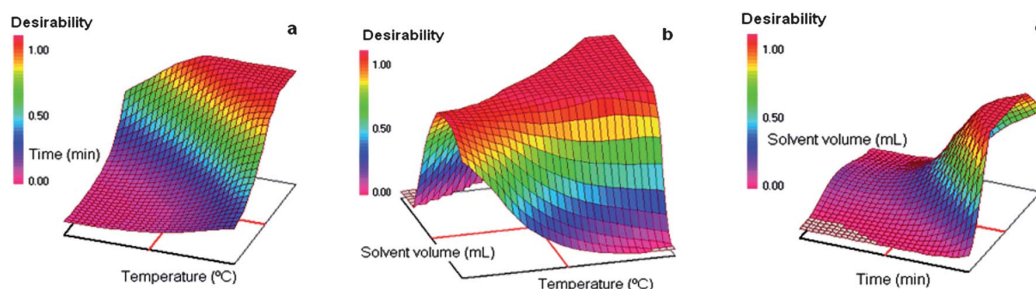


Fig. 1 Response surfaces of global desirability obtained using a central composite design for the target benzodiazepines (BZDs) versus time and temperature (a), solvent volume and temperature (b) and solvent volume and time (c).

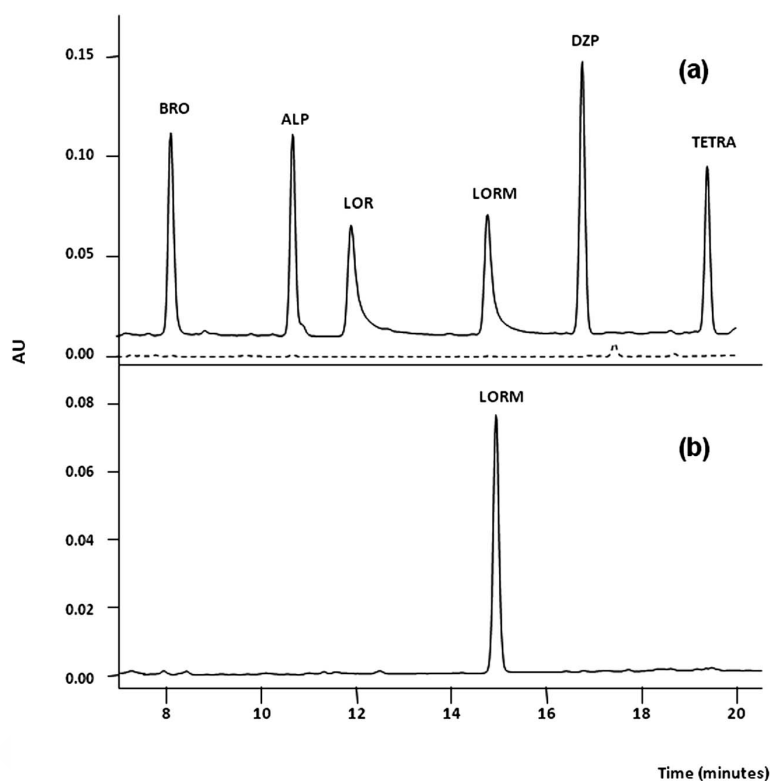


Fig. 2 Chromatograms of: (a) vitreous humor containing $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ of all BZDs and a blank sample (---); and (b) a real vitreous humor sample containing $3.45 \mu\text{g mL}^{-1}$ of lormetazepam. BRO: bromazepam; ALP: alprazolam; LOR: lorazepam; LORM: lormetazepam; DZP: diazepam; TETRA: tetrazepam.

analyses in blank vitreous humor samples spiked at three concentrations, 0.1, 1.0 and $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$. The intraday precision ranged from 1.1 to 6.2% and the interday precision ranged from 3.6 to 7.9%, both expressed as relative standard deviations. The mean recoveries oscillated between $87.6 \pm 7.1\%$ for diazepam and $101.2 \pm 4.9\%$ for lormetazepam (Table 1). In view of the results, it can be stated that this is a precise and accurate method, since the relative standard deviations were below 10% and the recoveries were satisfactory with values always higher than 87%. Cabarcos *et al.*²⁸ reported higher coefficients of variation (1.6–16.8%) and lower yields (68–97%) for the same benzodiazepines in vitreous humor using SPE, a procedure more tedious than the one proposed in this paper.

Analyses of real cases

The optimized methodology was applied to 16 vitreous humor samples, obtained from benzodiazepine users, and the results (Table 2) indicate that the most consumed benzodiazepines were alprazolam (mean $0.44 \mu\text{g mL}^{-1}$), lormetazepam (mean $1.04 \mu\text{g mL}^{-1}$) and diazepam (mean $0.21 \mu\text{g mL}^{-1}$). A chromatogram corresponding to a real case of lormetazepam poisoning is shown in Fig. 2b. Screening analysis from urine of the same individuals was also carried out by immunoassay methods and GC-MS and the presence of these drugs was confirmed.³⁷

Teixeira *et al.*²⁵ reported a pharmacokinetic study of diazepam in rabbits, obtaining mean levels ($n = 4$) from 0.024 to $0.014 \mu\text{g mL}^{-1}$ at 0.5 and 6 h post-administration, respectively. Scott and Oliver²⁶ applied supercritical fluid extraction and HPLC-UV to analyze 12 human vitreous humor samples, showing diazepam concentrations between 0.01 and $2.48 \mu\text{g mL}^{-1}$. Cabarcos *et al.*²⁸ analyzed 50 vitreous humor samples from deaths related to benzodiazepines, heroin and/or cocaine, and found concentrations ranging from $0.03 \mu\text{g mL}^{-1}$ for bromazepam to $1.08 \mu\text{g mL}^{-1}$ for tetrazepam. Jenkins *et al.*³⁸ published a SPE/HPLC-UV method to study a fatality due to alprazolam intoxication, with levels of $0.58 \mu\text{g mL}^{-1}$ in vitreous humor and $2.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ in blood. Pelander *et al.*³⁹ applied SPE and Liquid Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry (LC-TOFMS) to 50 vitreous humor samples from individuals whose deaths could be attributed to drugs, and detected three benzodiazepines and two metabolites in 16 cases (32%).

The dose administered and the time elapsed from ingestion to death and from death to sample collection are frequently unknown, complicating the interpretation of the results. Furthermore, there are few published reports in which concentrations of these substances in vitreous humor were determined. So far it is only possible to correlate the presence of benzodiazepines in vitreous humor with a consumption of these drugs, but this information could be important for the investigation of death.

Table 1 Validation parameters of BZDs in vitreous humor (range 0.05–5 µg mL⁻¹)

Analyte	Linearity	r	LOQ ± SD ^a (%) (ng mL ⁻¹)	Intraday precision RSD ^b (%) (n = 5)			Interday precision RSD ^b (%) (n = 5)			Accuracy (%recovery ± RSD ^b) (n = 5)		
				Low ^c	Med ^d	High ^e	Low ^c	Med ^d	High ^e	Low ^c	Med ^d	High ^e
Bromazepam	$Y = 1.82 \times 10^5 X + 2.89 \times 10^3$	0.999	32 ± 2	2.6	2.2	1.7	7.8	5.3	6.6	100.1 ± 1.7	95.5 ± 3.5	98.8 ± 6.6
Alprazolam	$Y = 1.74 \times 10^5 X + 6.58 \times 10^3$	0.999	32 ± 2	6.2	3.9	3.4	7.9	4.9	4.0	91.6 ± 4.0	90.9 ± 6.1	88.5 ± 7.3
Lorazepam	$Y = 1.52 \times 10^5 X + 1.43 \times 10^4$	0.999	34 ± 3	4.8	3.0	2.9	7.0	6.9	3.6	95.4 ± 4.8	94.8 ± 4.0	96.0 ± 9.9
Lormetazepam	$Y = 1.27 \times 10^5 X - 3.50 \times 10^3$	0.999	35 ± 2	6.1	4.9	1.1	6.6	5.2	4.9	94.5 ± 0.2	96.9 ± 3.3	101.2 ± 4.9
Diazepam	$Y = 1.98 \times 10^5 X + 2.95 \times 10^4$	0.999	30 ± 5	2.9	3.3	2.8	6.4	6.6	6.0	87.6 ± 7.1	89.5 ± 6.0	93.7 ± 2.9
Tetrazepam	$Y = 1.14 \times 10^5 X + 5.10 \times 10^4$	0.998	35 ± 5	3.7	3.4	2.7	7.2	7.3	7.8	100.3 ± 2.7	97.2 ± 4.8	99.1 ± 5.3

^a Standard deviation. ^b Relative standard deviation. ^c Low level, 0.1 µg mL⁻¹. ^d Medium level, 1 µg mL⁻¹. ^e High level, 5 µg mL⁻¹.

Table 2 Concentration of BZDs in 16 real vitreous humor samples

BZD	Frequency	Concentration range (µg mL ⁻¹)
Bromazepam	1/16	0.50
Alprazolam	5/16	0.08–1.17
Lorazepam	1/16	0.14
Lormetazepam	5/16	0.11–3.45
Diazepam	5/16	0.06–0.41
Tetrazepam	2/16	0.10–0.19

Conclusion

This work describes for the first time how MAE-HPLC/PDA can be used to extract and determine benzodiazepines in vitreous humor, a biological material of easy access that is not frequently contaminated, thus being very useful when blood is unavailable. The technique is rapid since twelve extractions can be made simultaneously and it does not require a clean-up step after MAE. Analysis of vitreous humor samples confirms the suitability of MAE-HPLC/PDA for routine determination of benzodiazepines in postmortem toxicological analyses, due to its adequate selectivity and sensitivity.

Acknowledgements

This work was supported by the Xunta de Galicia (Projects: 10PXIB208089PR and 10TAL209005PR).

References

- O. H. Drummer, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **388**, 1495.
- R. Cela, E. Martinez and A. M. Carro, *Técnicas de separación en química analítica*, Editorial Sintesis, Madrid, 2002.
- C. S. Eskilsson and E. Björklund, *J. Chromatogr., A*, 2000, **902**, 227.
- P. Fernández, M. Lago, R. A. Lorenzo, A. M. Carro, A. M. Bermejo and M. J. Taberner, *J. Appl. Toxicol.*, 2007, **27**, 373.
- P. Fernández, M. Lago, R. A. Lorenzo, A. M. Carro, A. M. Bermejo and M. J. Taberner, *J. Anal. Toxicol.*, 2007, **31**, 388.
- P. Fernández, M. Lago, R. A. Lorenzo, A. M. Carro, A. M. Bermejo and M. J. Taberner, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2009, **877**, 1743.
- P. Fernández, S. Seoane, C. Vázquez, A. M. Bermejo, A. M. Carro and R. A. Lorenzo, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **401**, 2177.
- P. Fernández, A. M. Fernández, A. M. Bermejo, R. A. Lorenzo and A. M. Carro, *J. Sep. Sci.*, 2013, **36**, 1446.
- P. Fernández, C. Vázquez, R. A. Lorenzo, A. M. Carro, I. Álvarez and P. Cabarcos, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **397**, 677.
- G. A. Lewis, D. Mathieu and R. Phan-Tan-Luu, *Pharmaceutical experimental design*, Marcel Dekker, New York, 1999.
- F. Pragst, M. Herzler and B.-T. Erxleben, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2004, **42**, 1325.

- 12 A. Bugey and C. Staub, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, **35**, 555.
- 13 F. Dussy, C. Hamberg and T. Briellmann, *Int. J. Leg. Med.*, 2006, **120**, 323.
- 14 A. El Mahjoub and C. Staub, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, **23**, 447.
- 15 T. Laurito, G. Mendes, V. Santagada and G. Caliendo, *J. Mass Spectrom.*, 2004, **39**, 168.
- 16 L. Mercolini, R. Mandrioli and C. Iannello, *Talanta*, 2009, **80**, 279.
- 17 M. R. Rouini, Y. H. Ardakani, K. A. Moghaddam and F. Solatani, *Talanta*, 2008, **75**, 671.
- 18 V. Samanidou, A. Pechlivanidou and I. Papadoyannis, *J. Sep. Sci.*, 2007, **30**, 679.
- 19 S. M. El-Gizawy, *Anal. Lett.*, 2000, **33**, 629.
- 20 M. Laloup, M. Ramirez, M. Wood and V. Maes, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **388**, 1545.
- 21 K. S. Scott and Y. Nakahara, *Forensic Sci. Int.*, 2003, **133**, 47.
- 22 K. Y. Rust, M. R. Baumgartner, N. Meggiolaro and T. Kraemer, *Forensic Sci. Int.*, 2012, **215**, 64.
- 23 N. Fucci, N. De Giovanni, F. De Giorgio, R. Liddi and M. Chiarotti, *Forensic Sci. Int.*, 2006, **156**, 102.
- 24 A. Thierauf, F. Musshoff and B. Madea, *Forensic Sci. Int.*, 2009, **192**, 78.
- 25 H. M. Teixeira, F. Reis, P. Proença, P. Ramos, O. Quintela, M. López-Rivadulla, E. Marqués and D. N. Vieira, *Hum. Exp. Toxicol.*, 2004, **23**, 571.
- 26 K. S. Scott and J. S. Oliver, *Forensic Sci. Int.*, 2001, **46**, 694.
- 27 N. Cartiser, F. Bévalot, C. Le Meur, Y. Gaillard, D. Malicier, N. Hubert and J. Guitton, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2011, **879**, 2909.
- 28 P. Cabarcos, M. J. Tabernerero, I. Álvarez, P. López, P. Fernández and A. M. Bermejo, *J. Anal. Toxicol.*, 2010, **34**, 539.
- 29 J. R. Williams, *Bull. W. H. O.*, 2008, **86**, 650.
- 30 T. P. Ryan, *Modern Experimental Design*, Wiley, New Jersey, 2007.
- 31 R. H. Myers, D. C. Montgomery and C. N. Anderson-Cook, *Response surface methodology*, Wiley, Totowa, 2009.
- 32 D. Mathieu, J. Nony and R. Phan-Tan-Luu, *NemrodW®*, versión 2000, LPRAI, Marseille, 2000.
- 33 Food and Drug Administration, US Department of Health and Human Services, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2001. <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252f1.pdf>.
- 34 International Conference of Harmonization, Validation of analytical procedures: Methodology ICH Q2B, 2005. <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>.
- 35 V. P. Shah, K. K. Midha, J. W. A. Findlay, H. M. Hill, J. D. Hulse, I. J. McGilveray, G. McKay and K. J. Miller, *Pharm. Res.*, 2000, **17**, 1551–1557.
- 36 F. T. Peters and H. H. Maurer, *Accredit. Qual. Assur.*, 2002, **7**, 441.
- 37 J. A. Baz, M. J. Tabernerero, A. M. Bermejo, I. Álvarez and P. Cabarcos, *Rev. Toxicol.*, 2011, **28**, 56.
- 38 A. J. Jenkins, B. Levine, J. L. Lock and J. E. Smialek, *J. Anal. Toxicol.*, 1997, **21**, 218.
- 39 A. Pelander, J. Ristimaa and I. Ojamperä, *J. Anal. Toxicol.*, 2010, **34**, 312.



El objetivo de esta Tesis Doctoral es el desarrollo y validación de metodologías analíticas eficaces, simples y de bajo coste para la determinación de sustancias psicoactivas en diferentes muestras biológicas utilizadas habitualmente en laboratorios de análisis toxicológico. Estas sustancias pertenecen a dos grandes grupos: *drogas de abuso* (morfina, 6-acetilmorfina, codeína, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metadona y/o EDDP) y *benzodiazepinas* (alprazolam, bromacepam, loracepam, lormetacepam, diacepam y tetracepam). La necesidad de disponer de métodos analíticos fiables para el control de estas drogas ha propiciado la investigación y puesta a punto de procedimientos de preparación de muestra, basados en la extracción asistida por microondas (MAE), y técnicas de determinación empleando la cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos (HPLC-PDA). Desde el punto de vista de la química verde, la MAE ofrece ventajas tales como un menor consumo de disolventes, una breve manipulación y una reducción de la cantidad de muestra y del tiempo de extracción. La aplicación de estos métodos se ha realizado con éxito en numerosos casos de intoxicación, analizando diversos tipos de muestras biológicas: plasma, orina, pelo, saliva y humor vítreo. Cada una de ellas presenta sus propias características farmacocinéticas y de accesibilidad, aportando información sobre la detección y cuantificación de estas sustancias en los controles toxicológicos clínicos y forenses.

