

*Reconocimiento a la trayectoria de la Prof.<sup>a</sup> Dra. Lucía C. Kordich*

# Técnicas para determinación cuali/cuantitativa de drogas de abuso en fluidos biológicos\*

*Techniques for qualitative and quantitative determination of drugs of abuse in biologic fluids*

► Alicia Beatriz Pomilio<sup>1\*</sup>, Arturo Alberto Vitale<sup>2\*\*</sup>

---

1. Doctora de la Universidad de Buenos Aires  
2. Doctor en Ciencias Químicas

\* Investigadora Superior del CONICET; Directora de PROPLAME (UBA y CONICET).

\*\* Profesor Asociado, FCEN, UBA; Investigador del CONICET; Vicedirector de PROPLAME (UBA y CONICET).

Este trabajo es parte de la presentación realizada en el Congreso de CUBRA (Confederación Unificada Bioquímica de la República Argentina) VIII, VIII Congreso Nacional Bioquímico de la República Argentina, San Juan, Argentina, 10 al 13 de agosto de 2005.

### **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

---

## **Resumen**

Se han desarrollado varios métodos para determinar drogas de abuso en orina, plasma/suero, bilis, pelo y otros en muestras clínicas y forenses. En este trabajo se discute la importancia de la aplicación de la técnica de cromatografía gas-líquido y espectrometría de masa en sus diferentes tipos, con énfasis en la preparación de la muestra. Anfetaminas, cannabinoides, cocaína y benzoilecgonina, morfina y metabolitos, fenciclidina, benzodiazepinas, antidepresivos tricíclicos, barbitúricos, opiatos, anestésicos locales y metadona se han analizado y cuantificado adecuadamente mediante esta metodología.

**Palabras clave:** análisis por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa \* preparación de la muestra \* drogas de abuso \* fluidos biológicos

## **Summary**

*A variety of methods have been developed for determination of drugs of abuse in urine, plasma/serum, bilis, hair and others in clinical and forensic samples. Relevance of the application of the technique of gas-liquid chromatography and different types of mass spectrometry are discussed in this paper, being sample preparation emphasized. Amphetamines, cannabinoids, cocaine and benzoylecgonine, morphine and metabolites, phenciclidine, benzodiazepines, tricyclic antidepressants, barbiturates, opiates, local anesthetics and methadone were properly analysed and quantified by means of this methodology.*

**Key words:** gas liquid chromatography-mass spectrometry analysis \* sample preparation \* drugs of abuse \* biologic fluids

## Introducción

El consumo de drogas se ha intensificado en varios países en los últimos años, aumentando también su accesibilidad, sus implicancias en el comportamiento social y la importancia de su determinación clínica y forense (1) (2). Por esta razón, resulta de interés tratar el tema de los métodos rápidos de análisis de estos compuestos en fluidos biológicos, en combinación con procedimientos simples de preparación de muestras y de interpretación de datos.

Quizás la mayor experiencia en el tema la tiene EE.UU., probablemente porque encabeza el listado de grandes consumidores. Organismos como la DEA (*US Drug Enforcement Administration*) de EE.UU. establecen las formas de análisis y muestran los casos que se van presentando de consumo de mezclas de drogas y las innovaciones de los consumidores para que los análisis den resultados negativos.

Generalmente se utilizan inmunoensayos para realizar los primeros análisis en hospitales, centros de rehabilitación y/o laboratorios de "respuesta rápida", pero estos ensayos sólo permiten detectar un grupo limitado de sustancias a bajas concentraciones (3).

Es por ello, que desde hace más de una década varios grupos de investigación, que incluyen los laboratorios de los autores (4-8), algunos de ellos en conjunto con empresas de elementos de cromatografía, han intentado desarrollar y/o mejorar los métodos cromatográficos de análisis simultáneo de un rango amplio de drogas (9-14).

Una variación interesante es la que ofrece la cromatografía líquida (CL) en combinación con la espectrometría de masa (EM) de ionización a presión atmosférica (IPA) (CL/IPA-EM) (en inglés: *atmospheric pressure ionization-mass spectrometry*: API-MS) (15). Los métodos CL-EM, entre ellos EM con ionización en electrospray (*electrospray ionization*: ESI) se usaron para análisis general (*screening*), confirmación y cuantificación de 16 drogas comúnmente prescritas en muestras de sangre total de conductores de autos bajo sospecha de haber consumido alguna de esas drogas. Estos métodos sirven para: benzodiazepinas, zopiclona, zolpidem, metadona, *dextro*-propoxifeno, carisprodol, meprobamato, carbamazepina y fenobarbital. La preparación de la muestra se hace por extracción líquido-líquido y la separación en una columna C18. Para el análisis general, se usó el ión molecular para detectar todas estas drogas, mientras que para identificarlas se usaron el ión molecular y los fragmentos. Los límites de cuantificación encontrados fueron significativamente más bajos que aquellos obtenidos mediante métodos convencionales, por ejemplo, el límite de cuantificación para el flunitrazepam es de 0,003  $\mu\text{M}$ . Los métodos HPLC-EM se usaron para analizar varios cientos de

muestras de sangre entera de conductores bajo sospecha de consumo de alguna droga, encontrándose que requieren menor preparación de la muestra, menor tiempo de análisis total y también límites de cuantificación significativamente menores.

Sin embargo, a diferencia de HPLC-EM, la cromatografía gas-líquido capilar (CGC, CGL o directamente CG) sigue siendo un método accesible, sencillo, menos costoso y de alta reproducibilidad (16) para ser usado en la búsqueda de drogas de abuso en fluidos corporales, en laboratorios clínicos y forenses sin demasiada experiencia en el tema. Se ha mejorado notablemente el análisis de muestras múltiples mediante CG-EM, desde que se realizara el control antidoping de fútbol en el año 1978 (17) en el Departamento de Química Orgánica, FCEN, UBA, hasta la actualidad, ya que ahora resulta ser una técnica sencilla debido al equipamiento liviano, accesible en precio, redituable, compacto, con bancos de datos o bibliotecas extensas y especializadas.

Generalmente se usa el cromatógrafo gas-líquido combinado con un detector selectivo de masas, es decir un equipo CG-EM de mesada o de laboratorio. Estos equipos usualmente cuentan con un procesador automático de datos y un buen banco de datos para poder analizar el mayor número posible de muestras en un laboratorio bioquímico y/o forense.

La representación gráfica de los datos de CG-EM provee una manera fácil de análisis para el personal no-experimentado de laboratorios forenses, bioquímicos y/o médicos, usándose esta técnica para la confirmación de las muestras positivas.

Estos equipos permiten también realizar la interpretación de datos en forma manual e incluir en el banco de datos las nuevas interpretaciones realizadas, lo cual resulta útil cuando se deben elucidar drogas específicas y sus metabolitos, en la matriz compleja de fluidos biológicos.

En base a las características del control electrónico neumático (en inglés: *electronic pneumatic control*, EPC) se pueden construir bibliotecas fijas a un dado tiempo de retención (*retention-time locked libraries*: RTL), uniendo los tiempos de retención fijos (o "loqueados") con los datos del espectro de masa obtenido en el modo de *scaneo*. Ningún analito de interés puede escapar a la detección y elucidación. Además, un método LTR-EM se ha aplicado recientemente para analizar pesticidas analizables por CGL en diferentes matrices (18), incluyendo un método para interpretar los datos de CG-EM. En base a la representación gráfica tridimensional de los tiempos de retención fijados y los datos de EM, se logra obtener un método de aplicación general, que se ilustró recientemente (19) (20) para el análisis de multicomponentes de drogas de abuso en fluidos biológicos.

## Preparación de las muestras

La CG capilar se usa comúnmente en análisis de rutina en los laboratorios. Independientemente de la resolución de los cromatógrafos modernos, la preparación de la muestra es aún un paso vital del proceso analítico ya que asegura que las muestras sean adecuadas para la determinación cromatográfica. Las técnicas actualmente usadas dependen del estado de agregación de la muestra a ser analizada y de la naturaleza de los analitos (ejemplo, volatilidad y estabilidad térmica). Entonces, en la aplicación de CG-EM a drogas de abuso y otras drogas en fluidos corporales, es de fundamental importancia la preparación y/o la concentración de la muestra, y más aún el método elegido para hacerlo, que tiene que ser preciso y reproducible.

Originalmente, el método más común de extracción de la droga de la muestra era la extracción líquido-líquido. Sin embargo, en años recientes, particularmente como el ensayo de drogas se hizo más común en lugares de trabajo y en áreas atléticas, se comenzó a usar la extracción en fase sólida (*solid-phase extraction*: SPE). En 1991 se examinaron varios laboratorios de ensayos de drogas certificados por el Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. y se encontró que hasta un 50% de todas las extracciones hechas se basaban en la aplicación de la extracción en fase sólida. La tecnología de extracción en fase sólida fue comercializada por primera vez en los '70 por Waters Associates (21), siendo inicialmente manuales (22-24). A fines de los '70, las columnas SPE preparadas comercialmente eran comercializadas por Analytichem International, actualmente conocida como Varian Sample Preparation Products (21). Poco después, se ponían en el mercado resinas de fase múltiple que contenían muchas clases de sorbentes que eran copolimerizados sobre un soporte sólido de sílica, por lo que podían ser usadas para la separación de muchas clases de compuestos que presentaban propiedades físicas y químicas marcadamente diferentes unas de otras. Desde esa época, SPE ha sido muy usada como técnica de extracción en toxicología forense y en ensayos de drogas en orina, suero y otros fluidos. El tipo de copolímero específicamente diseñado para el mercado de ensayos de drogas en orina es un copolímero de intercambio catiónico/fase-reversa. Esta resina usa una combinación de intercambio iónico y propiedades hidrofóbicas que permite obtener extractos muy limpios con alta eficiencia de extracción (21). Se ha demostrado que los copolímeros usados en SPE resultaron útiles para extraer varias drogas de abuso de naturaleza ácida, básica y neutra (22) (25).

De los variados copolímeros usados para realizar extracciones en fase sólida, el copolímero de divinilbenceno-*N*-vinilpirrolidona (Oasis) (Fig. 1) es el que ha resultado más adecuado y versátil para la variedad de

muestras y sustancias a analizar en un laboratorio químico/bioquímico, y en particular, clínico/forense. Estos copolímeros se expenden neutros (son los que se ejemplifican en este trabajo), pero también ácidos y básicos, según la carga del sustituyente de los anillos aromáticos del copolímero.

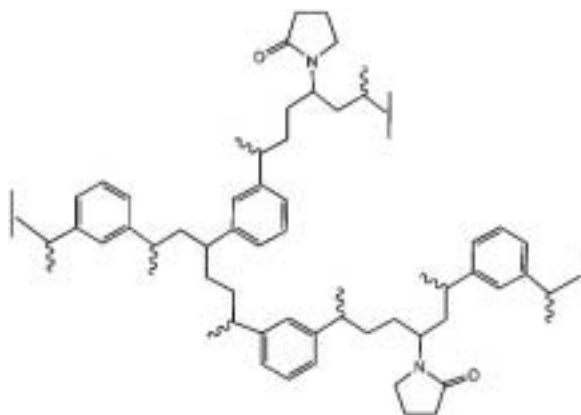


Figura 1. Estructura química del copolímero de divinilbenceno y *N*-vinilpirrolidona. Características de esta resina, sorbente de extracción: diámetro promedio de poro: 82 Å; área de superficie específica: 831 m<sup>2</sup>/g; volumen de poro total: 1,4 cm<sup>3</sup>/g; diámetro medio de partícula: 31,4 μm; cantidad de partículas finas < 10 μm: 0,1%.

Las ventajas de SPE aumentaron con el advenimiento de instrumentos de SPE semiautomáticos y automáticos (21) (23) (26-29). En general, SPE consume doce veces menos tiempo y es cinco veces menos cara que la extracción líquido-líquido (30). La mayoría de los sistemas semiautomáticos facilitan la aspiración del fluido a través de las columnas mediante vacío. En la actualidad, casi todos los laboratorios que usan SPE utilizan alguna forma de semiautomatización, pero pocos brazos robóticos controlados por computadora a todos o algunos de los pasos totalmente automáticos. Los métodos automáticos ofrecen mayor recuperación y mejor precisión que los procedimientos manuales, en los que las velocidades de flujo, la siembra de la muestra y la elución son mucho más variables (29). Los sistemas automáticos tienen también la ventaja de disminuir la cantidad de trabajo repetitivo realizado por el personal del laboratorio. En resumen, SPE demostró ofrecer muchas ventajas por sobre la extracción líquido-líquido tradicional, incluyendo automatización, mayor selectividad, mejor reproducibilidad y obtención de extractos más limpios (21-37).

SPE tiene una mayor selectividad por las drogas debido a que el uso de diferentes *buffers*, sorbentes y solventes es casi irrestricto. Otra ventaja de SPE es el "efecto de concentración" ya que los sorbentes de sílica unida presentan un área superficial alta para interactuar con un analito deseado, una propiedad que provoca la concentración de pequeñas cantidades en el cartucho de extracción (30).

En las publicaciones previas sobre SPE, el método de detección fue generalmente CG-EM (28) (32) (33) o HPLC (35). CG-EM es un método muy sensible y específico, y sigue siendo el método analítico ideal para la confirmación de drogas.

Con respecto a los métodos convencionales de CG *headspace* (38), el análisis por SPME/CG ofrece mucha mayor sensibilidad. La microextracción en fase sólida (*solid phase microextraction*: SPME) (39-42) es más simple y más rápida que las extracciones líquido-líquido y extracciones en fase sólida convencionales, y produce extractos más limpios. En principio, esta técnica podría aplicarse para analizar otras drogas y venenos de peso molecular intermedio (43).

En años recientes se han desarrollado diferentes métodos para enriquecer en los analitos de interés, los fluidos biológicos a analizar. Uno de ellos consiste en la extracción sortiva con barra de agitación (*stir-bar sorptive extraction*: SBSE) (44), usado recientemente para el análisis de drogas (19) (20) (45) seguido de análisis por desorción térmica-CG capilar-EM (*thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry*: TD-CGC-MS). La alta sensibilidad que puede alcanzarse con esta técnica (SBSE-TD-CGC-MS) permite usar EM en el modo de scan. Los datos de CG-EM son representados en un gráfico de contorno con tiempos de retención loqueados en el eje  $x$  y los iones en el eje  $y$ . Los solutos de interés son identificados en posiciones específicas del gráfico y su color está relacionado con la abundancia de los picos. La información semi-cuantitativa puede ser obtenida inmediatamente de los gráficos de contorno mientras que la cuantificación precisa requiere procedimientos convencionales de calibración (19) (20).

Los mapas de contorno CG-EM también pueden ser interpretados semicuantitativamente debido a que los colores de las manchas se refieren a intervalos específicos de la altura del pico y dan una idea estimada de la concentración del soluto.

Sin embargo, deben discutirse algunos aspectos críticos respecto a la cuantificación. Primero, para calibrar las señales de MSD, deben determinarse los factores de respuesta de distintos compuestos (aún dentro de las mismas clases de analitos). Para los mismos compuestos, las respuestas pueden desplazarse entre los tonos de MSD. Segundo, SBSE se basa en la distribución de equilibrio del analito entre la fase de polidimetilsiloxano (PDMS) de extracción y la matriz de la muestra, y las respuestas de los analitos específicos están muy influenciadas por su coeficiente de distribución entre PDMS y la muestra ( $K_{\text{PDMS/muestra}}$ ). En el caso de los cannabinoides, por ejemplo, las recuperaciones fueron todas de alrededor de 100% y la cuantificación resultó relativamente fácil. Sin embargo, las benzodiazepinas dieron diferentes factores de respuesta relativa en el análisis de SBSE-TD-CGC-MS y las estimaciones cuantitativas deberían, por lo tanto, coincidir con

estos valores. Por ejemplo, el gráfico de contorno detallado ion-selectivo CG-EM de la muestra de orina de un consumidor de droga.

SBSE-TD-CGC-MS resultó muy adecuada en la cuantificación de 14 drogas farmacéuticas y 15 contaminantes como PCBs (46) y metabolitos PAH (47) en fluidos biológicos.

En la actualidad se conocen también los sistemas de flujo continuo (*continuous flow*: CF) para la preparación automática de muestras. Estos sistemas de baja presión se basan en la extracción en fase sólida para la preparación automática de muestras antes de inyectarlas en el cromatógrafo gaseoso (48).

Sin embargo, casi todas las determinaciones realizadas por CG requieren varios pasos de extracción, limpieza y preconcentración. Los inconvenientes de estas etapas se pueden superar mediante automatización (48). Entre las diferentes alternativas de extracción/limpieza/preconcentración, la extracción en fase sólida (SPE) es la preferida para el pretratamiento de muestras ambientales, de alimentos y biológicas. Esto se debe a que se dispone de columnas comerciales de extracción, descartables, con un amplio rango de tamaños y sorbentes. Las ventajas de SPE son: obtención de extractos muy purificados, altas recuperaciones de los analitos, concentración efectiva, capacidad de extracción de analitos de polaridades diversas, fácil automatización, ausencia de emulsión y menor consumo de solventes orgánicos.

En los años recientes, los sistemas de baja presión de flujo continuo emergieron como una alternativa para la preparación de muestras con las ventajas de automatización, simplificación y miniaturización del proceso analítico (48). Cárdenas S *et al.* (49) informaron el uso de varios sistemas CF basados en SPE para la preparación automática de muestras ambientales, alimentarias y biológicas, tanto en modo *off-line* como *on-line*.

Los objetivos analíticos principales de estos módulos de pretratamiento se relacionan con la implementación de operaciones preliminares requeridas al tratar con muestras reales. La muestra es aspirada o inyectada en un sistema CF, que incluye una o dos bombas peristálticas y varias corrientes de reactivos y solventes. Para la preparación de la muestra antes del análisis por CG, los posibles procedimientos CF-SPE tienen características comunes. La muestra, los reactivos y los eluyentes se introducen en un módulo continuo constituido por una unidad SPE consistente en una columna con sorbente, usualmente ubicada en el *loop* de una válvula de inyección. La operación del sistema CF-SPE comprende tres pasos: sorción (introducción de la muestra), elución y derivatización; los últimos dos pueden ocurrir simultáneamente (agregando el reactivo al eluyente) o secuencialmente (agregando el reactivo después de la desorción de los analitos de la columna). El extracto final es luego introducido en



el cromatógrafo gaseoso usando la configuración *on-line* o una *off-line*.

Una de las ventajas inherentes a los sistemas CF es la miniaturización que proveen, ya que se reduce marcadamente la cantidad de sólido usado para rellenar la columna con sorbente. Su ubicación en el sistema de flujo también permite una fácil regeneración mediante pasos secuenciales de lavado/acondicionamiento que aumentan el tiempo de vida de la columna (en unos 3 meses). Además, la elución puede realizarse con sólo unos pocos microlitros de solvente orgánico, tal que el volumen inyectado en el cromatógrafo gaseoso contiene cantidades detectables de los compuestos de interés. Este paso es crucial en muchos procesos analíticos ya que asegura que no ocurran pérdidas durante la concentración o que la composición química de la muestra no cambie (34).

Los problemas principales del CF-SPE acoplado con CG resultan de los diferentes estados de agregación del gas portador y de la fase móvil, y también de la diferencia de presión (48). La manera más simple de acoplar directamente CF-SPE con CG es usar una válvula de inyección de alta presión (49). El eluyente orgánico proveniente del sistema CF-SPE, que contiene los analitos es mandado a esa válvula de inyección de alta presión, llenando el *loop* de 1-5  $\mu\text{L}$ , el cual es de politetrafluoretileno (PTFE) o de acero inoxidable.

La válvula está conectada al cromatógrafo mediante una tubería de PTFE o acero inoxidable con una aguja de inyección que se inserta en el *septum* de la zona de inyección. El gas portador del CG se usa para transferir los analitos de la válvula citada al inyector del cromatógrafo gaseoso. Dependiendo de la velocidad de flujo del gas portador (columnas empacadas o capilares), la corriente gaseosa puede dividirse entre dos canales, uno de los cuales es llevado directamente al inyector (columnas empacadas) mientras que el otro pasa a través de la válvula de inyección de alta presión. Una alternativa a esta última es la interfase *on-column*, diseñada principalmente para inyección de grandes volúmenes (50-100  $\mu\text{L}$ ) de solvente orgánico.

La mayor parte del solvente introducido (ca. 90%) es rápidamente evaporado y purgado. Una vez que se ha completado la transferencia de analito, comienza el programa de temperatura del CG.

La configuración adoptada por CF-SPE de las muestras biológicas varía dependiendo de la compatibilidad de la droga con el sistema cromatográfico (es decir, su volatilidad). Esto involucra un paso de derivatización que puede realizarse simultáneamente o secuencialmente a la elución. Algunas aplicaciones de estos sistemas y sus características más relevantes se encuentran en la lista de la Tabla I (49).

Varias drogas de abuso fueron determinadas, sin derivatización, en orina y suero humanos después de ser retenidas en una columna RP-C18 y eluidas con cloroformo. Este sistema fue conectado *on-line* a un cromatógrafo gaseoso mediante una válvula de inyección, de 6 pasos, de alta presión. También se propuso un método confirmatorio para benzodiazepinas en muestras pre-ensayadas de orina hidrolizada. La configuración CF-SPE permite el acondicionamiento de las muestras para remover interferencias potenciales, así como para cambiar el medio acuoso por uno orgánico que sea compatible con el sistema cromatográfico. Se pueden preparar los derivados trimetilsililados de las drogas de abuso y los derivados metilados de las drogas anti-inflamatorias no-esteroidales (49) al mismo tiempo que las drogas se eluyen de la columna con sorbente, mediante el agregado de un reactivo adecuado al eluyente. En la última configuración, se debe insertar una minicolumna empacada con carbonato de potasio, en el sistema después de la columna con el sorbente, para completar la derivatización.

A veces, la derivatización no puede ser realizada simultáneamente con la elución ya que se requiere un calentamiento prolongado para asegurar la compatibilidad entre el eluyente y el reactivo. Esto ocurre durante la determinación de la cocaína y sus metabolitos en la orina humana, para lo cual se agrega el reactivo a un tubo de vidrio donde el eluyente del sistema continuo

Tabla I. Aplicaciones de los sistemas CF-SPE a la determinación de drogas en fluidos biológicos mediante CG-EM.

Droga	Muestra	CF-SPE (sorbente/eluyente)	Derivatización	Límite de detección
Benzodiazepinas	Orina humana hidrolizada	XAD-2/CHCl <sub>3</sub>	No	4-120 nM
Drogas de abuso y metabolitos	Orina y suero humanos	RP-C18/ CHCl <sub>3</sub>	No	0,5-10 ng/mL
DAINE	Orina y plasma de caballos de carrera	XAD-2/CH <sub>3</sub> CN	CH <sub>3</sub> I/K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1-50 ng/mL
Drogas de abuso	Orina humana y metabolitos	XAD-2/CHCl <sub>3</sub>	BSTFA	< 0,1-2 ng/mL
Cocaína y metabolitos	Orina humana	RP-C18/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (NH <sub>4</sub> OH)	BSA	1-200 ng/mL

DAINE = drogas anti-inflamatorias no-esteroidales (NSAIDs = *non-steroidal anti-inflammatory drugs*); BSTFA = *bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida*; BSA = *N,O-bis(trimetilsilil)acetamida*.

ha sido evaporado bajo corriente de nitrógeno y luego calentado a 70 °C durante 15 min (49).

Steinberg DM *et al.* (50) evaluaron en su laboratorio de hospital un sistema prototipo Toxi · Prep (TP) para el análisis de drogas terapéuticas y drogas de abuso en orina. TP es un procesador semiautomático que incorpora SPE con sembrado directo en una placa cromatográfica (*thin-layer chromatography*: TLC), minimizando así el tiempo del operador, disminuyendo el error técnico y mejorando la reproducibilidad. Así se pueden extraer y sembrar hasta siete muestras en paralelo. TP se usó para el análisis de los metabolitos de tetrahidrocanabinol (THC) en orina; se detectaron 33 drogas distintas y metabolitos en 55 orinas. Veinte muestras fueron analizadas buscando metabolitos de THC. Para las evaluaciones se usó TP con un sistema de vacío asociado, columnas de extracción Spec · Prep 6 mL C18AR/MP3; placas cromatográficas Toxi · Grams Prep A; Toxi · Discs A-1, A-2, A-3, A-4.

La identificación de drogas básicas mediante TP se correlacionó bien con Toxi · Lab-A (TL-A). El número total de drogas y metabolitos identificados con TL-A (método de referencia) fue de 205, mientras que el total de drogas y metabolitos identificados por ambos TP y TL-A fue de 141. Es decir, el 68,8% (141 de 205) de la presencia de drogas fue detectado por ambos métodos. Se conocen pocos trabajos sobre detección por TLC después de SPE (23) (24) (33), pero difieren del de TP en que ninguno de ellos siembra automáticamente los extractos directamente en el cromatograma.

Los ensayos de drogas en orina se usaron durante décadas y actualmente se usan para el control antes de dar un empleo y también entre empleados de varias empresas o entre participantes en actividades deportivas profesionales y *amateurs*. Las concentraciones de las drogas en los fluidos biológicos son afectadas por la dosis, la ruta de administración, el patrón de uso de drogas y la farmacocinética de la droga. El análisis de orina se complica además por otros factores, tales como el flujo de la orina y el pH. La capacidad para predecir el tiempo de uso o el grado de deterioro está limitada por variaciones en las concentraciones de la droga en la orina y la falta de conocimiento de la dosis o procedimiento de administración.

Los inmunoensayos han brindado una forma no cara y sensible para analizar las drogas; los resultados se informan como positivos o negativos. Si los resultados preliminares son positivos, se realiza un ensayo confirmatorio para su verificación, que generalmente es CG-EM. Se usan los inmunoensayos SYNCHRON® (Beckman Coulter, Inc.) (51) para probar la presencia de drogas de abuso para la determinación cualitativa o análisis general de anfetaminas, barbituratos, benzodiazepinas, cannabinoides, metabolitos de la cocaína, metacualona, metadona, opiato, fenciclidina y propoxifeno en orina.

## Materiales y Métodos

### SOLVENTES Y REACTIVOS

Se indican en cada caso, incluyendo la marca comercial utilizada. Se debe controlar el grado de pureza de los reactivos y solventes a utilizar (52).

### EQUIPAMIENTO

Se utilizaron dos equipos de CG-EM. Un Hewlett-Packard HP-5890 Serie I/EM 5971. Se usó helio como gas portador y la presión de la cabeza (*head pressure*) fue calculada usando el *software* RTL (45); se usó palmitato de etilo como estándar para fijación de  $t_R$  (tiempo de retención de 17,68 min). El detector espectrométrico de masa Agilent 5973 fue operado en el modo de scan ( $m/z$  50–500).

Se usó también un Shimadzu 17 A/GP5000.

### ANÁLISIS DE ANFETAMINA/METANFETAMINA EN ORINA MEDIANTE CG/EM USANDO EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

- 1) Preparación de la muestra: Se colocaron 3,2 mL de orina en un tubo, se agregaron 32  $\mu$ L de HCl 5N y estándar interno (EI; en inglés: IS), (EI sugeridos: *d*6-anfetamina y *d*9-metanfetamina).
- 2) Siembra: Se cargaron 3,0 mL de muestra en la columna a una velocidad de 2 mL/min.
- 3) Lavado de la columna: Se lavó la columna de extracción con 2,0 mL de NaOH 0,1 N a una velocidad de 2 mL/min, 2,0 mL de agua desionizada a una velocidad de 8 mL/min, se purgó con cánula con 6 mL de agua a una velocidad de 30 mL/min y con 4,0 mL de *n*-hexano a una velocidad de 8 mL/min.
- 4) Elución: Se eluyó con 3 mL de 2-propanol/cloruro de metileno (75:25), a una velocidad de 2 mL/min.
- 5) Acidificación: Se agregaron 100  $\mu$ L de HCl 1% en metanol a cada tubo antes de evaporar.
- 6) Evaporación: Se evaporó el eluyente bajo nitrógeno a 50 °C.
- 7) Derivatización: Se agregaron 50  $\mu$ L de acetato de etilo y 40  $\mu$ L de PFPA (anhídrido pentafluoropropiónico), se tapó y se mezcló. Se hizo reaccionar a 75 °C durante 15 min y luego se evaporó a sequedad a 50 °C. Se reconstituyó en 50  $\mu$ L de acetato de etilo.
- 8) Cuantificación: Iones monitores: Anfetamina, 190 (ión cuant.), 118, 92. *d*6-Anfetamina, 194 (ión cuant.), 123, 93. Metanfetamina, 204 (ión cuant.), 160, 118. *d*9-Metanfetamina, 211 (ión cuant.), 163, 123.

## ANÁLISIS DE CARBOXI-THC EN ORINA MEDIANTE CG/EM USANDO EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

- 1) Hidrólisis básica: Se pusieron 3,0 mL de orina en un tubo, se agregaron 32  $\mu$ L de HCl 5N y estándar interno (EI sugerido:  $\delta$ -Carboxi-THC). Se agregaron 200  $\mu$ L de KOH 11,8 M, se tapó, se mezcló y se calentó a 60 °C durante 15 min. Se dejó enfriar la muestra.
- 2) Siembra: Se cargaron 3,0 mL de muestra en la columna a una velocidad de 2 mL/min.
- 3) Lavado de la columna: Se lavó la columna de extracción con 2,0 mL de NaOH 0,1 N a una velocidad de 2 mL/min, 2,0 mL de agua desionizada a una velocidad de 8 mL/min, se purgó con cánula con 6 mL de agua a una velocidad de 30 mL/min, y con 4,0 mL de *n*-hexano a una velocidad de 8 mL/min.
- 4) Elución: Se eluyó con 3 mL de 2-propanol/cloruro de metileno (75:25), a una velocidad de 2 mL/min.
- 5) Evaporación: Se evaporó el eluyente bajo nitrógeno a 50 °C.
- 6) Derivatización: Se agregaron 150  $\mu$ L de TBAH/DMSO (2:98), se usó vortex y se dejó estacionar durante 2 min. Se agregaron 50  $\mu$ L de iodometano, se usó vortex y se dejó estacionar durante 5 min. Se agregaron 350  $\mu$ L de HCl 0,1 N, se usó vortex. Se agregaron 2 mL de *iso*-octano, se usó vortex y se centrifugó. Se transfirió la capa del solvente a un tubo limpio. Se repitió el procedimiento y se combinaron los extractos, los cuales fueron evaporados bajo nitrógeno a 50 °C. Se reconstituyó en 30  $\mu$ L de *iso*-octano.
- 7) Cuantificación: Iones monitores: Carboxi-THC: 313 (ión cuant.), 357, 372.  $\delta$ -Carboxi-THC: 319 (ión cuant.), 363, 378.

## ANÁLISIS DE COCAÍNA Y BENZOÍLECGONINA EN ORINA MEDIANTE CG/EM USANDO EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

- 1) Preparación de la muestra: Se colocaron 3,2 mL de orina en un tubo, se agregaron 32  $\mu$ L de HCl 5N y estándar interno (EI; en inglés: IS), (EI sugerido:  $\delta$ -benzoilecgonina).
- 2) Siembra: Se cargaron 3,0 mL de muestra en la columna a una velocidad de 2 mL/min.
- 3) Lavado de la columna: Se lavó la columna de extracción con 2,0 mL de NaOH 0,1 N a una velocidad de 2 mL/min, 2,0 mL de agua desionizada a una velocidad de 8 mL/min, se purgó con cánula con 6 mL de agua a una velocidad de 30 mL/min (*Rapid Trace*), y con 4,0 mL de *n*-hexano a una velocidad de 8 mL/min.
- 4) Elución: Se eluyó con 3 mL de 2-propanol/cloruro de metileno (75:25), a una velocidad de 2 mL/min.
- 5) Evaporación: Se evaporó el eluyente bajo nitrógeno a 50 °C.
- 6) Derivatización: Se agregaron 200  $\mu$ L de anhídrido propiónico y 200  $\mu$ L de piridina, se tapó y se mezcló. Se hizo reaccionar a 75 °C durante 30 min y luego se evaporó a sequedad a 50 °C. Se reconstituyó en 50  $\mu$ L de acetato de etilo.
- 7) Cuantificación: Iones monitores: Codeína, 355 (ión cuant.), 282, 229.  $\delta$ -Codeína, 358 (ión cuant.), 285, 232. Morfina, 341 (ión cuant.), 324, 397.  $\delta$ -Morfina, 344 (ión cuant.), 400, 327.

## ANÁLISIS DE CODEÍNA Y MORFINA EN ORINA MEDIANTE CG/EM USANDO EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

- 1) Hidrólisis enzimática: Se colocaron 3,0 mL de orina en un tubo, y se agregó el estándar interno (EI sugerido:  $\delta$ -codeína y  $\delta$ -morfina). Se agregaron 500  $\mu$ L de *buffer* acetato de sodio y 100  $\mu$ L de *beta*-glucuronidasa, se tapó, se mezcló y se dejó incubar a 55 °C durante 1 hora.
- 2) Preparación de la muestra: Se dejó enfriar la muestra, se agregó 1 mL de agua desionizada a cada muestra, luego 100  $\mu$ L de NaOH 12 M y 300  $\mu$ L de *buffer* carbonato 1,5 M. Se mezcló la muestra y se centrifugó. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio.
- 3) Siembra: Se cargaron 3,0 mL de muestra en la columna a una velocidad de 2 mL/min.
- 4) Lavado de la columna: Se lavó la columna de extracción con 2,0 mL de *buffer* carbonato 0,15 M (pH 9,5) a una velocidad de 2 mL/min, 2,0 mL de agua desionizada a una velocidad de 8 mL/min, se purgó con cánula con 6 mL de agua a una velocidad de 30 mL/min (*Rapid Trace*), y con 4,0 mL de *n*-hexano a una velocidad de 8 mL/min.
- 5) Elución: Se eluyó con 3 mL de 2-propanol/cloruro de metileno (75:25), a una velocidad de 2 mL/min.
- 6) Evaporación: Se evaporó el eluyente bajo nitrógeno a 50 °C.
- 7) Derivatización: Se agregaron 200  $\mu$ L de anhídrido propiónico y 200  $\mu$ L de piridina, se tapó y se mezcló. Se hizo reaccionar a 75 °C durante 30 min y luego se evaporó a sequedad a 50 °C. Se reconstituyó en 50  $\mu$ L de acetato de etilo.
- 8) Cuantificación: Iones monitores: Codeína, 355 (ión cuant.), 282, 229.  $\delta$ -Codeína, 358 (ión cuant.), 285, 232. Morfina, 341 (ión cuant.), 324, 397.  $\delta$ -Morfina, 344 (ión cuant.), 400, 327.

*ANÁLISIS DE 6-MONOACETIL-MORFINA EN ORINA MEDIANTE CG/EM USANDO EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA*

- 1) Preparación de la muestra: Se colocaron 3,2 mL de orina en un tubo apropiado. Se agregaron 32  $\mu$ L de HCl 5N y estándar interno (EI sugerido: *d*6-6-monoacetil-morfina).
- 2) Siembra: Se cargaron 3,0 mL de muestra en la columna a una velocidad de 2 mL/min.
- 3) Lavado de la columna: Se lavó la columna de extracción con 2,0 mL de *buffer* carbonato 1,5 M (pH 9,3) a una velocidad de 2 mL/min, 2,0 mL de agua desionizada a una velocidad de 8 mL/min, se purgó con cánula con 6 mL de agua a una velocidad de 30 mL/min (*Rapid Trace*) y con 4,0 mL de *n*-hexano a una velocidad de 8 mL/min.
- 4) Elución: Se eluyó con 3 mL de 2-propanol/cloruro de metileno (75:25) a una velocidad de 2 mL/min.
- 5) Evaporación: Se evaporó el eluyente bajo nitrógeno a 50 °C.
- 6) Derivatización: Se agregaron 30  $\mu$ L de acetato de etilo, 15  $\mu$ L de MSTFA [*N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida] y se usó vortex. Se transfirió a viales de automuestreo.
- 7) Cuantificación: Iones monitores: 6-monoacetil-morfina: 399 (ión cuant.), 340, 287. *d*6-6-monoacetilmorfina: 405 (ión cuant.), 343, 290.

*ANÁLISIS DE FENCICLIDINA EN ORINA POR CG/EM USANDO EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA*

- 1) Preparación de la muestra: Se colocaron 3,2 mL de orina en un tubo apropiado. Se agregaron 32  $\mu$ L de HCl 5N y estándar interno (EI sugerido: *d*5-Fenciclidina).
- 2) Siembra: Se cargaron 3,0 mL de muestra en la columna a una velocidad de 2 mL/min.
- 3) Lavado de la columna: Se lavó la columna de extracción con 2,0 mL de NaOH 0,1 N a una velocidad de 2 mL/min, 2,0 mL de agua desionizada a una velocidad de 8 mL/min, se purgó con cánula con 6 mL de agua a una velocidad de 30 mL/min (*Rapid Trace*), y 4,0 mL de *n*-hexano a una velocidad de 8 mL/min.
- 4) Elución: Se eluyó con 3 mL de 2-propanol/cloruro de metileno (75:25), a una velocidad de 2 mL/min.
- 5) Evaporación: Se evaporó a sequedad bajo nitrógeno a 50 °C.
- 6) Reconstitución: Se agregaron 50  $\mu$ L de acetato de etilo y se usó vortex.
- 7) Cuantificación: Iones monitores: Fenciclidina: 200 (ión cuant.), 242, 186. *d*5-fenciclidina: 205 (ión cuant.), 247, 191.

Preparación de muestras en general

*ANÁLISIS DE DROGAS EN SANGRE HUMANA ENTERA POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA*

Se usó un cartucho de extracción de 1 mL/30 mg o de 3 mL/60 mg. Se acondicionó con: 1 mL metanol/1 mL de agua. Se cargó: 1 mL de sangre humana entera. Se lavó con: 1 mL de metanol al 5% en agua. Se eluyó con: 1 mL de metanol. Se evaporó y se reconstituyó: se llevó a 1 mL con metanol; se filtró con una membrana de 0,45  $\mu$ m.

*ANÁLISIS DE DROGAS EN SUERO PORCINO POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (ENTRE LOS EJEMPLOS, ANÁLISIS DE UN ANALGÉSICO/NARCÓTICO: OXICODONA)*

Se usó un cartucho de extracción de 1 mL/30 mg. Se acondicionó con: 1 mL metanol/1 mL de agua. Se cargó: 1 mL de suero porcino con 0,2  $\mu$ g de naloxona (EI). Se lavó con: 1 mL de metanol al 5% en agua. Se eluyó con: 1 mL de metanol. Se evaporó y se reconstituyó: a 40 °C bajo corriente de nitrógeno; 200  $\mu$ L de fase móvil.

*ANÁLISIS DE MORFINA Y SUS METABOLITOS: GLUCURÓNIDOS, EN SUERO PORCINO POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA*

Se usó un cartucho de extracción de 1 mL/30 mg. Se acondicionó con: 1 mL metanol. Se equilibró con: 1 mL de agua. Se cargó: 1 mL de suero porcino con EI. Se lavó con: 1 mL de agua. Se eluyó con: 0,5 mL de trietilamina 3% metanol. No se requirió evaporación: se inyectó la muestra directamente.

*ANÁLISIS DE SEDANTES, CLORDIAZEPÓXIDO Y METABOLITOS, EN SUERO PORCINO POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA*

Se usó un cartucho de extracción de 1 mL/30 mg. Se acondicionó con: 1 mL metanol/1 mL de agua. Se cargó: 1 mL de suero porcino con 1,5  $\mu$ g/mL de demoxepam (EI). Se lavó con: 1 mL de metanol al 5% en agua. Se eluyó con: 1 mL de metanol. Se evaporó y se reconstituyó: a 40 °C bajo corriente de nitrógeno; 200  $\mu$ L de fosfato de potasio 20 mM (pH 7)/metanol 8:2 (v/v).

*ANÁLISIS DE DROGAS EN PLASMA POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA*

Se usó un cartucho de extracción de 1 mL/30 mg. Se acondicionó con: 1 mL metanol/1 mL de agua. Se cargó: 1 mL de plasma con naloxona (EI). Se lavó con: 1) 1 mL de metanol al 5% que contenían NH<sub>4</sub>OH 2%. 2) 1 mL



de metanol al 20% que contenían  $\text{NH}_4\text{OH}$  2%. Se eluyó con: 0,5 mL de metanol al 25% que contenían  $\text{AcOH}$  2%. No se requirió evaporación ni reconstitución.

#### ANÁLISIS DE DROGAS, NALTREXONA, EN PLASMA PORCINO POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Se usó un cartucho de extracción de 1 mL/30 mg. Se acondicionó con: 1 mL metanol/1 mL de agua. Se cargó: 1 mL de plasma porcino con EI. Se lavó con: 1 mL de metanol 5%/ $\text{NH}_4\text{OH}$  2%. Se eluyó con: 0,5 mL de metanol 25%/ $\text{AcOH}$  1%. Se diluyó con: 0,5 mL de agua.

### Preparación de muestras para *headspace*

#### MUESTRA DE ORINA

Una muestra de orina (5 mL) fue transferida a un vial de *headspace* de 20 mL y se le agregó 1 mL de *buffer* de acetato de amonio (1 M, pH 6,5). Se agregó *beta*-glucuronidasa (10 mL) de *Escherichia coli* K12 (Roche Molecular Biochemical) y la mezcla fue termostatzada a 37 °C durante 90 min para la hidrólisis enzimática. Un *Twister* TM (Gerstel GmbH, Alemania) de 1 cm x 0,5 mm  $d_f$  (24  $\mu\text{L}$ ) PDMS fue agitado en la muestra durante 60 min a 1.000 rpm. Después del muestreo, la barra de agitación fue sacada del vial con *tweezers*, enjuagada con unos pocos mililitros de agua pura y puesta en papel *tissue* limpio para sacar las gotitas de agua residuales. El *Twister* fue puesto en un tubo vacío de vidrio de desorción térmica de 187 mm de longitud, 6 mm d.e. y 4 mm d.i. para la desorción térmica.

La acilación *in situ* de las muestras de orina se realizó así: después de la hidrólisis con *beta*-glucuronidasa, se agregaron 0,75 g de carbonato de potasio (Sigma-Aldrich) y 0,5 mL de anhídrido acético (Sigma-Aldrich).

#### MUESTRA DE SANGRE O DE BILIS

Una muestra de sangre o de fluido biliar (1 mL) se puso en un vial de *headspace* de 20 mL y se agregó 1 mL de *buffer* de acetato de amonio (1 M, pH 6,5). Se agregó *beta*-glucuronidasa (10 mL) de *Escherichia coli* K12 y la mezcla fue equilibrada a 37 °C durante 90 min. Se agregó metanol (1 mL) y se colocó la mezcla en un baño ultrasónico durante 15 min. La mezcla fue diluida con 10 mL de agua bidestilada y el muestreo SBSE fue realizado como con las muestras de orina.

#### MUESTRA DE CONTENIDO ESTOMACAL

El contenido estomacal (1 g) fue mezclado con 1 mL de metanol y 10 mL de agua y se efectuó SBSE como se describiera anteriormente.

## Resultados y Discusión

### 1. ANÁLISIS DE ANFETAMINAS EN ORINA MEDIANTE CG/EM USANDO EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

*Clasificación de las anfetaminas:* Estimulantes. Nombres comerciales u otros: Bifetamina; Desoxina; Dexedrina; Obetrol; Ice. Usos médicos: Desorden de déficit de atención; narcolepsia; control de peso. Dependencia física: posible. Dependencia psicológica: alta. Tolerancia: sí. Duración: 2-4 horas. Método de consumo usual: oral; inyectado; fumado. Posibles efectos: alerta incrementado; excitación; euforia; aumento del pulso y de la presión sanguínea; insomnio; pérdida de apetito. Efectos de sobredosis: agitación; aumento de la temperatura corporal; alucinaciones; convulsiones; posible muerte. Síndrome de abstinencia: apatía; largos períodos de sueño; irritabilidad; depresión; desorientación.

En los últimos 6 años las anfetaminas (Fig. 2) se han analizado mediante HPLC como derivados acetilados (53), mediante espectrometría de movilidad iónica con desorción térmica (54), mediante cromatografía de fluidos supercríticos y electroforesis capilar zonal (55). Recientemente se usó SPME combinada con derivatización para determinar anfetaminas mediante CL (56).

Se analizó 3,4-metilendioxi-*N*-metilamfetamina (MDMA) mediante espectroscopía de  $^{13}\text{C}$ -RMN en estado sólido (57) y espectroscopía de IR cercano (58). El perfil de impurezas en las anfetaminas ilícitas fue realizado mediante HPLC y EC, utilizando microextracción en fase sólida (59) y SPE (60). Las propiedades espectrales UV, IR, RMN y EM, así como los datos cromatográficos fueron registrados para 4-metiltoanfetamina (61). Se efectuó la síntesis de 2,3- y 3,4-metilendioxi-fenilalquilaminas y su diferenciación regioisomérica mediante análisis por EM usando CG-EM-EM (62).

Se determinaron las anfetaminas en sangre mediante CG-EM después de HS (*headspace*)-SPME y derivatización (63); también se analizaron en orina humana (64) (65). La cuantificación aquiral y quirral de metanfetamina y anfetamina en orina se hizo en una columna semimicro de HPLC con detección de fluorescencia (66). Las anfetaminas se determinaron en pelo por CG-EM (67) y también por extracción con fluidos supercríticos (68). La cuantificación de anfetamina, metanfetamina y sus metilendioxi derivados se realizó en orina mediante SPME con espectrometría de ionización de electrospray-movilidad iónica con forma de onda asimétrica de alto campo-EM (69). Se logró el óptimo perfil de metanfetamina mediante SPME (70), HS-SPME muy sensible de un paso para el análisis de anfetaminas en orina por CG-EM (71) (72) y con derivatización *on-column* (73). Se analizaron la metanfetamina y sus metabolitos en pelo (74). Recientemente, se analizaron anfetamina y metanfetamina en suero mediante SPME con CL-ionización de electrospray-EM *tandem* (75).

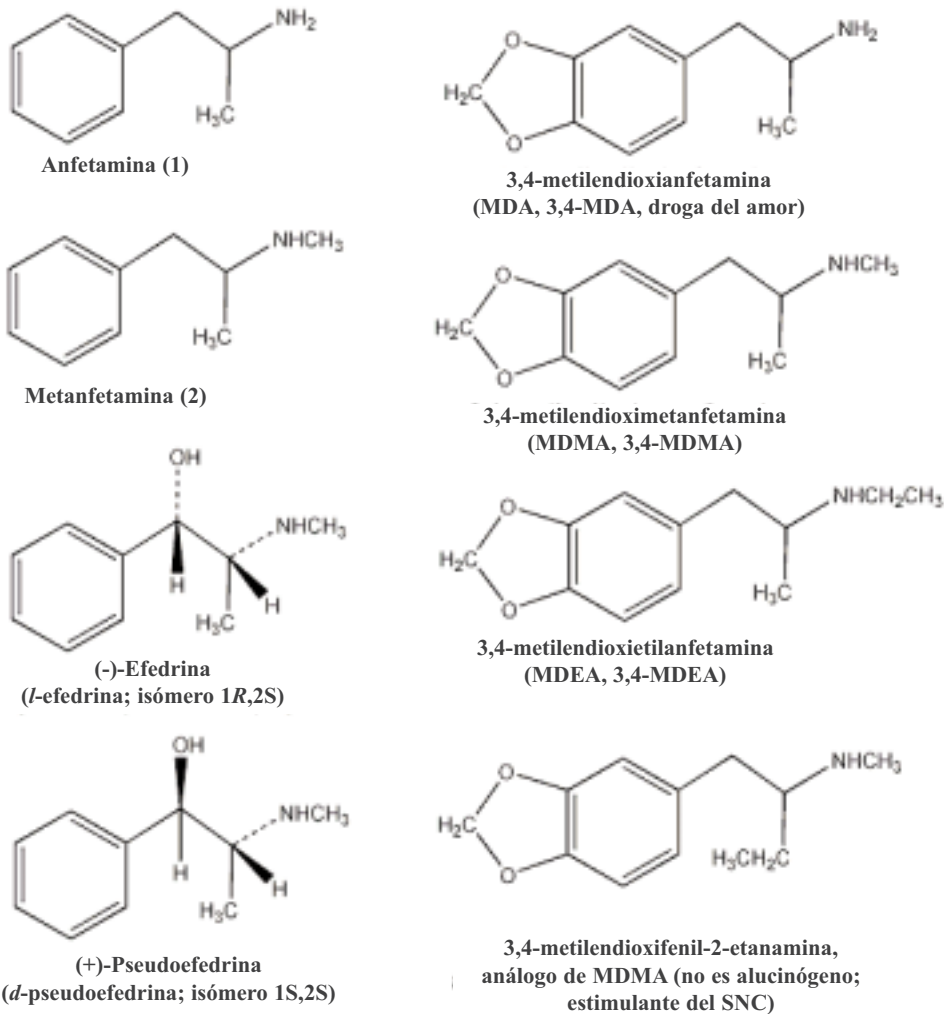


Figura 2. Estructuras químicas de las anfetaminas.

En la Figura 3 se muestra el cromatograma gas-líquido de anfetamina (1) y metanfetamina (2).

*Detección rápida y precisa de anfetaminas en orina mediante SPME/CG-EM.* Se desarrolló un método rápido, sencillo y preciso para analizar, en orina, metanfetamina y su principal metabolito, anfetamina, usando SPME de *headspace* calentado y CG capilar (76). Para ello, fue necesario sellar 1 mL de muestra de orina en un vial de 12 mL, a continuación se agregó el estándar interno (5 µg de metanfetamina pentadeuterada) y 0,7 g de carbonato de potasio, y la muestra fue calentada a 80 °C durante 20 min en un calentador de bloque.

Luego se expuso una fibra de SPME recubierta con un *film* de 100 µm de polidimetilsiloxano al *headspace* arriba de la muestra durante 5 min, luego se introdujo la fibra dentro del inyector del cromatógrafo. En un sistema equipado con CG con monitoreo de selección de iones de EM por ionización química (*mass spectrometry/chemical ionization selected ion monitoring*; CG-EM/CI-SIM), este análisis

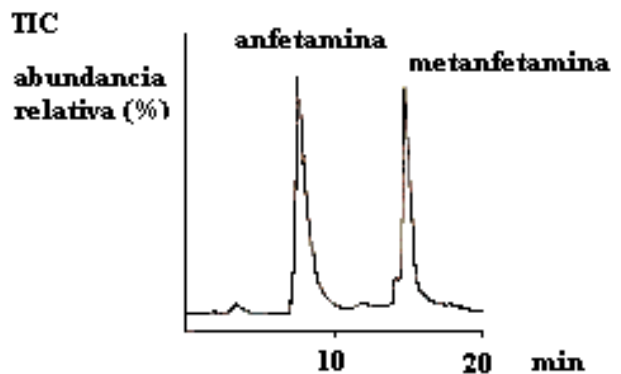


Figura 3. Cromatograma iónico total de anfetamina (1) y metanfetamina (2). Columna: DB-1 (J & W Scientific); 15 m x 0,25 mm x 0,25 micrometros. Temperatura de inyección: 220 °C. Temperatura del horno: Inicial: 60 °C por 1 min; 60 °C → 160 °C a 25 °C/min; 160 °C → 300 °C a 40 °C /min; Final: 300 °C. TIC: total ion chromatogram.

resultó 20 veces más sensible que una extracción convencional por *headspace*. Los coeficientes de correlación para metanfetamina y anfetamina, en base a *d5*-metanfetamina, fueron 0,9999 para concentraciones de 0,2-10 mg/L y 0,9970 para concentraciones de 5-100 mg/L. Los respectivos coeficientes de variación para metanfetamina y anfetamina a 5 mg/L en orina fueron 7,0% y 5,1%.

En la Figura 4 se presenta el CG de una muestra compleja de anfetaminas.

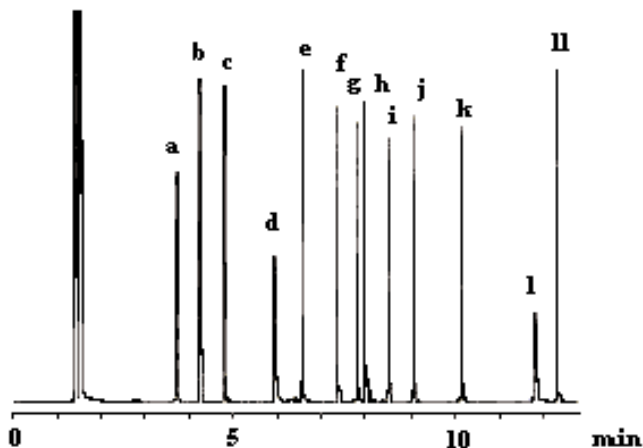


Figura 4. Cromatograma de 13 anfetaminas. Condiciones experimentales: Columna: Heliflex® AT-5ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Temperatura: 100 °C (se mantiene 0 min) hasta 250 °C a 10 °C/min; Gas Carrier: Helio a 1,0 mL/min (36 cm/s); Detector: FID a 325 °C. Identificación de los picos: a. Anfetamina, b. Metanfetamina, c. N-Etilanfetamina, d. Fenilpropranolamina, e. 4-Metoxianfetamina, f. 2,3-MDA, g. 3,4-MDA, h. 2,3-MDMA, i. 3,4-MDMA, j. 3,4-MDE, k. MDPa, l. 4-Bromo-2,5-dimetoxifenetilamina, II. Benzfetamina.

Se llegó a la conclusión que además de la rapidez, sencillez y precisión, el método de SPME de *headspace* podría, en algunas circunstancias, reducir el potencial de interferencia por drogas co-administradas. En un inmunoensayo para metanfetamina y anfetamina, clorpromazina y sus metabolitos se obtuvieron falsos positivos (77), pero estos compuestos no afectaron el análisis al usar SPME de *headspace*.

Se desarrolló un procedimiento similar para determinar anfetaminas en sangre (59) (78) (79); en lugar de carbonato de potasio, se usó 0,5 mL de hidróxido de sodio 1N para llevar los analitos al *headspace*. Recientemente, se realizó la derivatización simultánea y la extracción de drogas tipo anfetamina en orina con HS-SPME/CG-EM (80).

En la Figura 5 se muestra un cromatograma de anfetamina (1) y metanfetamina (2) en orina.

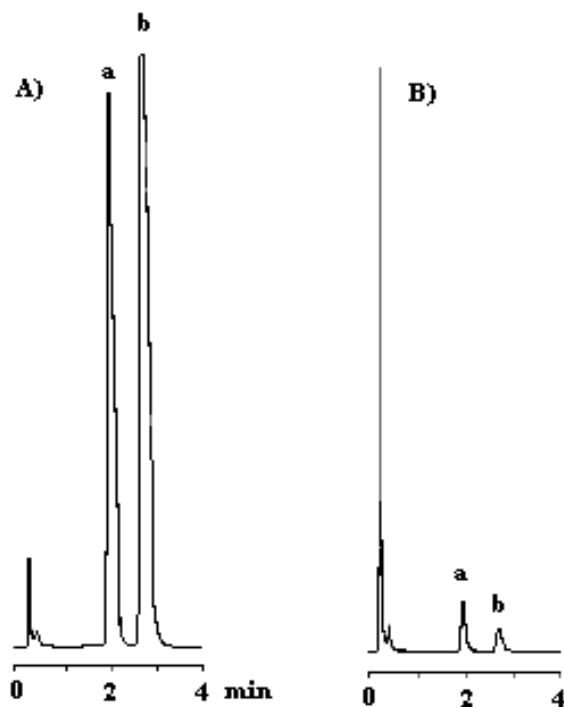


Figura 5. Anfetamina (1) y metanfetamina (2) en orina. Muestra: 1 mL de orina (100 µg de cada analito, 5 µg de *d5*-metanfetamina, 0,7 g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) en un vial de 12 mL. Fibra de SPME: 100 µm de polidimetilsiloxano. Extracción: *headspace*, 80 °C, 5 min (muestra incubada 20 min); Desorción: 3 min, 250 °C. Columna: polidimetilsiloxano, 15 m x 0,53 mm DI, 2,0 µm film; Condiciones isotérmicas: 110 °C; Carrier: nitrógeno, 25 mL/min; Detector: FID, 250 °C; Inyector: sin divisor, 250 °C. A) SPME con *headspace* caliente. B) *Headspace* convencional. Identificación de los picos: a. Anfetamina, b. Metanfetamina.

Se usó SPME para la rápida identificación y cuantificación (81) de anfetaminas en orina. Se extrajo la droga del *headspace* por encima de la muestra de orina, se expuso la droga adsorbida sobre la fibra del SPME al *headspace* por encima del reactivo derivatizante, luego se introdujo la droga derivatizada dentro de un sistema CG capilar-EM (Fig. 6). La derivatización aumenta la sensibilidad del análisis; el procedimiento de *headspace* elimina los componentes extraños de la orina e introduce el reactivo derivatizante de mínimo residuo dentro del sistema CG-EM, minimizando las interferencias. Los resultados son lineales desde 0,2 µg/mL hasta 100 µg/mL. Este método se está evaluando para detectar otras drogas de abuso - cocaína y MDA/MDMA.

**Determinación de ecstasis en orina, usando SBSE.** Otro ejemplo se refiere a la determinación de metilendioxi-metanfetamina (MDMA, ecstasis) (estructura química en Fig. 2) en la muestra de orina de un consumidor recreacional. Este compuesto relativamente polar (log K<sub>o/w</sub> = 2,3) fue trazado en EIC a m/z 177 (Fig. 7).

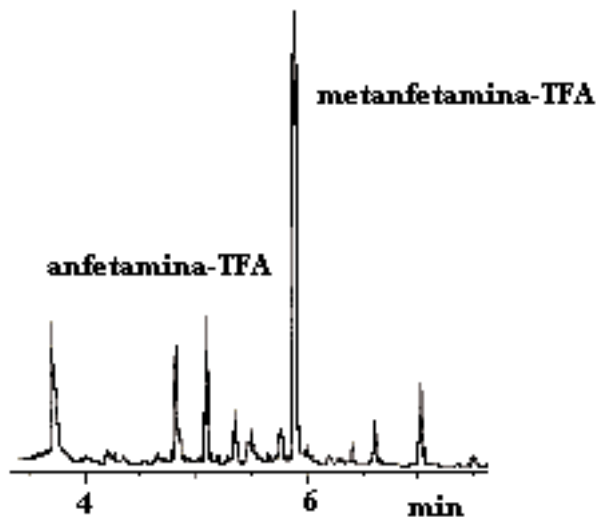


Figura 6. Anfetaminas en orina (muestra caso). Muestra: 1 mL de orina + 0,7 g de  $K_2CO_3$  en un vial de headspace de 20 mL, equilibrado a 80 °C durante 30 min. Fibra de SPME: 100  $\mu$ m de polidimetilsiloxano. Extracción: headspace, 3-5 min, 80 °C; Derivatización: metil bis-trifluoroacetamida (BTFA) (headspace, 0,5 min, ambiente); Desorción: 270 °C, 1 min; Columna: metilsiloxano, 12,5 m x 0,2 mm DI, 0,33  $\mu$ m film; Horno: 60 °C durante 1 min; 60 °C  $\rightarrow$  140 °C a 30 °C/min; 140 °C durante 4 min; luego 140 °C  $\rightarrow$  276 °C a 20 °C/min; 276 °C durante 4 min; Detector: EM, scaneo total; Inyector: sin divisor (cerrado 1 min), 270 °C.

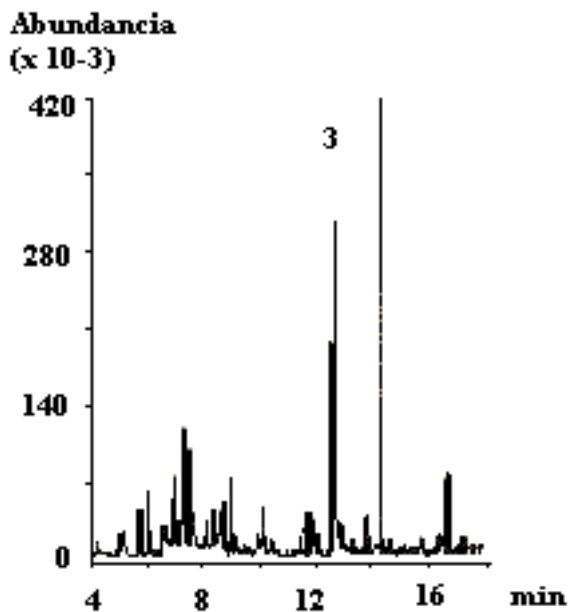


Figura 7. Cromatograma iónico extraído a  $m/z$  177 del análisis SBSE-zTD-CGC-MS de metilendioxi-metanfetamina (MDMA, ecstasis) (3) en la orina de un consumidor recreacional.

La *p*-metoxianfetamina (PMA) es una droga diseñada, relativamente nueva, tipo anfetamina que se vende generalmente como ecstasis o MDMA. Debido a que los efectos alucinatorios están retardados en compara-

ción con los de ecstasis y el compuesto es más tóxico, la ingesta de varias tabletas ha provocado intoxicaciones letales.

Para el análisis por CG-EM, la anfetamina se hace reaccionar con un anhídrido para dar el derivado *N*-acetilado (82) (83), que presenta mejor comportamiento cromatográfico en las columnas capilares no-polares. En el caso de preparar la muestra mediante SBSE, la acilación también aumenta mucho el enriquecimiento. La muestra blanco de orina (5 mL) fueron sembradas con niveles de concentración entre 5 y 500  $\mu$ g/L, hidrolizadas enzimáticamente y se agregaron 0,75 g de carbonato de potasio. Después del agregado de 0,5 mL de anhídrido acético, la mezcla fue inmediatamente agitada con un *Twister*. La *N*-acetil-*p*-metoxianfetamina fue recuperada en un 32% y pudo ser selectivamente extraída a  $m/z$  121. La Figura 8 presenta una muestra de orina sembrada con una concentración de 50  $\mu$ g/L. La regresión lineal del área del pico de *N*-acetil PMA versus las concentraciones sembradas de PMA revelaron una buena linealidad (coeficiente de correlación > 0,99) del procedimiento de derivatización *in-situ*-SBSE-TD-CGC-MS (curva de calibración de PMA sembrada en orina a concentraciones entre 5 y 500  $\mu$ g/L).

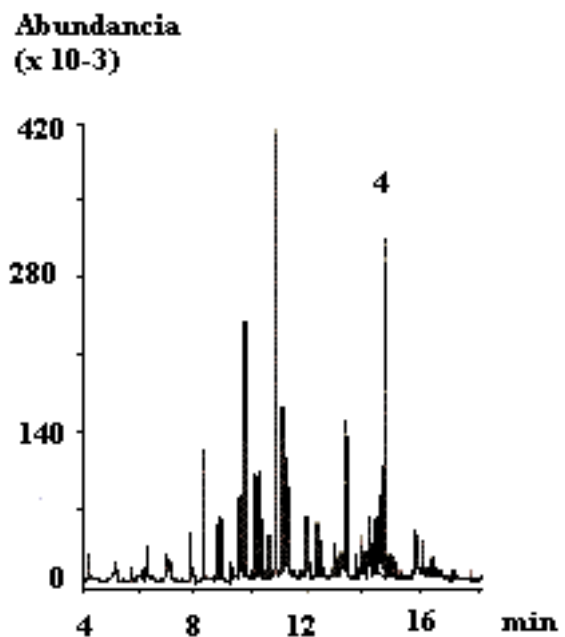


Figura 8. Cromatograma iónico extraído a  $m/z$  121 de una muestra de *N*-acetil-*p*-metoxianfetamina (*N*-acetil PMA) (4) por el método SBSE-TD-CGC-MS, siendo PMA sembrada en una muestra blanco de orina (5 mL) a una concentración de 50  $\mu$ g/L.

## 2. ANÁLISIS DE CANABINOIDES

Se registró un método de verificación usando CG con detector de ionización de llama para un estándar



de d9-tetrahydrocannabinol (6) (d9-THC) (Fig. 9). Se determinó la potencia de d9-THC y otros cannabinoides en marihuana confiscada dentro de EE.UU. desde 1980 a 1997 (84). Se describió un método ELISA usando extractos etéreos de muestras de marihuana para distinguir muestras de *Cannabis sativa* de otras especies vegetales (85). Se determinaron d9-THC y 11-nor-9-carboxi-d9-THC (THC-COOH) en sangre entera mediante extracción polar en fase sólida (SPE) y CG-EM (86).

THC-COOH fue detectado en muestras biológicas mediante CG-EM-EM (87) y CL-EM-EM (88). Se utilizó HS-SPE automática para la determinación de cannabinoides en muestras de pelo (89).

Clasificación de Tetrahydrocannabinol: *Cannabis*. Nombres comerciales u otros: THC; Marinol. Usos médicos: anti-náuseas. Dependencia física: desconocida. Dependencia psicológica: moderada. Tolerancia: sí.

Duración: 2-4 horas. Método de consumo usual: fumados; oral. Posibles efectos: euforia; inhibiciones relajadas; aumento del apetito; desorientación. Efectos de sobredosis: fatiga; paranoia; posible psicosis. Síndrome de abstinencia: informes ocasionales de insomnio; hiperactividad; disminución del apetito.

En la Figura 10 se muestra el CG de 6 cannabinoides usando una columna específica para el análisis de drogas por CG (AT-Drug2, Alltech) y en la Figura 11 el cromatograma de extracción de 9-carboxiTHC de orina humana.

En la Figura 12 se muestra el análisis de carboxi-THC en orina mediante CG-EM usando extracción en fase sólida, con *Δ*9-tetrahydrocannabinol (6) y carboxi-d9-tetrahydrocannabinol (7).

Uso de SBSE para cannabinoides. La Figura 13(A) muestra la detección de compuestos y metabolitos relacionados con *Cannabis* en las muestras de orina de

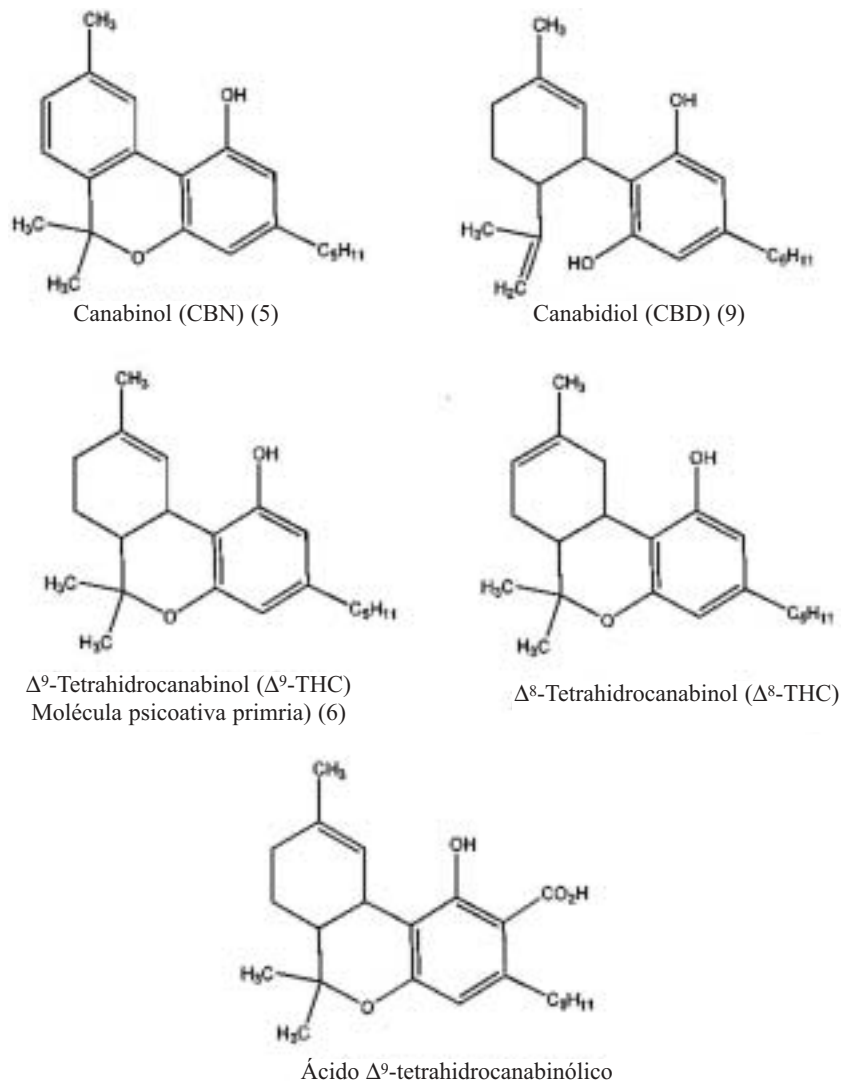


Figura 9. Estructuras químicas de los cannabinoides.

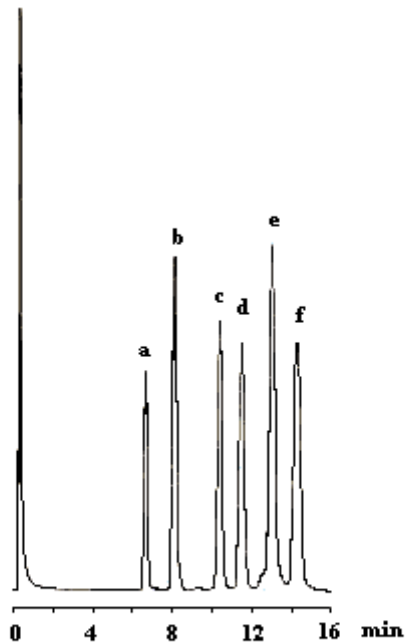


Figura 10. Cromatograma de 6 cannabinoides. Condiciones experimentales: Columna: Heliflex® AT-Drug 2, 10 m x 0,53 mm x 1,20 µm; Condiciones isotérmicas: 220 °C; Carrier: Helio a 7,2 mL/min (55,7 cm/s); Detector: FID a 300 °C. Identificación de los picos: a. Canabicitolol, b. Canabidiol, c. Δ<sup>8</sup>-THC, d. Δ<sup>9</sup>-THC (6), e. Canabigerol, f. Canabinol (5).

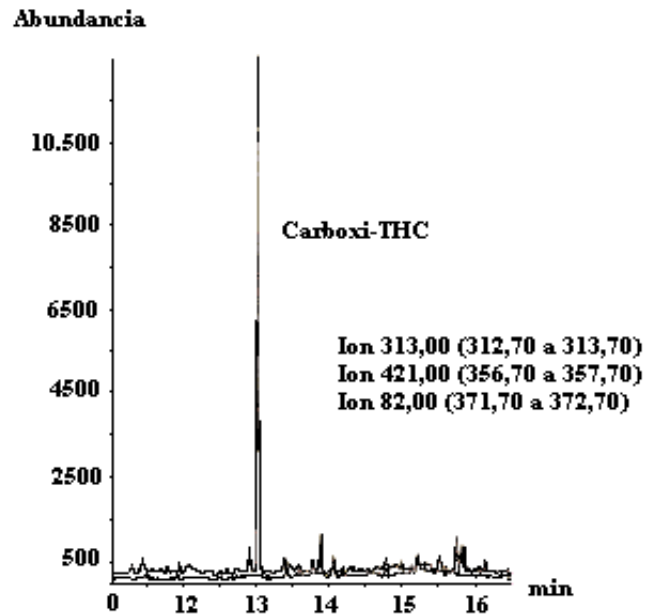


Figura 12. Cromatograma de orina de un adicto a cannabinoides. Columna: DB-1 (J & W Scientific); 15 m x 0,25 mm x 0,25 micrometros. Temperatura de inyección: 260 °C. Temperatura del horno: Inicial: 100 °C durante 3 min; 100 °C → 180 °C a 30 °C/min; 180 °C → 265 °C a 10 °C/min; 265 °C → 300 °C a 30 °C/min; Final: 300 °C durante 1 min.

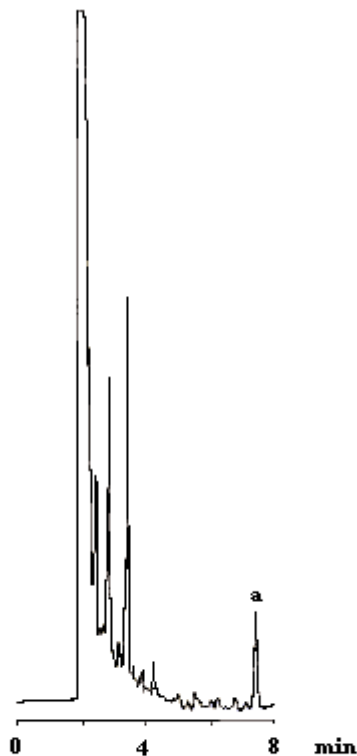


Figura 11. Cromatograma de 9-carboxi-THC en orina. Condiciones experimentales: Columna: Heliflex® AT-1, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Condiciones isotérmicas: 270 °C; Carrier: Helio a 26 cm/s; Detector: FID a 300 °C. Identificación de los picos: a. 9-COOH-THC (Derivatizado) (7).

un adicto mediante cromatografía extractiva iónica (*extracted ion chromatography*: EIC) seleccionando los respectivos iones  $m/z$  205, 231 y 295 para canabicitolol (8), canabidiol (9), canabielsoína (10) y canabinol (5). Todos los compuestos detectados presentaron altos valores de  $\log K_o/w$  ( $> 5$ ) y en consecuencia mostraron gran afinidad por la barra agitadora recubierta con polidimetilsiloxano (PDMS). Se calcularon las recuperaciones teóricas a partir de los valores específicos de  $\log K_o/w$  del soluto usando el paquete de *software* Twister Calculator (Gerstel), que se basa en el programa KowWIN (90) y resultaron ser todas superiores a 99%.

Dos de los cannabinoides se detectaron en la bilis de la misma persona [Fig. 13 (B)]: canabidiol (9), que es una de las sustancias primarias de la planta de marihuana, y canabicitolol (8). Los fluidos biológicos turbios, como la bilis o las muestras de sangre, fueron mezclados con metanol y puestos en un baño ultrasónico durante 15 min antes de someterlos a la extracción SBSE; esto produjo la lisis de las células para la mejor liberación de las drogas de la matriz.

Mediante la selección de ion(es) específicos del compuesto de interés y mediante el enfoque en ventanas específicas de tiempos de retención, se puede hacer la identificación correspondiente. Esto se ilustra mediante los gráficos de contorno selectivo de CG-EM para una ventana de retención entre 17 y 30 min y una ventana iónica entre  $m/z$  180 y 400 de muestras de ori-

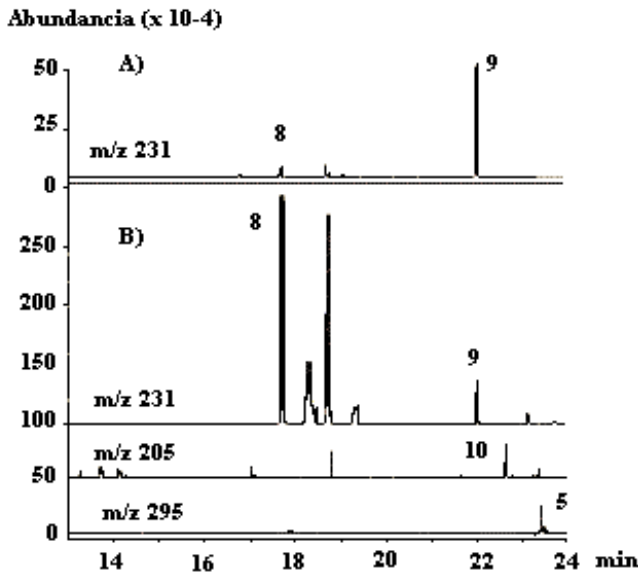


Figura 13. Cromatogramas iónicos extraídos a  $m/z$  205, 231, 295 del análisis SBSE-TD-CGC-MS de canabicromeno (8), canabidiol (9), canabielsoína (10) y canabinol (5), respectivamente en la (A) orina y (B) bilis de un consumidor de Cannabis.

na, sangre y contenido estomacal de un mismo adicto a las drogas. Se seleccionaron las principales trazas de iones para cannabinoides, el grupo metadona y las benzodiazepinas. Canabicromeno, 7-hidroxicanabidiol, canabidiol, *alfa*-canabielsoína, un análogo de *alfa*-canabielsoína, metabolito I de la metadona, diazepam y temazepam fueron fácilmente elucidados en el gráfico de contorno de orina. La presencia de estos compuestos fue verificada mediante el análisis de los EM a unos dados tiempos de retención en el cromatograma RTL "convencional".

### 3. ANÁLISIS DE COCAÍNA

Se procedió a la validación de un método de CG/EM con trampa iónica para la determinación de cocaína y metabolitos y cocaetileno en sangre entera *postmortem* (91). La benzoilecgonina fue determinada en orina mediante derivatización con hexilcloroformiato en fase acuosa y SPE seguida de CG/EM cuadrupolar en trampa iónica (92). Se realizó un análisis HS-SPME/CG-EM del solvente residual atrapado en cocaína ilícita (93). Recientemente, se detectaron cocaína y cocaetileno en sudor mediante SPME y CG-EM (94).

Clasificación de la cocaína: estimulante. Nombres comerciales u otros: *Coke*, *Flake*, *Snow*, *Crack* (la cocaína es designada como narcótico según la CSA). Usos médicos: anestésico local. Dependencia física: posible. Dependencia psicológica: alta. Tolerancia: sí. Duración: 1-2 horas. Método de consumo usual: olfato; fumado; inyectado. Posibles efectos: alerta incrementado; exci-

tación; euforia; aumento del pulso y de la presión sanguínea; insomnio; pérdida de apetito. Efectos de sobredosis: agitación; aumento de la temperatura corporal; alucinaciones; convulsiones; posible muerte. Síndrome de abstinencia: apatía; largos períodos de sueño; irritabilidad; depresión; desorientación.

Los productos metabólicos y de pirólisis de la cocaína (11) se muestran en la Figura 14 y el cromatograma CG de cocaína (11) y sus metabolitos: ecgonina metil éster y benzoilecgonina (12) en la Fig. 15.

Se analizaron cocaína (11) y benzoilecgonina (12) en orina mediante CG/EM usando extracción en fase sólida (Fig. 16).

Se desarrolló un método para detectar cocaína en orina mediante el método de SPME con fibra de inmersión, combinando SPME con CG capilar en una columna de polidimetilsiloxano (30 m x 0,32 mm DI, 0,25  $\mu$ m *film*) y un detector de nitrógeno-fósforo (95). Debido a que la extracción por *headspace* da valores bajos de recuperación para la cocaína, se sumergió una fibra SPME de polidimetilsiloxano de 100  $\mu$ m dentro de las muestras.

Para demostrar esta técnica, se agregaron 0,5 mL de orina, 250 ng de cocaína y 250 ng de estándar interno (cocapropileno, preparado según (96)) a un vial de 1 mL que contenía 20  $\mu$ L de una solución de fluoruro de sodio al 2,5% y una pequeña barra magnética de agitación. Se insertó la aguja en un sistema SPME a través del *septum* que sella el vial, se sumergió la fibra SPME en la muestra durante 30 min, luego se expuso la fibra en la zona de inyección, caliente, durante 3 min para asegurar una completa desorción del analito extraído.

La Figura 17 muestra los cromatogramas de cocaína y del estándar interno (cocapropileno) en metanol (inyección directa, 20 ng de cada uno, *on-column*), la droga y el estándar interno según se extrajeran de una orina sembrada, y un extracto de una orina blanco. Los extractos son muy limpios - el fondo de la orina no interfiere con el análisis. Los respectivos valores de recuperación para la cocaína y el estándar interno, determinados por comparación de las áreas de los picos de los extractos con respecto a aquellos de la solución metanólica, fueron de 20% y 30%. Las extracciones fueron lineales desde 30 ng-250 ng/0,5mL de orina; el límite de detección para la cocaína fue de aproximadamente 6 ng/0,5mL de orina.

También, los compuestos polares que muestran menor afinidad por la fase de PDMS pueden ser adecuadamente enriquecidos. La cocaína (benzoilecgonina metil éster,  $\log K_{o/w} = 2,2$ ) es enriquecida en un 40% en la muestra acuosa de 5 mL mientras que el análogo de etilbenzoilecgonina (cocaetileno,  $\log K_{o/w} = 2,7$ ) es recuperado en un 65%. Este último compuesto se forma en el organismo humano si la cocaína se administra en combinación con bebidas alcohólicas (etanol) (97). Ambos compuestos pudieron ser automáticamente detectados en la orina de un adicto a cocaína (Fig. 18) mediante SBSE.

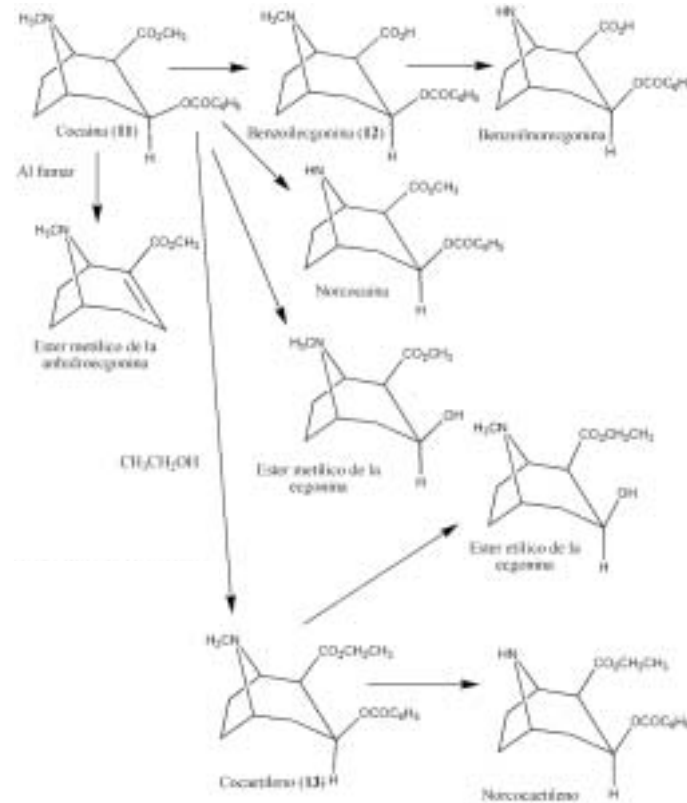


Figura 14. Productos metabólicos y de pirólisis de la cocaína.

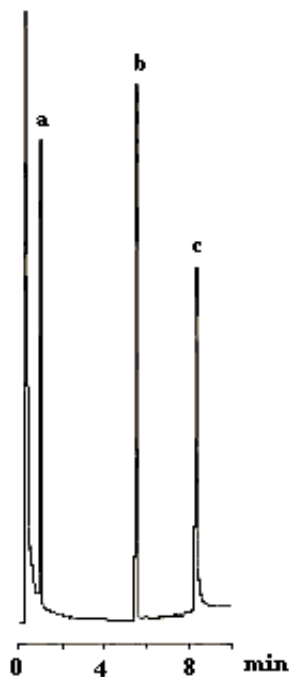


Figura 15. Cromatograma de cocaína (11) y sus metabolitos: ecgonina metil éster y benzoilecgonina (12). Condiciones experimentales: Columna: Heliflex® AT-Drug 1, 10 m x 0,53 mm x 1,20 µm; Temperatura: 170 °C (se mantiene 1min) hasta 250 °C a 10°C/min; Carrier: Helio a 9 mL/min (64,6 cm/s); Detector: FID a 300 °C. Identificación de los picos: a. Éster metílico de la ecgonina, b. Cocaína (11), c. Benzoilecgonina (12).

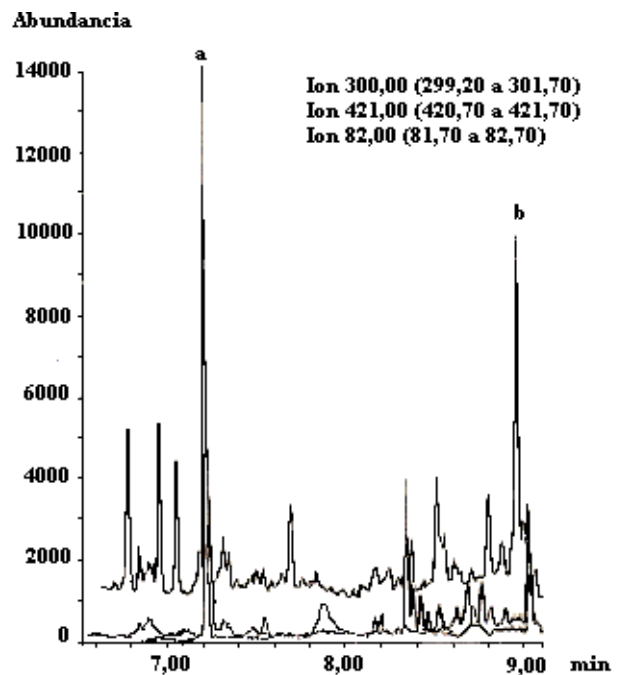


Figura 16. Cromatograma de cocaína (11) y benzoilcocaína (12) en orina. Columna: DB-1 (J & W Scientific); 15 m x 0,25 mm x 0,25 micrometros. Temperatura de inyección: 250 °C. Temperatura del horno: Inicial: 100 °C durante 1 min; 100 °C → 260 °C a 20 °C /min; Final: 260 °C. Identificación de los picos: a. Cocaína, b. Benzoilecgonina.



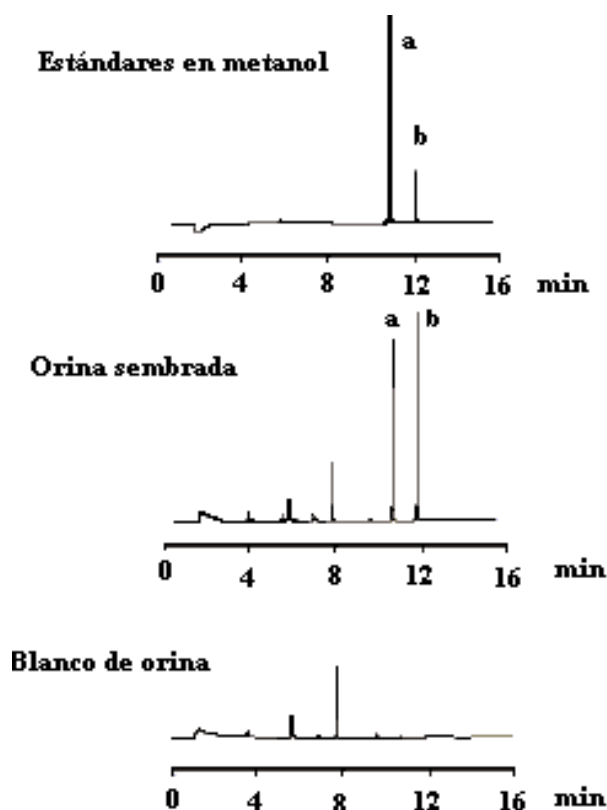


Figura 17. Cromatograma de cocaína y estándar interno en metanol, en orina y orina blanco. Muestra: 0,5 mL de orina (250 ng de cada analito, 20  $\mu$ L de NaF al 2,5%) en un vial de 1mL. Fibra de SPME: 100  $\mu$ m de polidimetilsiloxano. Extracción: inmersión, 30 min; Desorción: 3 min, 240 °C; Columna: polidimetilsiloxano, 30 m x 0,32 mm DI, 0,25  $\mu$ m film; Horno: 120 °C  $\rightarrow$  280 °C a 10 °C/min; Carrier: helio, 3 mL/min; Detector: NPD, 280 °C; Inyector: sin divisor (divisor abierto después de 1 min), 240°C. Identificación de los picos: a. Cocaína, b. Cocapropileno.

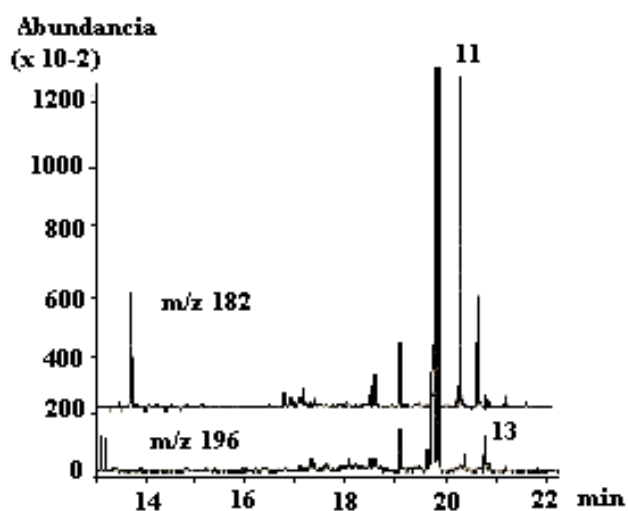


Figura 18. Cromatogramas iónicos extraídos a m/z 182 y 196 del análisis SBSE-TD-CGC-MS de cocaína (11) y etilbenzoilcogonina (cocaetileno, (13) en una muestra de orina.

También se analizaron simultáneamente diferentes drogas de abuso: metanfetamina (2), cocaína (11) y heroína (o diacetilmorfina) (14) (Fig. 19).

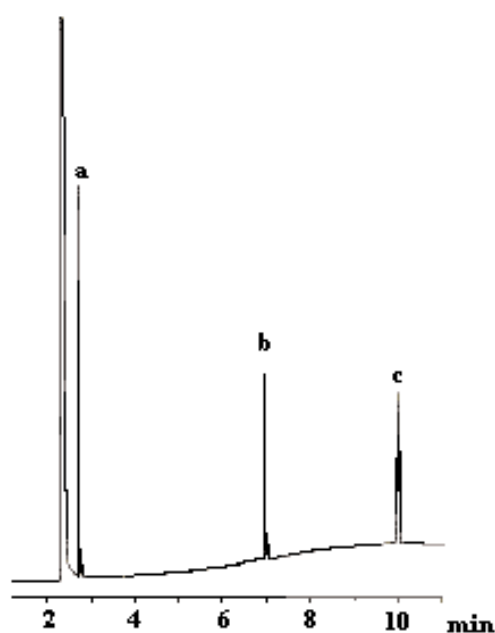


Figura 19. Cromatograma de metanfetamina (2), cocaína (11) y heroína (14). Condiciones experimentales: Columna: Heliflex® AT-35ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m; Temperatura: 200 °C (se mantiene 0 min) hasta 330 °C (se mantiene 8,5 min) a 20 °C/min; Carrier: Helio a 0,6 mL/min (22,5 cm/s); Detector: FID a 340 °C. Identificación de los picos: a. Metanfetamina (2), b. Cocaína (11), c. Diacetilmorfina (14).

#### 4. ANÁLISIS DE MORFINA Y NARCÓTICOS RELACIONADOS

La noscapina fue identificada mediante CG-EM como un adulterante en 22 casos de heroína ilícita (98). Muestras de heroína de la calle fueron analizadas por CG/FID para desarrollar un modelo predictivo para distinción de lotes (99). Un total de 198 muestras ilícitas de heroína fueron analizadas para determinar los contenidos de metal (100).

Se determinó el origen geográfico de las muestras de heroína (14) y cocaína (11) usando RMN de relación isotópica de sitio específico de deuterio (*site-specific isotopic ratio deuterium nuclear magnetic resonance*) (101). Se determinó el perfil químico de muestras de heroína ilícita (102). La redistribución *postmortem* de morfina y sus metabolitos fue determinada en 40 muertes relacionadas con heroína (103). Se describió un método para el análisis de etorfina en muestras *postmortem* usando HPLC con detección UV de arreglo de diodos (104). Se detectaron heroína, cocaína y éxtasis en pelo mediante radioinmunoensayo, HPLC y electroforesis capilar (105).

Las estructuras químicas de los morfínicos se muestran en la Figura 20 y el cromatograma CG de morfina (**16**) y dos derivados: 6-acetilmorfina (**17**) y diacetilmorfina (heroína) (**14**), obtenido con una columna específica para drogas (AT-Drug 3, Altech) se muestra en la Fig. 21.

### 5. ANÁLISIS DE FENCICLIDINA

**Clasificación de fenciclidina:** alucinógeno. Nombres comerciales u otros: PCE; PCPy; TCP; PCP; Hog; Loveboat; Angel Dust. Usos médicos: ninguno. Dependencia física: desconocida. Dependencia psicológica: alta. Tolerancia: sí. Duración: días. Método de

consumo usual: oral; fumado. Posibles efectos: ilusiones y alucinaciones; alteración de la percepción de tiempo y distancia. Efectos de sobredosis: episodios de "viajes" más largos, más intensos; psicosis; posible muerte. Síndrome de abstinencia: desconocido. La estructura química de la fenciclidina se encuentra en la Figura 22.

En la Figura 23 se presenta un cromatograma de una muestra artificial de drogas alucinógenas: mescalina, *N,N*-dimetiltriptamina, ketamina y fenciclidina (**18**) y en la Figura 24 se muestra el análisis de fenciclidina (**18**) en orina mediante CG-EM usando extracción en fase sólida.

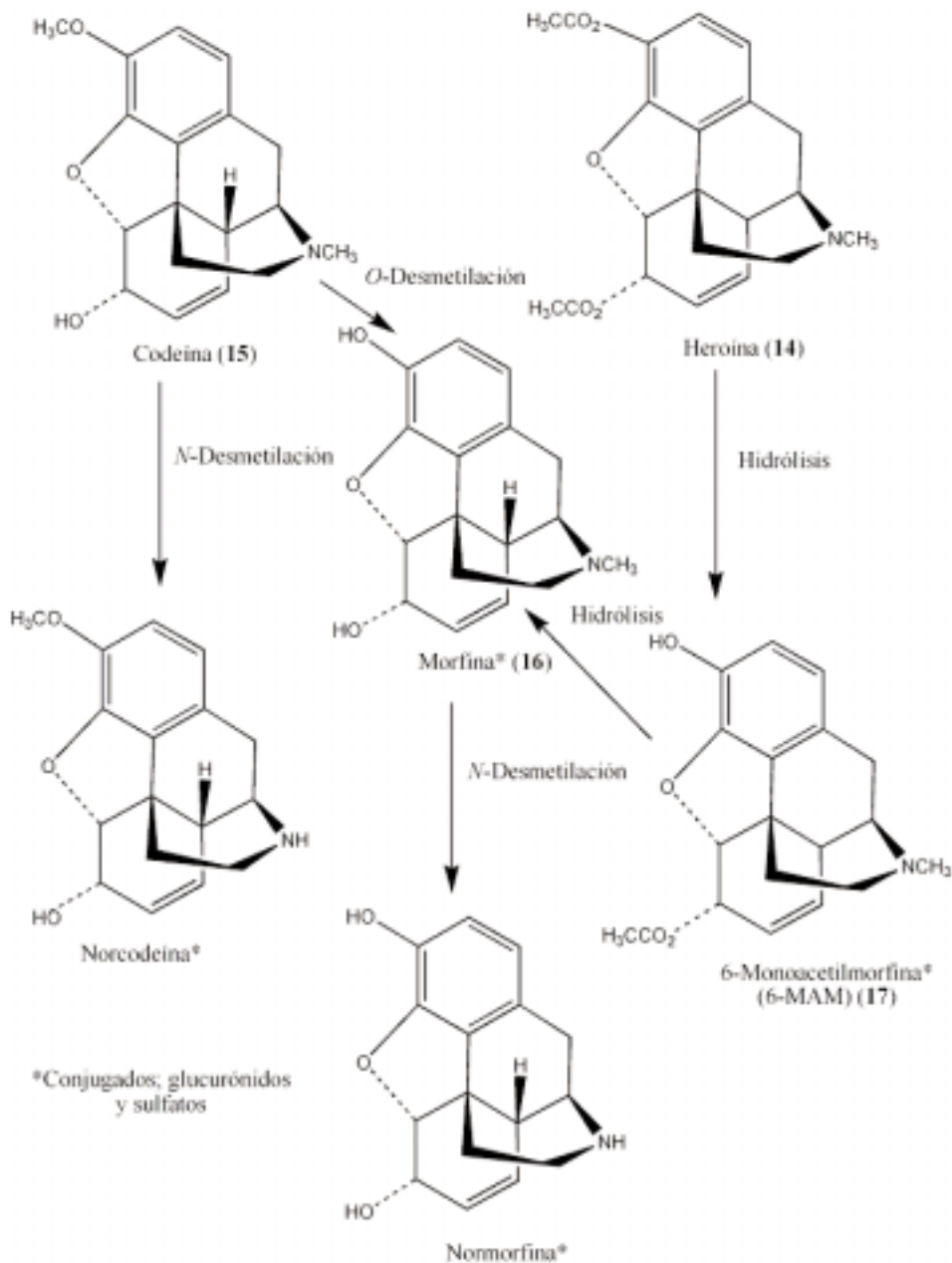


Figura 20. Estructuras químicas de la morfina y relacionados.

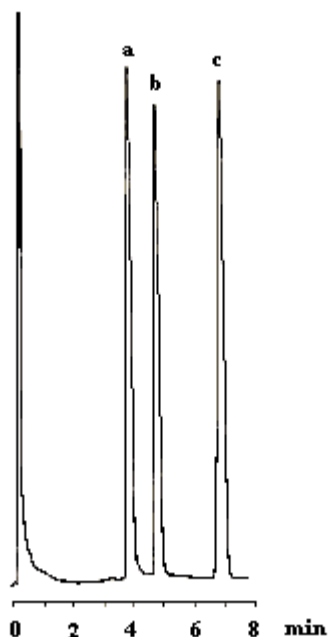


Figura 21. Cromatograma de morfina (16) y dos derivados: 6-acetilmorfina (17) y diacetilmorfina (heroína) (14). Condiciones experimentales: Columna: Heliflex® AT-Drug 3, 10 m x 0,53 mm x 1,20 µm; Condiciones isotérmicas: 240 °C; Carrier: Helio a 10 mL/min (79,4 cm/s); Detector: FID a 300°C. Identificación de los picos: a. Morfina (16), b. 6-Acetilmorfina (17), c. Diacetilmorfina (14).

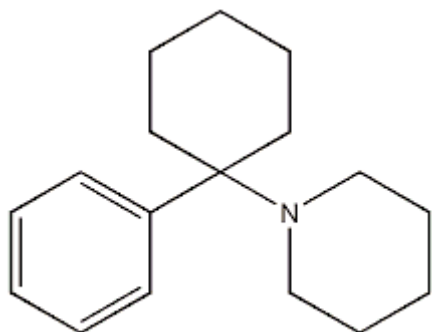


Figura 22. Estructura química de la fenciclidina.

### 6. ANÁLISIS DE BENZODIAZEPINAS

Las benzodiazepinas (Fig. 25) fueron identificadas en fluidos biológicos usando CG con columna dual y EMIT inmunoensayo (106), SPE seguido de CG-EM (107), y SPME automático en tubo con CL/ESI-EM (108). Diazepam fue determinado en plasma humano mediante SPME and CGC-EM (109). Alprazolam y sus metabolitos fueron cuantificados en plasma humano usando LC/ESI-EM/EM (110).

Se informaron análisis, simples y rápidos de color, para el flunitrazepam (111). Se presentaron datos de mues-

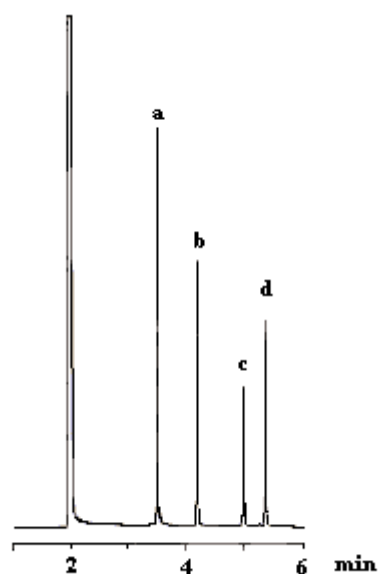


Figura 23. Cromatograma de una muestra artificial de drogas alucinógenas. Condiciones experimentales: Columna: Heliflex® AT-5ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Condiciones isotérmicas: 225 °C; Carrier: Helio a 0,7 mL/min (25 cm/s); Detector: FID a 325 °C. Identificación de los picos: a. Mescalina, b. N,N-dimetiltriptamina, c. Ketamina (0,2 mg/mL), d. Fenciclidina (18).

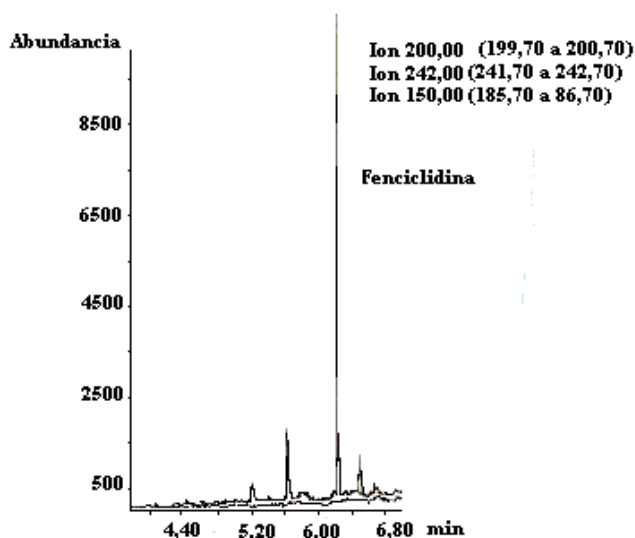


Figura 24. Cromatograma de fenciclidina (18) en orina. Columna: DB-1 (J & W Scientific); 15 m x 0,25 mm x 0,25 micrometros. Temperatura de inyección: 250 °C. Temperatura del horno: Inicial: 100 °C durante 1 min; 100 °C → 230 °C a 20 °C /min; Final: 230 °C.

tras con flunitrazepam confirmado, obtenidas de casos de conducción de autos bajo efecto de drogas (112). Flunitrazepam fue identificado en fluidos biológicos usando CG-EM (113) (114), SPE y CG-EM (115), inmunoensayo (116), e inmunoensayo enzimático en microplacas y CG-EM con ionización química negativa (117).

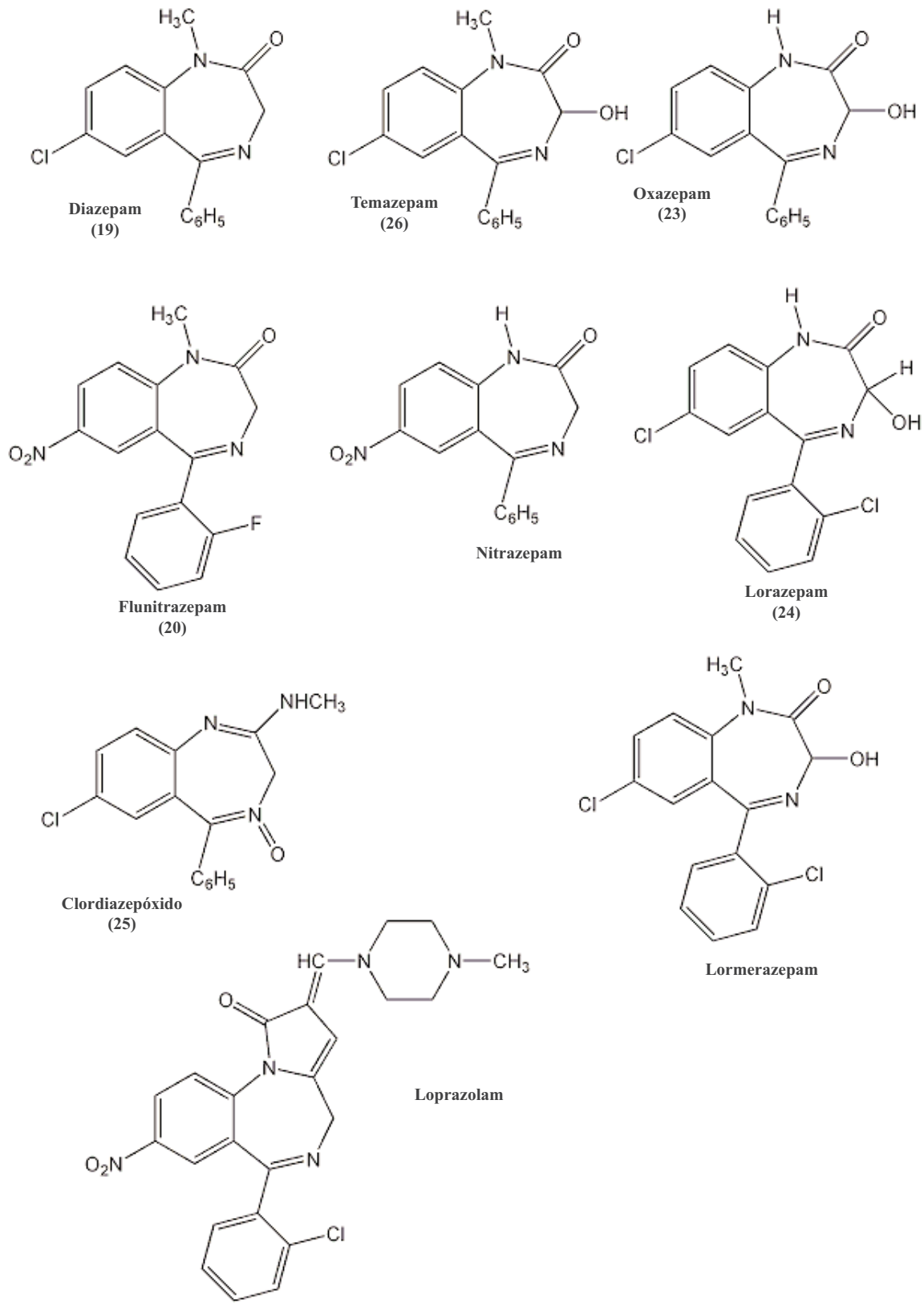


Figura 25. Estructuras químicas de las benzodiazepinas.



Se usó SPME en la determinación de diazepam unido a albúmina sérica humana (118) y SPME-CL con detección UV para estudiar las interacciones de delorazepam-albúmina sérica (119).

Las benzodiazepinas se prescriben en el tratamiento de *stress*, ansiedad, desórdenes de sueño y *seizures* pero generalmente son consumidas por los adictos a las drogas (120) (121). Por lo tanto, están frecuentemente presentes en los casos forenses. El diazepam (19), flunitrazepam (20) y flurazepam (21) fueron sembrados de soluciones estándar de metanol (10 µL) en muestras blanco de orina (5 mL) en concentraciones individuales entre 5 y 500 µg/L. Se agregó *N*-metilclonazepam como estándar interno (*internal standard*: IS) a cada muestra a un nivel constante de 50 µg/L. En forma similar a las muestras reales, se agregó 1 mL de solución de *buffer* de acetato de amonio (pH 6,5) y se incubaron con *beta*-glucuronidasa. La Figura 26 muestra el EIC a *m/z* 86, 283, 312 y 329 de una muestra blanco de orina sembrada con concentraciones individuales de 50 µg/L.

La cuantificación fue realizada con estas trazas de iones selectivos. Debido a las diferencias relativas en las recuperaciones de la extracción SBSE y en el proceso de ionización de EM para las mismas concentraciones de solutos se obtuvieron diversas abundancias.

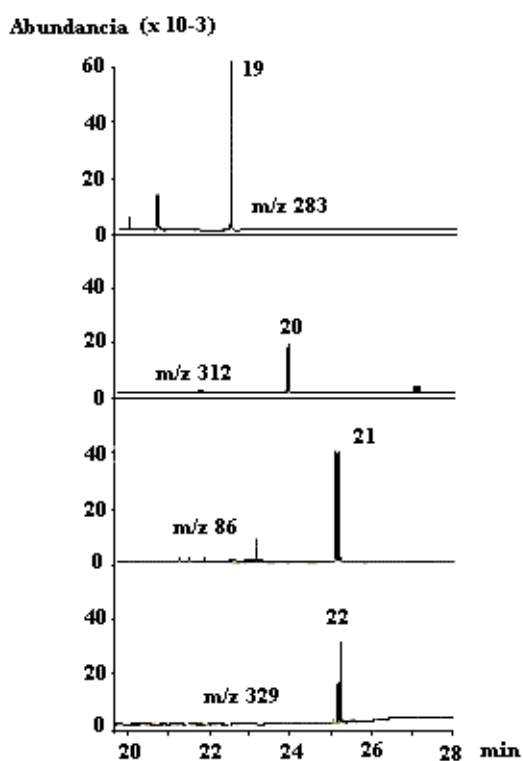


Figura 26. Cromatogramas iónicos extraídos a *m/z* 86, 283, 312, 329 del análisis SBSE-TD-CGC-MS de diazepam (19), flunitrazepam (20), flurazepam (21) y *N*-metilclonazepam (EI, 22) sembrados en una muestra blanco de orina (5 mL) a un nivel de concentración de 50 µg/L. Para la calibración, el estándar interno fue sembrado a 50 µg/L en todos los casos.

En la Figura 27 se muestra el análisis de benzodiazepinas, como derivados trimetilsililados, en orina.

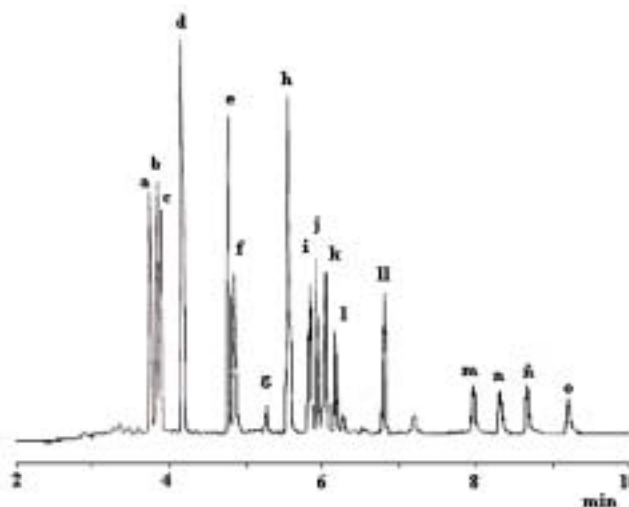


Figura 27. Cromatograma de benzodiazepinas en orina, como derivados trimetilsililados. Condiciones experimentales: Columna: Heliflex® AT-5ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Temperatura: 240 °C (se mantiene 0 min) hasta 315 °C (se mantiene 5 min) a 10 °C/min; Carrier: Helio a 0,8 mL/min (29 cm/s); Detector: MSD a 325 °C. Identificación de los picos (como derivados TMS): a. Desalquilflurazepam, b. Nordiazepam, c. Halazepam, d. Oxazepam (23), e. Lorazepam (24), f. Diazepam (19), g. Clordiazepóxido (25), h. Temazepam (26), i. Flunitrazepam (20), j. Clonazepam, k. Prazepam, l. 7-Amino- flunitrazepam, ll. *N*-metilclonazepam (22), m. Alprazolam, n. alfa-hidroxi alprazolam, ñ. Triazolam, o. alfa-hidroxitriazolam.

### 7. ANÁLISIS DE ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS EN ORINA

Se desarrolló un método para extraer antidepresivos tricíclicos (Fig. 28) de la orina, usando SPME *headspace* y CG capilar (122). Se expuso una fibra SPME de 100 µm de polidimetilsiloxano al *headspace* por encima de la muestra de orina, y los analitos adsorbidos fueron introducidos en la columna capilar de polidimetilsiloxano (30 m x 0,32 mm DI, 0,25 µm *film*).

A un vial de 7,5 mL que contenía una pequeña barra magnética de agitación, se agregó 1 mL de orina *plus* 1 µg de cada antidepresivo (amitriptilina (27), clorimipramina, imipramina, trimipramina) y 50 µL de hidróxido de sodio 5M. Se calentó el vial sellado a 100 °C en un aparato de calentamiento/agitación. Después de 30 min, se expuso la fibra al *headspace* por encima de la muestra durante 15 min, luego se expuso la fibra en la zona de inyección caliente durante 3 min.

La Figura 29 muestra el cromatograma de los antidepresivos tricíclicos (amitriptilina, imipramina, trimipramina y cloriprimina) en orina después de la extracción del *headspace* por encima de la orina sembrada a la cual se agregaron 50 µL de NaOH 5M, y sin NaOH,

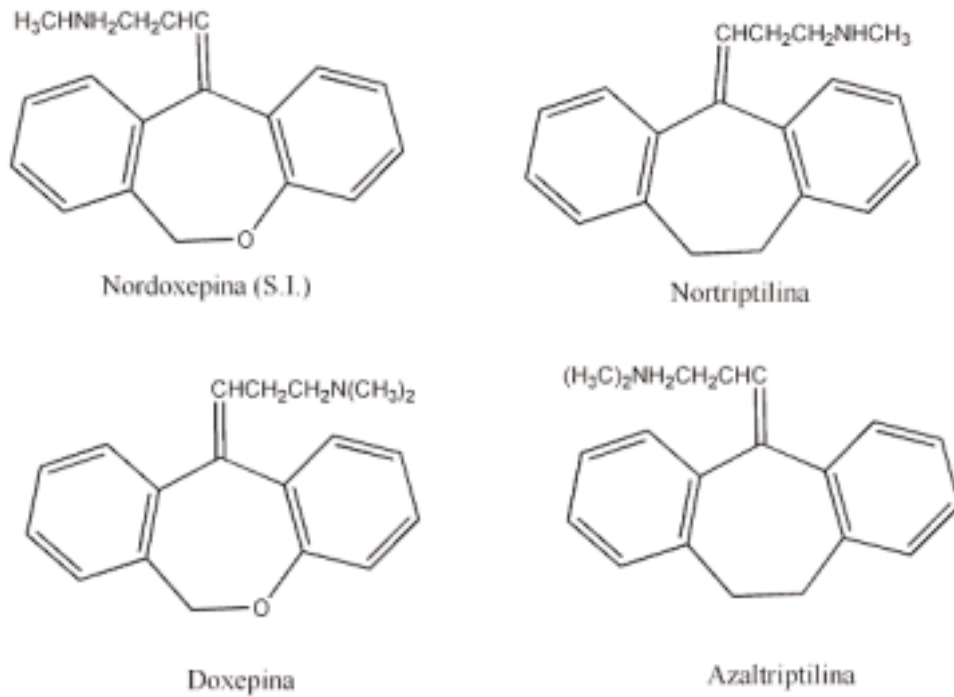


Figura 28. Estructuras químicas de antidepresivos tricíclicos.

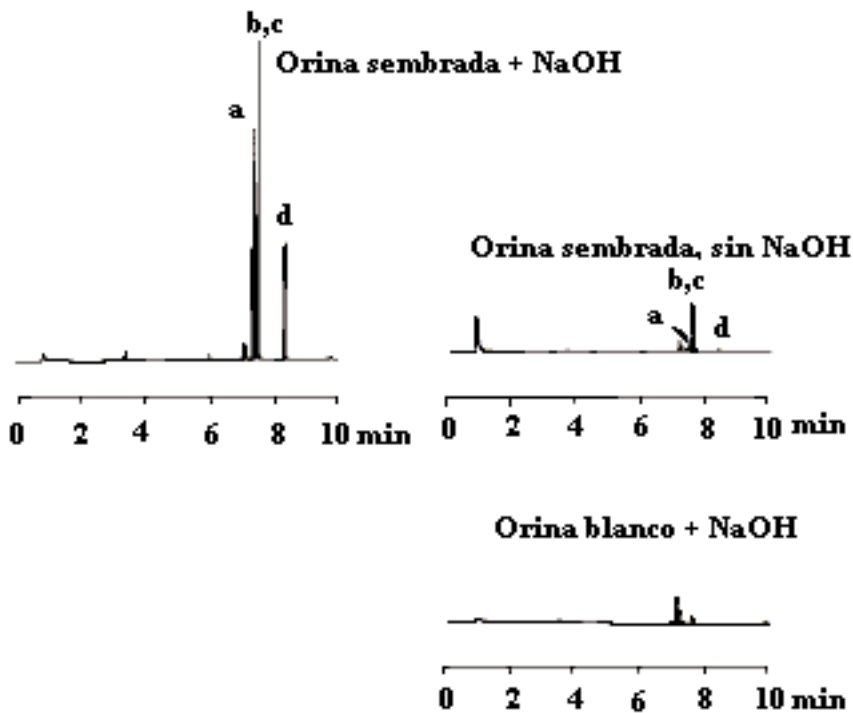


Figura 29. Antidepresivos tricíclicos en orina. Muestra: 1 mL de orina ( $1\mu\text{g}$  de cada analito  $\pm$  50  $\mu\text{L}$  de NaOH 5M) en un vial de 7,5 mL. Fibra de SPME: 100  $\mu\text{m}$  de polidimetilsiloxano; Extracción: headspace, 15 min, 100 °C (muestra incubada 30 min); Desorción: 3 min, 280 °C; Columna: polidimetilsiloxano, 30 m x 0,32 mm DI, 0,25  $\mu\text{m}$  film; Horno: 100 °C  $\rightarrow$  300 °C a 20 °C/min; Carrier: helio, 3 mL/min; Detector: FID, 280 °C; Inyector: sin divisor (divisor abierto después de 1 min), 280 °C. Identificación de los picos: a. Amitriptilina (27), b. Imipramina, c. Trimipramina, d. Clorimipramina.

así como un extracto de un blanco de orina tratado con NaOH. A pH neutro, la recuperación de la droga fue baja, y se requirió una base para aumentar la concentración de los analitos en el *headspace*.

La solución de NaOH 5M no causó interferencia en el análisis por los otros componentes de la orina, pero el agregado de 0,5 g de cloruro de sodio o carbonato de potasio además del NaOH, en un intento de lograr una mayor recuperación de la droga, produjo numerosos picos adicionales que co-eluyeron con imipramina y trimipramina. Los valores corregidos para la recuperación de la droga en presencia de NaOH fueron de 10-20% (no como se indicó en (122)). Las extracciones fueron lineales en el rango 0,05-2 µg/mL de orina, y el límite de detección para cada droga fue de 24-38 ng/mL de orina.

Al desarrollar el análisis por SPME/CG se extrajeron cuatro antidepresivos tricíclicos adicionales (carpipramina, clocapramina, desipramina, lofepramina) a partir de muestras de orina, pero estos compuestos se descompusieron en CG y fueron eluidos como picos múltiples. Tales analitos termosensibles deberían ser analizados combinando la extracción SPME de *headspace* con análisis de HPLC (SPME/HPLC).

Se efectuó la preparación de la muestra con SPME con fibra en un tubo para la separación por electroforesis capilar de antidepresivos tricíclicos en orina humana (123).

#### 8. ANÁLISIS DE ANESTÉSICOS LOCALES EN SANGRE

El cromatograma gas-líquido de lidocaína y metabolitos en suero, con una columna específica para el análisis de drogas (AT-Drug2, Alltech) se muestra en la Figura 30.

Se usó SPME *headspace* en combinación con CG capilar para extraer diez anestésicos locales de sangre entera (124). Los analitos adsorbidos en la fibra SPME de 100 µm de polidimetilsiloxano se introdujeron en una columna capilar de polidimetilsiloxano (30 m x 0,32 mm DI, 0,25 µm *film*).

Se agregó 1 mL de ácido perclórico 1M a 1 mL de muestra de sangre entera que contenía 5 µg de cada uno de los 10 anestésicos locales [benoxinato, bupivacaína, 2-(dietilamino)etil éster del ácido *p*-(butilamino)-benzoico, dibucaína, aminobenzoato de etilo, lidocaína, mepivacaína, prilocaína, procaína, tetracaína].

Después de 3 min de agitación vigorosa con un vortex, se centrifugó la muestra a 3.000 rpm durante 5 min, se transfirió el sobrenadante límpido a un vial de 7,5 mL que contenía una pequeña barra magnética de agitación, luego se agregaron 100 µL de hidróxido de sodio 10 M y 0,5 g de sulfato de amonio. Después de calentar el vial sellado a 100 °C durante 15 min, se expuso la fibra al *headspace* por encima de la muestra du-

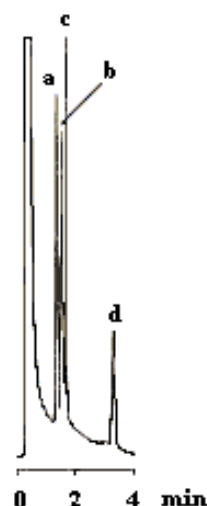


Figura 30. Cromatograma de lidocaína y metabolitos en suero. Condiciones experimentales: Columna: Heliflex® AT-Drug 2, 10 m x 0,53 mm x 1,20 µm; Condiciones isotérmicas: 220 °C; Carrier: Helio a 8 mL/min; Detector: FID a 270 °C. Identificación de los picos: a. GX, b. MEGX, c. Lidocaína, d. Mepivacaína.

rante 40 min. A continuación, se expuso la fibra en la zona de inyección caliente durante 3 min.

La Figura 31 muestra los cromatogramas de las drogas en metanol (inyección directa, 50 ng de cada uno *on-column*), según se extrajera del *headspace* por encima de la sangre sembrada, con el agregado de NaOH 10M y 0,5 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y un extracto de *headspace* a partir de un blanco de sangre. NaOH plus (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dio la mejor combinación de alta recuperación de droga y bajo *background*. Varias otras combinaciones de NaOH y sal, incluyendo cloruro de sodio y carbonato de potasio, dieron baja recuperación de la droga o bien, más picos interferentes como *background*.

Bajo las mejores condiciones (adición de NaOH 10M + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), la recuperación de la droga fue de sólo 0,37% (procaína) a 11%. No obstante, no se tuvo dificultad en cuantificar los resultados. Las extracciones para estos compuestos, excluyendo la procaína, fueron lineales en el rango de 0,5-12 µg/mL o 1-12 µg/mL de sangre. Los límites de detección fueron de 60-250 ng/mL de sangre (bupivacaína, lidocaína, mepivacaína, prilocaína, tetracaína) o 250-830 ng/mL de sangre [benoxinato, 2-(dietilamino)etil éster del ácido *p*-(butilamino)benzoico, dibucaína, aminobenzoato de etilo]. Con un límite de detección > 2.500 ng/mL de sangre, la procaína fue el único compuesto problema. Los coeficientes de variación para las diez drogas fueron buenos: 7-19% (mediciones durante el día) o 7-23% (mediciones día a día). Otra vez, con respecto a las extracciones líquido-líquido y extracciones en fase sólida convencionales, SPME es más simple y más rápida, y produce extractos más limpios. Esta técnica puede

usarse en toxicología forense, para el análisis general de las muestras para anestésicos locales antes de hacer el análisis por CG o por CG-EM. Bajo estas condiciones, se usó una única fibra SPME más de 50 veces. Se limpiaron las fibras contaminadas mediante desorción térmica en la zona de inyección (280 °C durante 1-2 h).

Se determinó lidocaína mediante SPME (125) y mediante HS-SPME en muestras forenses de pelo de drogadictos (126) y en muestras de orina con EM (127). Se determinaron anestésicos locales en muestras de plasma humano usando CG-EM (128).

### 9. ANÁLISIS DE METADONA

Las estructuras químicas de la metadona y sus metabolitos se muestran en la Figura 32 y el cromatograma correspondiente en la Figura 33.

La extracción sortiva con barra agitadora (*stir-bar sorptive extraction*: SBSE) causó un gran enriquecimiento para los solutos con coeficientes de distribución octanol-agua mayores a 100 a partir de las muestras acuosas. En la Figura 34 se muestra un perfil atípico del

análisis SBSE-TD-CGC-EM para una muestra de orina de un adicto.

El cromatograma representa una colección de más de 200 compuestos, ilustrando la versatilidad y la sensibilidad de la técnica. La mayoría de los picos principales se originan de los alimentos y/o de los procesos biológicos (19) (20). En el perfil, la metadona (19,72 min) (28), un potente analgésico y sedante ampliamente usado en el tratamiento de la adicción a heroína, pudo ser identificada inmediatamente por su EM. La metadona y sus metabolitos catabólicos muestran una afinidad muy alta por PDMS ( $\log K_o/w > 4,2$ ) y son extraídos cuantitativamente con SBSE. El análisis de otras drogas o metabolitos en la matriz compleja en la Figura 34 lleva mucho tiempo, pero puede ser simplificado usando un método RTL/CG en combinación con un programa de búsqueda automática de analitos de Agilent Technologies (45) (129). El método de CG fue fijado ("loqueado") usando palmitato de etilo (RTL 17,68 min).

Se puede crear un banco de datos RTL mediante la incorporación de tiempos de retención y datos de EM de varios grupos de compuestos: cocaína y metabolitos,

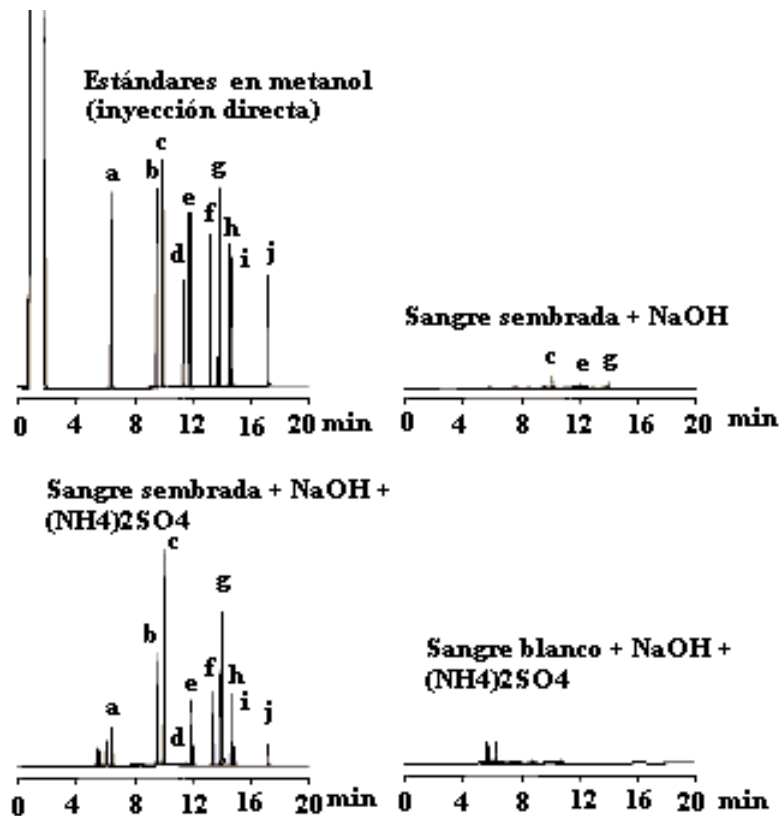


Figura 31. Anestésicos locales en sangre. Muestra: sobrenadante desproteinizado proveniente de (1 mL de sangre + 1 mL de ácido perclórico 1M + 5 µg de cada analito + 100 µL de NaOH 10M ± 0,5 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) en un vial de 7,5 mL; Fibra de SPME: 100 µm de polidimetilsiloxano; Extracción: headspace, 40 min, 100 °C (muestra incubada 30 min); Desorción: 3 min, 250 °C; Columna: polidimetilsiloxano, 30 m x 0,32 mm DI, 0,25 µm film; Horno: 100 °C durante 1 min; 100 °C → 290 °C a 10 °C/min; Carrier: helio, 3 mL/min; Detector: FID, 280 °C; Inyector: sin división (divisor abierto después de 1 min), 250 °C. Identificación de los picos: a. Aminobenzoato de etilo, b. Prilocaína, c. Lidocaína, d. Procaína, e. Mepivacaína, f. Tetracaína, g. Bupivacaína, h. p-(Butilamino)benzoato de 2-(dietilamino)etilo, i. Benoxinato, j. Dibucaina.



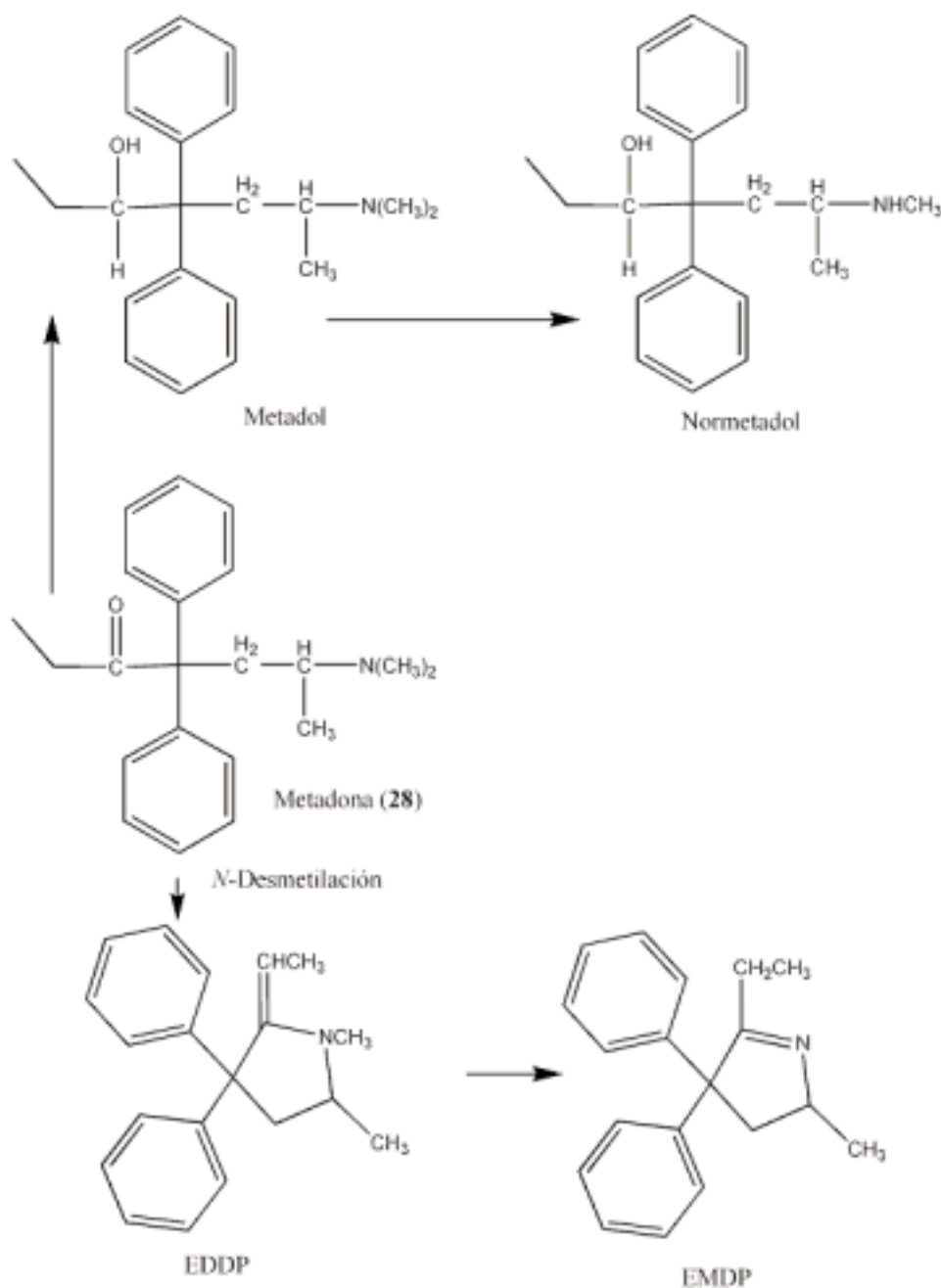


Figura 32. Estructuras químicas de metadona y metabolitos.

opiatos, metadona y análogos, cannabinoides, anfetaminas, benzodiazepinas y barbituratos, como se muestran en la Tabla II, a modo de ejemplo.

Durante el procedimiento de análisis general, los datos de CG-EM son automáticamente analizados para elucidar similitudes en la información de retención y de EM entre la biblioteca y los compuestos detectados. Por ejemplo, una elucidación positiva del *screening* resultante en el perfil de la Figura 34, confirma la presencia de 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina, un metabolito de la metadona. Las ventanas de la búsqueda resultante

para la detección del metabolito I de la metadona son: ventana (a): cromatogramas iónicos extraídos a  $m/z$  277 (Tion), 276 (Q1), 262 (Q2) and 220 (Q3); ventana (b): espectro de masa; ventana (c): datos de tiempos de retención, respuesta de pico y relaciones iónicas esperadas (*expected*: Exp%) y medidas (Act%) del EM.

En base a todos los datos, los iones específicos de los solutos de interés pueden ser extraídos para mostrar la presencia de esos solutos en un fluido biológico en estudio. Las trazas de los iones selectivos a  $m/z$  72, 273 y 277 para metadona (28), el metabolito primario



Figura 33. Cromatograma de metadona y metabolitos (EMDP Y EDDP). Condiciones experimentales: Columna: Heliflex® AT-Drug 2, 10 m x 0,53 mm x 1,20 µm; Condiciones isotérmicas: 200 °C; Carrier: Helio a 20 mL/min; Detector: FID a 300 °C. Identificación de los picos: a. EMDP, b. EDDP, c. Metadona (25).

#### Abundancia (x 10<sup>-3</sup>)

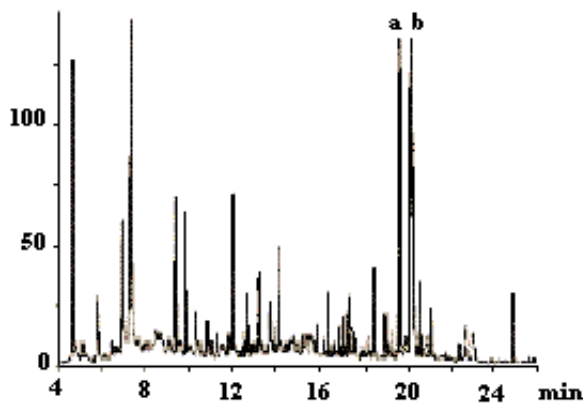


Figura 34. Cromatograma iónico total del análisis SBSE-TD-CG-C-EM de 5 mL de orina de un adicto. Identificación de los picos: a. Metadona (28), b. Androst-16-en-3-ol.

2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (2-EDDP, (30)), 1,4-difenil-6-metil-1,4-dihidropirimidina-5-carbonitrilo (31), y una impureza de la metadona (29) se muestran en la Figura 35(A) para la muestra de orina y en la Figura 35(B) para la muestra de sangre de la misma persona.

En la muestra de sangre se detectaron principalmente metadona y una pequeña fracción de 2-EDDP

Tabla II. Tiempos de retención fijados ( $t_R$ ), iones de interés (target ions: Tion) y iones calificados (qualifier ions: Q1-Q3) de drogas introducidas en la biblioteca. Otras drogas pueden ser incorporadas fácilmente en la biblioteca.

Nombre del compuesto	$t_R$ (min)	Tion	Q1	Q2	Q3
3-monoacetilmorfina	23,08	327	285	162	215
7-hidroxicanabidiol	21,78	312	244	284	187
alprazolam	26,67	279	308	204	273
amobarbital	14,93	156	141	157	142
beta-codeína	22,52	299	285	291	300
bromazepam	22,08	315	58	317	236
brotizolam	24,73	394	392	207	393
canabicromeno	17,67	231	174	232	246
canabidiol	21,85	231	238	223	195
canabielsoína	22,45	205	247	147	148
isómero de la canabielsoína	22,62	205	247	147	148
canabinol	23,23	295	296	238	310
clonazepam	25,92	280	314	315	288
cocaína	20,27	182	303	304	198
delorazepam	22,25	75	304	303	305
diazepam	22,53	283	256	284	285
etilbenzofilecgonina (cocaetileno)	20,77	196	82	96	317
flunitrazepam	24,00	312	285	313	286
flurazepam	25,20	86	99	87	387
heroína	24,15	327	369	310	268
hexobarbital	16,68	221	157	155	79
metadona	19,72	72	73	57	91
impureza de la metadona	20,17	72	73	193	165
metabolito I de la metadona	18,55	277	276	262	220
metabolito de la metadona (1,4-difenil-6-metil-1,4- dihidro-pirimidin- 5-carbonitrilo)	19,82	273	196	197	230
metilendioximetanfetamina (MDMA, XTC)	12,82	177	58	186	-
N-1-metilclonazepam, IS	25,25	329	328	302	294
N-acetil- p-metoxianfetamina	15,38	121	148	105	86
nordazepam	23,13	242	241	270	269
papaverine	25,62	338	324	339	308
pentobarbital	15,23	156	141	157	155
secobarbital	15,80	168	167	195	97
temazepam	23,83	271	273	272	300
triazolam	27,42	313	315	342	238

mientras que en la orina, como se esperaba, se encontraron más compuestos relacionados con la metadona.

Como la mayoría de las drogas, una parte de la metadona es metabolizada en la fase II a su ácido glucurónico conjugado y por lo tanto, tiene que ser liberado antes del análisis. Es por eso que todas las muestras son hidrolizadas enzimáticamente mediante *beta*-glucuronidasa. Esta enzima no interfiere en el análisis SBSE-TD-CGC-MS porque no es absorbida en el recubrimiento PDMS.

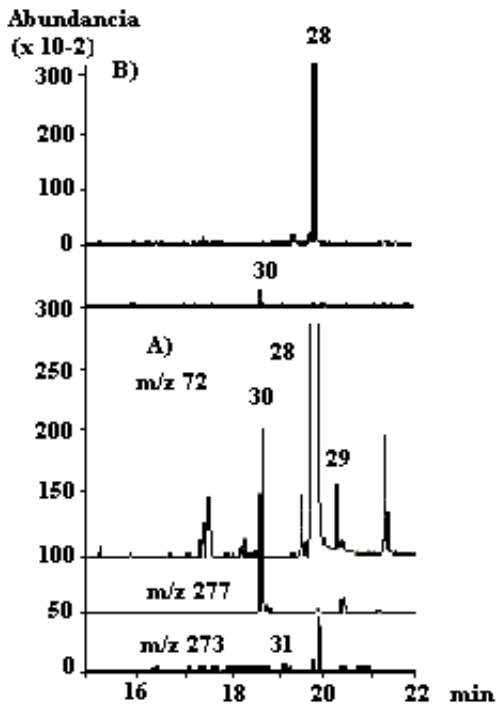


Figura 35. Cromatogramas iónicos extraídos a  $m/z$  72, 273, 277 del análisis SBSE-TD-CGC-MS de metadona (28), 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (metabolito I, (30), 1,4-difenil-6-metil-1,4-dihidropirimidin-5-carbonitrilo (31) y una impureza de metadona (29), respectivamente en la (A) orina y (B) sangre de un adicto a las drogas.

10. ANÁLISIS DE BARBITÚRICOS

En la Figura 36 se muestra el análisis de unos 18 barbitúricos.

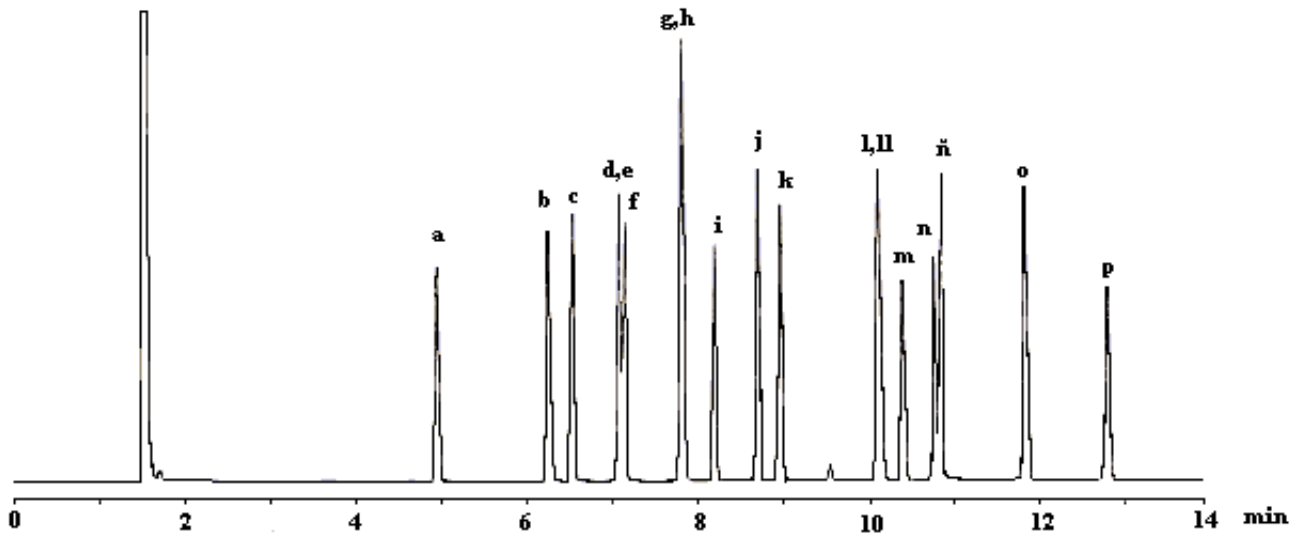


Figura 36. Cromatograma de barbituratos. Condiciones experimentales: Columna: Heliflex® AT-5 ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Temperatura: 150 °C (se mantiene 0 min) hasta 225 °C (se mantiene 2,5 min) a 6 °C/min; Carrier: Helio a 1,0 mL/min (33 cm/s); Detector: FID a 325 °C. Identificación de los picos: a. Barbital, b. Allobarbital, c. Aprobarbital, d. Butabarbital, e. Butetal, f. Butalbital, g. Amobarbital, h. Talbutal, i. Pentobarbital, j. Methohexital, k. Secobarbital, l. Hexobarbital, ll. Tiopental, m. Ciclopentobarbital, n. Mefobarbital, ñ. Tiamilal, o. Fenobarbital, p. Alfenal.

11. PROCEDIMIENTOS GENERALES EN CLÍNICA FORENSE

Se utilizó un método mejorado de extracción en fase sólida para el análisis sistemático toxicológico en fluidos biológicos (130). Por este método se determinaron cuali y cuantitativamente en forma simultánea drogas de abuso (opiatos, cocaína o anfetaminas) y drogas de prescripción médica (antidepresivos tricíclicos, fenotiazinas, benzodiazepinas, etc.) en sangre, orina, bilis y contenido gástrico. Para ello, se hizo la extracción en fase sólida con columnas Bond-Elut seguida de CG-EM con detector de N/P y confirmación mediante CG-EM después de derivatizar en los casos en que resultara necesario. Todas las muestras estuvieron sometidas a un pretratamiento de sonicación durante 15 min plus hidrólisis enzimática con beta-glucuronidasa en orina. Respecto a los estándares, se usó nalorfina y trihexilamina para sustancias básicas, allobarbital para drogas ácidas y prazepam para las benzodiazepinas.

Se desarrolló un método para la determinación cuali y cuantitativa de parafenilendiamina en líquidos biológicos (sangre, orina y contenido gástrico). El procedimiento analítico involucra desproteización o hidrólisis, extracción líquido-líquido, derivatización con TFA seguida de análisis por CG-EM con trampa iónica (131). Se usó bencidina como estándar interno para la cuantificación y la recuperación de la extracción fue de un 85%, el límite de detección para la parafenilendiamina se determinó en 0,1 pg (S/N = 10).

Se usó SPME a alta temperatura combinado con CG-EM y SPME/CG-EM para la detección de drogas (132-135). También se usó HS-SPME (136). Se descri-

bieron nuevas tendencias en la preparación de muestras para el análisis clínico y farmacéutico (137). Se efectuó la detección simultánea de algunas drogas de abuso en muestras de saliva mediante la técnica SPME (138). Se usó SPME/CG para la determinación de solventes residuales en productos farmacéuticos (139). Se dieron detalles prácticos para preparar muestras de plasma para el análisis de drogas usando SPME (140). Se desarrolló SPME automático en tubo/CL-EM para el análisis de drogas (141).

Se desarrolló un procedimiento rápido de análisis basado en HS-SPME y CG-EM para la detección de un gran número de drogas recreacionales en pelo (142) y con CG-EM *tandem* (143). También se usó microextracción en fase sólida en toxicología forense (144) y para determinar impurezas en el proceso farmacéutico con CG (145). CG con detección dual de EM y específico para nitrógeno y fósforo fue sugerida para el análisis de drogas básicas en sangre humana (146). Se determinó etanol en sangre y orina humanos mediante HS-SPME y CG capilar (147).

Se realizó el control de drogas y metabolitos en sangre entera mediante SPME con acceso restringido acoplada con CL-EM (148).

#### *Huellas dactilares en la práctica forense*

Se exploró computacionalmente el diseño de análogos de ninhidrina para el desarrollo de huellas dactilares latentes (149). La ninhidrina resultó algo mejor que la benzo[f]ninhidrina en la detección de huellas dactilares (150). Se estudió el desarrollo de un reactivo lipídico fluorescente en un paso, que involucra quelatos de europio, como un método adecuado para detectar huellas dactilares latentes (151). También se aplicó el depósito de metales al vacío al desarrollo de huellas dactilares latentes (152).

Se hizo una revisión de reveladores físicos de plata para la visualización de huellas latentes sobre papel (153) (154), y se evaluó la capacidad de 1,2-indandiona y 5,6-dimetoxi-1,2-indandiona para detectar huellas latentes sobre superficies porosas (155).

#### *Análisis forenses de pelos y material orgánico*

Se examinaron los cambios *post-mortem* en el pelo (156), caracterizando los componentes de la tintura capilar mediante CG-EM (157).

La microextracción en fase sólida resultó ser un método no caro, rápido y sensible para el análisis de varias muestras forenses (144). Se usó EM con ionización en electrospray (*electrospray ionization*: ESI) y MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*)-EM para examinar la evidencia espermática en la investigación de un asalto sexual (158). El análisis forense de materiales orgánicos en el suelo mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) resul-

tó ser una técnica analítica de valor en investigaciones forenses (159).

#### *Dietilamida del ácido lisérgico* (Lysergic Acid Diethylamide: LSD)

Se analizó la acción y la detección de LSD (160). Así, LSD se determinó en orina usando SPE y CG-EM-EM (161), HPLC-EM con dilución isotópica (*isotopic dilution mass spectrometry*: IDMS) (162), y CG-EM-EM con trampa iónica (163). LSD fue identificada en sangre y fluidos biológicos usando métodos de CL/ESI-EM (164), HPLC con detección fluorescente (165), ELISA (166), y EM (167). LSD fue analizada en fluidos biológicos y pelos usando extracción por inmunoespecificidad y HPLC con detección fluorescente (168).

#### *Gamma-Hidroxibutirato* (GHB)

Se describió un nuevo ensayo de microcristal para la detección de GHB (169). GHB fue analizado en fluidos biológicos mediante HSGC/FID y CG-EM (170), SPE, extracción líquido-líquido, derivatización mediante sililación y CG-EM (171), extracción líquido-líquido, derivatización mediante di-TMS y CG-EM (172), extracción líquido-líquido, derivatización mediante BSTFA y TCMS, y CG-EM (173). Se registraron niveles elevados de GHB en sangre tratada con *buffer* citrato (174). Se informó la prevalencia de drogas, incluyendo GHB y flunitrazepam, usadas en casos de alegatos de asalto sexual (175). Se analizó el ácido *gamma*-hidroxibutírico en muestras de agua y de bebidas sembradas usando SPME sobre derivatización en fibra/CG-EM (176). También se determinó este ácido en orina humana mediante electroforesis capilar con detección UV indirecta y se confirmó con EM con ionización de electrospray con trampa iónica (177).

#### *Otras drogas y venenos*

Se discutió la discriminación cromatográfica y espectrométrica de fentanilo y sus 24 análogos (178). Se evaluaron tres inmunoensayos enzimáticos no-radioactivos en *microtiter* platos para la detección de fentanilo en suero (179). Psilocina fue detectada en fluidos corporales usando hidrólisis, REMEDI HS, y CG-EM después de sililar con MSTFA (180). Se desarrolló un nuevo método para un análisis rápido de psilocibina y/o psilocina en material fúngico usando espectrometría de movilidad iónica (181). Se analizaron extractos metanólicos de varios hongos buscando psilocina y psilocibina mediante TLC y CG-EM (182).

Se desarrolló un método para preparar estándares de carboxihemoglobina, que resultaron estables por más de cuatro meses (183). Para analizar materiales de autopsias se desarrolló un método de CG *headspace*-EM automático para análisis de rutina de carboxihemoglo-

bina (184). El cianuro fue determinado en fluidos biológicos espectrofotométricamente mediante la adición de un ácido fuerte y la reacción específica con hidroxocobalamina para dar cianocobalamina (185).

*L*-dopa y *L*-dopamina fueron determinados recientemente en soluciones acuosas usando SPME en *loop* acoplado con CL (186). Se estudió la unión de ligando-receptor usando SPME (187).

Se realizó el estudio de los perfiles característicos de las emanaciones de la piel de brazo humano usando SPME-CG-EM (188) y se compararon con la misma tecnología los compuestos orgánicos volátiles presentes en el olor humano (189). Se estudió el impacto de las concentraciones de las sustancias inspiradas sobre los resultados del análisis de la respiración en pacientes ventilados mecánicamente (190).

Se analizaron los inhibidores de la recaptación selectiva de serotonina en muestras de orina usando SPME/CG-EM (191).

Se determinaron cuantitativamente nicotina y cortina en orina y esputo usando SPME/CG-EM (192), los aminoácidos en muestras de sangre neonatal en base a la derivatización con cloroformiato de isobutilo seguido por SPME/CG-EM (193), mentol en plasma y orina de ratas y humanos mediante HS-SPME/CG-EM (194) y metil-paratión en muestras humanas *post-mortem* por HS-SPME/CG (195). La SPME automática en tubo se usó para estudiar el metabolismo de verapamil (196) y para el análisis de disruptores endócrinos en soluciones de medicinas líquidas y de inyección intravenosa con posterior HPLC (197).

Se usó SPME acoplada con espectrometría de movilidad iónica para el análisis de efedrina en orina (198), se ensayó la estabilidad y la concentración libre y total de clorexidina en saliva mediante SPME (199). En cambio, camptotecina y 10-hidroxycamptotecina se determinaron en plasma humano usando SPME con polímero monolítico en tubo (200).

## Conclusiones

Los fluidos biológicos pueden considerarse entre las muestras más 'sucias' y/o complejas debido a la gran cantidad de compuestos desconocidos que pueden contener. En consecuencia, generalmente requieren la implementación de todos los pasos de un pretratamiento.

La determinación de drogas en fluidos biológicos es requerida para los estudios farmacocinéticos y de bioaccesibilidad, para determinar los niveles de sobredosis o *screening* de drogas de abuso. Las mediciones se enfocan a determinar la concentración de la droga libre, que es la forma activa metabólicamente.

Los sistemas de flujo continuo, de baja presión, incorporando SPE, permiten el procesado directo de

muestras no-tratadas dentro de matrices simples, tales como agua u orina, y algunas muestras sólidas tales como suelos incluyendo pasos adicionales de pretratamiento. Para las muestras más complejas (ejemplo: alimentos, suero, plasma, etc.), se requiere poco tratamiento (extracción líquido-líquido, precipitación de proteínas) antes de CF-SPE. La mayor ventaja de esto es la menor participación humana en las operaciones preliminares al proceso analítico, las cuales están, además, muy simplificadas.

El análisis de drogas es una parte importante del trabajo toxicológico. La orina, en particular, es una excelente muestra a usar para este propósito porque casi todas las drogas o sus metabolitos son excretados y concentrados en orina.

En este trabajo se dieron ejemplos varios de preparación de muestras para el análisis confirmatorio de drogas de abuso, tales como: anfetaminas, opiatos, barbituratos, cocaína y metabolitos, benzodiazepinas, metadona y otros; los principales métodos seleccionados de pretratamiento consistieron en extracción en fase sólida con diferentes sorbentes y microextracción en fase sólida con fibra de polidimetilsiloxano.

## AGRADECIMIENTOS

Al CONICET y a la Universidad de Buenos Aires por el apoyo económico.

A los representantes de Alltech, Agilent, Waters, Supelco, Oasis, en Argentina por la bibliografía de sus respectivas empresas, referida al tema expuesto.

## CORRESPONDENCIA

DR. ARTURO ALBERTO VITALE  
PROPLAME-PRHIDEB (UBA, CONICET),  
Departamento de Química Orgánica,  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN),  
Universidad de Buenos Aires (UBA),  
Pabellón 2, Ciudad Universitaria,  
C1428EHA CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES. Argentina  
E-mail: aavitale@sinectis.com.ar

DIRECCIÓN ACTUAL DRA. POMILIO:  
PRALIB, FFyB, UBA. pomilio@ffybu.uba.ar

## Referencias bibliográficas

1. United Nations International Drug Control Programme. Monograph: Recommended guidelines for quality assurance and good laboratory practices. New York: United Nations; 1995.
2. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Annual Report on the State of the Drugs Problem in the European Union, Office for Official Publications of the European Communities; 2001.



3. Collison IB, Spiehler VR, Guluzian S, Sedgwick PR. Setting cutoff concentrations for immunoassay screening of postmortem blood. *J Forensic Sci* 1998; 43: 390-4.
4. Pomilio AB. Separación de aminoácidos mediante cromatografía líquida de alta resolución. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1994; 28: 527-54.
5. Pomilio AB. Separación de aminas biogénicas mediante cromatografía líquida de alta resolución. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1995; 29: 3-36.
6. Pomilio AB. Actualización en Cromatografía Gaseosa: columnas, detectores y aplicaciones. Buenos Aires: ed IDECEFYN; 1999.
7. Pomilio AB. Actualización en Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Aplicaciones clínicas y medioambientales. Buenos Aires: IDECEFYN; 2004.
8. Vitale AA. Actualización en Electroforesis Capilar. Buenos Aires: IDECEFYN; 2004.
9. Kintz P, Mangin P. Simultaneous determination of opiates, cocaine, and major metabolites of cocaine in human hair by GC/MS. *Forensic Sci Int* 1995; 73: 93-100.
10. Gaillard Y, Pepin G. Screening and identification of drugs in hair by HPLC-photodiode-array UV detection and GC-MS after solid-phase extraction. A powerful tool in forensic medicine. *J Chromatogr A* 1997; 762: 251-67.
11. Gaillard Y, Pepin G. Evidence of polydrug use using hair analysis: a fatal case involving heroin, cocaine, cannabis, chloroform, thiopental and ketamine. *J Forensic Sci* 1998; 43: 435-8.
12. Gaillard Y, Pepin G. Testing hair for pharmaceuticals (Review). *J Chromatogr B* 1999; 733: 231-46.
13. Buchan BJ, Walsh JM, Leaverton PE. Evaluation of the accuracy of on-site multi-analyte drug testing devices in the determination of the prevalence of illicit drugs in drivers. *J Forensic Sci* 1998; 43: 395-9.
14. Kronstrand R, Grundin R, Jonsson J. Incidence of opiates, amphetamines, and cocaine in hair and blood in fatal cases of heroin overdose. *Forensic Sci Int* 1998; 92: 29-38.
15. Dussy FE, Hamberg Stäubli C, Briellmann TA. The application of LC-MS in forensic toxicology. *Chimia* 2002; 56: 53-8.
16. Chromatography Market Profile-Testing Drugs of Abuse with GC-MS (editorial). *LC-GC N Am* 2002; 20: 328.
17. Gros E, Nudelman N, Seldes A, Pomilio AB, Oberti JC, Arzeno H, *et al.* Determinación de trazas de drogas nitrogenadas en orina. *An Asoc Quím Argent* 1977; 65: 187-94.
18. Sandra P, Tienpont B, David F. Multi-residue screening of pesticides in vegetables, fruits and baby food by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2003; 1000: 299-309.
19. Tienpont B, David F, Benijts T, Sandra P. Stir bar sorptive extraction-TD-CGC-MS for profiling and target component analysis of pharmaceutical drugs in urine. *J Pharmac Biomed Anal* 2003; 32: 569-79.
20. Tienpont B, David F, Stopforth A, Sandra P. Comprehensive profiling of drugs of abuse in biological fluids by stir-bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *LC-GC Eur* 2003; 2-10.
21. Platoff GE Jr, Gere JA. Solid phase extraction of abused drugs from urine. *Forensic Sci Rev* 1991; 3: 117-33.
22. Thompson BC, Kuzmack JM, Law WD, Winslow JJ. Copolymeric solid-phase extraction for quantitating drugs of abuse in urine by wide-bore capillary gas chromatography. *Liquid Chromatogr Gas Chromatogr Int* 1990; 3: 55-8.
23. Chen XH, Wijsbeek J, Franke JP, deZeeuw RA. A single-column procedure on Bond Elut Certify for systematic toxicological analysis of drugs in plasma and urine. *J Forensic Sci* 1992; 37: 61-71.
24. Chen XH, Franke JP, Wijsbeek J, deZeeuw RA. Isolation of acidic, neutral, and basic drugs from whole blood using a single mixed-mode solid-phase extraction column. *J Anal Toxicol* 1992; 16: 351-5.
25. Pocci R, Dixit V, Dixit VM. Solid-phase extraction and GC/MS confirmation of barbiturates from human urine. *J Anal Toxicol* 1992; 16: 45-7.
26. Karnes HT, Farthing D, Besenfelder E. Solid phase extraction with automated elution and HPLC of torsemide and metabolites from plasma. *J Liquid Chromatogr* 1989; 12: 1809-18.
27. Houlihan B. Robotic extraction of cocaine and benzoylecgonine by solid phase chemistry. *Adv Lab Autom Rob* 1991; 7: 583-98.
28. Chen XH, Franke JP, Ensing K, Wijsbeek J, deZeeuw RA. Semi-automated solid-phase extraction procedure for drug screening in biological fluids using the ASPEC system in combination with clean screen DAU columns. *J Chromatogr* 1993; 613: 289-94.
29. Chen XH, Franke JP, Ensing K, Wijsbeek J, deZeeuw RA. Pitfalls and solutions in the development of a fully automated solid-phase extraction method for drug screening purposes in plasma and whole blood. *J Anal Toxicol* 1993; 17: 421-6.
30. Tippins B. Selective sample preparation of endogenous biological compounds using solid-phase extraction. *Am Biotechnol Lab* 1987; 5: 25-31.
31. Chen XH, Wijsbeek J, VanNeen J, Franke JP, deZeeuw RA. Solid-phase extraction for the screening of acidic, neutral, and basic drugs in plasma using a single-column procedure on Bond Elut Certify. *J Chromatogr* 1990; 529: 161-6.
32. Dixit V, Dixit VM. Solid-phase extraction of 11-nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid from human urine with gas chromatographic-mass spectrometric confirmation. *J Chromatogr* 1991; 567: 81-91.
33. Lillsunde P, Korte T. Comprehensive drug-screening in urine using solid-phase extraction and combined TLC and GC/MS identification. *J Anal Toxicol* 1991; 15: 71-81.
34. Majors R. An overview of sample preparation: methods for solids. *LC-GC* 1991; 9: 16.

35. Ferrara SD, Tedeschi L, Frison G, Castagna F. Solid-phase extraction of HPLC-UV confirmation of drugs of abuse in urine. *J Anal Toxicol* 1992; 16: 217-22.
36. Wu AHB, Liu N, Cho Y-J, Wong SS. Extraction and simultaneous elution and derivatization of 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol using TOXI-LAB SPEC prior to GC/MS analysis of urine. *J Anal Toxicol* 1993; 17: 215-7.
37. King JW, King LJ. Propoxyphene and norpropoxyphene quantitation in the same solid-phase extraction using TOXI-LAB Spec VC MP3 system. *J Anal Toxicol* 1994; 18: 217-9.
38. Kolb B, Ettre L. Static headspace-GC: Theory and practice. Weinheim: Wiley-VCH; 1997.
39. Pawliszyn J. Solid phase microextraction: Theory and Practice. New York: Wiley-VCH; 1998.
40. Theodoridis G, Koster EHM, de Jong GJ. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *J Chromatogr B* 2000; 745: 49-82.
41. Snow NH. Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. *J Chromatogr A* 2000; 885: 445-55.
42. Strano-Rossi S, Molaioni F, Botre F. Application of solid-phase microextraction to antidoping analysis: Determination of stimulants, narcotics, and other classes of substances excreted free in urine. *J Anal Toxicol* 2005; 29: 217-22.
43. Pawliszyn J. Applications of solid phase microextraction. RSC Chromatography Monographs. Series Editor: Smith RM. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1999.
44. Baltussen E, Sandra P, David F, Cramers CA. Stir-bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *J Microcolumn Sep* 1999; 11: 737-47.
45. Tienpont B, David F, Desmet K, Sandra P. Stir-bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry applied to biological fluids. *Anal Bioanal Chem* 2002; 373: 46-55.
46. Benijts T, Vercammen J, Dams R, Tuan HP, Lambert W, Sandra P. Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry applied to the analysis of polychlorinated biphenyls in human sperm. *J Chromatogr B* 2001; 755: 137-42.
47. Desmet K, Tienpont B, Sandra P. Analysis of 1-hydroxypyrene in urine as PAH exposure marker using in situ derivatisation stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 2003; 57: 681-6.
48. Valcárcel M, Gallego M, Cárdenas S.-GC-MS of drugs in biological fluids after automated sample pretreatment. En: Niessen W, editor. Current practice in GC-MS. New York: Marcel Dekker, Inc; 2001.
49. Cárdenas S, Gallego M, Valcárcel M. Low-pressure, continuous-flow systems for automated sample preparation. *LC-GC Europe* 2001; 14: 174-9.
50. Steinberg DM, Sokoll LJ, Bowles KC, Nichols JH, Roberts R, Schultheis SK, *et al.* Clinical evaluation of Toxi · Prep<sup>TM</sup>: a semiautomated solid-phase extraction system for screening of drugs in urine. *Clin Chem* 1997; 43: 2099-105.
51. Dietzen DJ, Ecos K, Friedman D, Beason S. Positive predictive values of abused drug immunoassays on the Beckman Synchron in a veteran population. *J Anal Toxicol* 2001; 25: 174-8.
52. Pomilio AB, Vitale AA. Métodos experimentales de laboratorio en Química Orgánica. Serie Química. Monografía no. 33. Washington DC: Organización de Estados Americanos (OEA); 1988.
53. Veress T. Determination of amphetamine by high-performance liquid chromatography after acetylation. *J Forensic Sci* 2000; 45: 161-6.
54. Reese ES, Harrington PB. The analysis of methamphetamine hydrochloride by thermal desorption ion mobility spectrometry and SIMPLISMA. *J Forensic Sci* 1999; 44: 68-76.
55. McAvoy Y, Cole MD, Gueniat O. Analysis of amphetamines by supercritical fluid chromatography, high-performance liquid chromatography, gas-chromatography and capillary zone electrophoresis; a preliminary comparison. *Forensic Sci Int* 1999; 102: 13-22.
56. Chafer-Pericas C, Campins-Falco P, Herraez-Hernandez R. Application of solid-phase microextraction combined with derivatization to the determination of amphetamines by liquid chromatography. *Anal Biochem* 2004; 333: 328-35.
57. Lee GSH, Craig DC, Kannangara GSK, Dawson M, Conn C, Robertson J, *et al.* Analysis of 3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine (MDMA) in "ecstasy" tablets by <sup>13</sup>C solid state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *J Forensic Sci* 1999; 44: 761.
58. Sondermann N, Kovar K-A. Screening experiments of ecstasy street samples using near-infrared spectroscopy. *Forensic Sci Int* 1999; 106: 147-56.
59. Kataoka H. Recent advances in solid phase microextraction and related techniques for pharmaceutical and biomedical analysis. *Curr Pharm Anal* 2005; 1: 65-84.
60. Rashed AM, Anderson RA, King LA. Solid-phase extraction for profiling of ecstasy tablets. *J Forensic Sci* 2000; 45: 413-7.
61. Poortman AJ, Lock E. Analytical profile of 4-methylthioamphetamine (4-MTA), a new street drug. *Forensic Sci Int* 1999; 100: 221-33.
62. Borth S, Hänsel W, Rösner P, Junge T. Synthesis of 2,3- and 3,4-methylenedioxy-phenylalkylamines and their regioisomeric differentiation by mass spectral analysis using GC-MS-MS. *Forensic Sci Int* 2000; 114: 139-53.
63. Namera A, Yashiki M, Liu J, Okajima K, Hara K, Imamura T, *et al.* Simple and simultaneous analysis of fenfluramine, amphetamine and methamphetamine in whole blood by GC-MS after headspace-solid phase microextraction and derivatization. *Forensic Sci Int* 2000; 109: 215-23.

64. Gentili S, Torresi A, Marsili R, Chiarotti M, Macchia T. Simultaneous detection of amphetamine-like drugs with headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2002; 780: 183-92.
65. Namera A, Yashiki M, Kojima T, Ueki M. Automated headspace solid-phase microextraction and in-matrix derivatization for the determination of amphetamine-related drugs in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr Sci* 2002; 40: 19-25.
66. Al-Dirbashi OY, Wada M, Kuroda N, Takahashi M, Nakashima K. Achiral and chiral quantification of methamphetamine in human urine by semi-micro column high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J Forensic Sci* 2000; 45: 708-14.
67. Cooper GA, Allen DL, Scott KS, Oliver JS, Ditton J, Smith ID. Hair analysis: Self-reported use of 'speed' and 'ecstasy' compared with laboratory findings. *J Forensic Sci* 2000; 45: 400-6.
68. Allen DL, Oliver JS. The use of supercritical fluid extraction for the determination of amphetamines in hair. *Forensic Sci Int* 2000; 107: 191-9.
69. McCooney MA, Mester Z, Eils B, Barnett DA, Purves RW, Guevremont R. Quantitation of amphetamine, methamphetamine, and their methylenedioxy derivatives in urine by solid-phase microextraction coupled with electrospray ionization-high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry-mass spectrometry. *Anal Chem* 2002; 74: 3071-5.
70. Koester CJ, Andresen BD, Grant PM. Optimum methamphetamine profiling with sample preparation by solid-phase microextraction. *J Forensic Sci* 2002; 47: 1002-7.
71. Huang MK, Liu CR, Huang SD. One step and highly sensitive headspace solid-phase microextraction sample preparation approach for the analysis of methamphetamine and amphetamine in human urine. *Analyst* 2002; 127: 1203-6.
72. Raikos N, Christophoulou K, Theodoridis G, Tsoukali H, Psaroulis D. Determination of amphetamines in human urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 789: 59-63.
73. Nishida M, Namera A, Yashiki M, Kojima T. Routine analysis of amphetamine and methamphetamine in biological materials by gas chromatography-mass spectrometry and on-column derivatization. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 789: 65-71.
74. Takayama N, Iio R, Tanaka S, Chinaka S, Hayakawa K. Analysis of methamphetamine and its metabolites in hair. *Biomed Chromatogr* 2003; 17: 74-82.
75. Chou CC, Lee MR. Solid phase microextraction with liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for analysis of amphetamine and methamphetamine in serum. *Anal Chim Acta* 2005; 538: 49-56.
76. Supelco. Solid Phase Microextraction/Capillary GC Analysis of Drugs, Alcohols, and Organic Solvents in Biological Fluids. Bulletin 901, T196901A. USA: Sigma-Aldrich Co; 1999.
77. Olsen KM, Gulliksen M, Christophersen AS. Metabolites of chlorpromazine and brompheniramine may cause false-positive urine amphetamine results with monoclonal EMIT d.a.u. immunoassay. *Clin Chem* 1992; 38: 611-2.
78. Nagasawa N, Yashiki M, Iwasaki Y, Hara K, Kojima T. Rapid analysis of amphetamines in blood using headspace-solid phase microextraction and selected ion monitoring. *Forensic Sci Int* 1996; 78: 95-102.
79. Queiroz MEC, Lanças FM. Practical tips on preparing plasma samples for drug analysis using solid-phase microextraction. *LC-GC Europe* 2005; 18: 145-54.
80. Chia KJ, Huang SD. Simultaneous derivatization and extraction of amphetamine-like drugs in urine with headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2005; 539: 49-54.
81. Supelco. A practical guide to quantitation with solid phase microextraction. Bulletin 929, T101929. Bellefonte: PA: Supelco; 2001.
82. Kraner JC, McCoy DJ, Evans MA, Sweeney BJ. Fatalities caused by the MDMA-related drug paramethoxyamphetamine (PMA). *J Anal Toxicol* 2001; 25: 645-8.
83. Martin TL. Three cases of fatal paramethoxyamphetamine overdose. *J Anal Toxicol* 2001; 25: 649-51.
84. ElSohly MA, Ross SA, Mehmedic Z, Ararat R, Yi B, Banahan BF III. Potency trends of delta 9-THC and other cannabinoids in confiscated marijuana from 1980-1987. *J Forensic Sci* 2000; 45: 24-30.
85. Tanaka H, Shoyama Y. Monoclonal antibody against tetrahydrocannabinolic acid distinguishes *Cannabis sativa* samples from different plant species. *Forensic Sci Int* 1999; 106: 135-46.
86. D'Asaro JA. An automated and simultaneous solid-phase extraction of delta 9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-delta 9-tetrahydrocannabinol from whole blood using Zymark RapidTrace with confirmation and quantitation by GC-EI-MS. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 289-95.
87. Chiarotti M, Costamagna L. Analysis of 11-nor-delta(9)-tetrahydrocannabinol in biological samples by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC/MS-MS). *Forensic Sci Int* 2000; 114: 1-6.
88. Weinmann W, Vogt S, Goerke R, Muller C, Bromberger A. Simultaneous determination of THC-COOH and THC-COOH glucuronide in urine samples by LC/MS/MS. *Forensic Sci Int* 2000; 113: 381-7.
89. Musshoff F, Lachenmeier DW, Kroener L, Madea B. Automated headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of cannabinoids in hair samples. *Forensic Sci Int* 2003; 133: 32-8.
90. Helma C, Kramer S, Pfabringer B, Gottmann E. Data quality in predictive Toxicology: Identification of chemical structures and calculation of chemical properties. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 1029-33.

91. Chasin AA, Midio AF. Validation of an ion-trap gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of cocaine and metabolites and cocaethylene in *post mortem* whole blood. *Forensic Sci Int* 2000; 109: 1-13.
92. Hall BJ, Parikh AR, Brodbelt JS. Aqueous phase hexylchloroformate derivatization and solid phase microextraction: determination of benzoylecgonine in urine by gas chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry. *J Forensic Sci* 1999; 44: 527-34.
93. Chiarotti M, Marsili R, Moreda-Pineiro A. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of residual solvent trapped into illicit cocaine exhibits using head-space solid-phase microextraction. *J Chromatogr B* 2002; 772: 249-56.
94. Follador MJ, Yonamine M, de Moraes Moreau RL, Silva OA *et al.* Detection of cocaine and cocaethylene in sweat by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2004; 811: 37-40.
95. Kumazawa T, Watanabe K, Sato K, Seno H, Ishii A, Suzuki O. Detection of cocaine in human urine by solid-phase microextraction and capillary gas chromatography with Nitrogen-Phosphorous detection. *Jpn J Forensic Toxicol* 1995; 13: 207-10.
96. Roy IM, Jefferies TM, Threadgill MD, Dewar GH. Analysis of cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methyl ester, ethylcocaine and norcocaine in human urine using HPLC with post-column ion-pair extraction and fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal* 1992; 10: 943-8.
97. Antonilli L, Suriano C, Grassi MC, Nencini P. Analysis of cocaethylene, benzoylecgonine and cocaine in human urine by high-performance thin layer chromatography with UV detection: a comparison with high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 2001; 751: 19-27.
98. Klemenc S. Noscopine as an adulterant in illicit heroin samples. *Forensic Sci Int* 2000; 108: 45-9.
99. Janhunen K, Cole MD. Development of a predictive model for batch membership of street samples of heroin. *Forensic Sci Int* 1999; 102: 1-11.
100. Infante F, Dominguez E, Trujillo D, Luna A. Metal contamination in illicit samples of heroin. *J Forensic Sci* 1999; 44: 110-3.
101. Hays PA, Remaud GS, Jamin E, Martin Y-L. Geographic origin of determination of heroin and cocaine using site-specific isotopic ratio deuterium NMR. *J Forensic Sci* 2000; 45: 552-62.
102. Besacier F, Chaudron-Thozet H. Chemical profiling of illicit heroin samples. *Forensic Sci Rev* 1999; 11: 105-19.
103. Gerostamoulos J, Drummer OH. Postmortem redistribution of morphine and its metabolites. *J Forensic Sci* 2000; 45: 843-5.
104. Elliott SP, Hale KA. Analysis of etorphine in post-mortem samples by HPLC with UV diode-array detection. *Forensic Sci Int* 1999; 101: 9-16.
105. Tagliaro F, Valentini R, Manetto G, Crivellente F, Carli G, Margio 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* 2000; 107: 121-8.
106. Rasanen I, Neuvonen M, Ojanpera I, Vuori E. Benzodiazepines findings in blood and urine by gas chromatography and immunoassay. *Forensic Sci Int* 2000; 112: 191-200.
107. Inoue H, Maeno Y, Iwasa M, Matoba R, Nagao M. Screening and determination of benzodiazepines in whole blood using solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 2000; 113: 367-73.
108. Yuan H, Mester Z, Lord H, Pawliszyn J. Automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of selected benzodiazepines. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 718-25.
109. De Oliveira MH, Queiroz MEC, Carvalho D, Silva SM, Lanças FM. Determination of diazepam in human plasma by solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 2005; 62: 215-9.
110. Crouch DJ, Rollins DE, Canfield DV, Andrenyak DM, Schulties JE. Quantitation of alprazolam and alpha-hydroxyalprazolam in human plasma using liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 1999; 23: 479-85.
111. McKibben T. Simple and rapid color screening tests for flunitrazepam (Rohypnol). *J Forensic Sci* 1999; 44: 396-400.
112. Raymon LP, Steele BW, Walls HC. Benzodiazepines in Miami Dade County, Florida, driving under the influence (d.u.i.) cases (1995-1998) with emphasis on Rohypnol: GC-MS confirmation, patterns of use, psychomotor impairment, and results of Florida legislation. *J Anal Toxicol* 1999; 23: 490-9.
113. ElSohly MA, Feng S, Salamone SJ, Brenneisen R. GC-MS determination of flunitrazepam and its major metabolite in whole blood and plasma. *J Anal Toxicol* 1999; 23: 468-89.
114. Elian AA. Detection of low levels of flunitrazepam and its metabolites in blood and bloodstains. *Forensic Sci Int* 1999; 101: 107-11.
115. Nguyen H, Nau DR. Rapid method for the solid-phase extraction and GC-MS analysis of flunitrazepam and its major metabolites in urine. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 37-45.
116. Walshe K, Barrett AM, Kavanagh PV, McNamara SM, Moran C, Shattock AG. A sensitive immunoassay for flunitrazepam and metabolites. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 296-9.
117. Negrusz A, Moore C, Deitermann D, Lewis D, Kaleciak K, Kronstrand R, *et al.* Highly sensitive micro-plate immunoassay screening and NCI-GC-MS confirmation of flunitrazepam and its major metabolite 7-aminoflunitrazepam in hair. *J Anal Toxicol* 1999; 23: 429-35.
118. Yuan HD, Pawliszyn J. Application of solid-phase



- microextraction in the determination of diazepam binding to human serum albumin. *Anal Chem* 2001; 73: 4410-6.
119. Zambonin CG, Aresta A. SPME-LC with UV detection to study delorazepam-serum albumin interactions. *J Pharmaceut Biomed Anal* 2002; 29: 895-900.
  120. Borrey D, Meyer E, Lambert W, Van Peteghem C, De Leenheer AP. Simultaneous determination of fifteen low-dosed benzodiazepines in human urine by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2001; 765: 187-97.
  121. Borrey D, Meyer E, Duchateau L, Lambert W, Van Peteghem C, De Leenheer A. Enzymatic hydrolysis improves the sensitivity of Emit screening for urinary benzodiazepines. *Clin Chem* 2002; 48: 2047-9.
  122. Kumazawa T, Lee X-P, Tsai M-C, Seno H, Ishii A, Sato K. Simple extraction of tricyclic antidepressants in human urine by headspace solid-phase microextraction. *Jpn J Forensic Toxicol* 1995; 13: 25-30.
  123. Jinno K, Kawazoe M, Saito Y, Takeichi T, Hayashida M. Sample preparation with fiber-in-tube solid-phase microextraction for capillary electrophoretic separation of tricyclic antidepressant drugs in human urine. *Electrophoresis* 2001; 22: 3785-90.
  124. Kumazawa T, Lee X-P, Sato K, Seno H, Ishii A, Suzuki O. Detection of ten local anaesthetics in human blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography. *Jpn J Forensic Toxicol* 1995; 13: 182-8.
  125. de Jong GJ, Koster EHM. Solid-phase micro-extraction in bioanalysis, exemplified by lidocaine determination. *Chromatographia* 2000; 52 Suppl: S12-3.
  126. Sporkert F, Pragst F. Determination of lidocaine in hair of drug fatalities by headspace solid-phase microextraction. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 316-22.
  127. van Hout MWJ, Jas V, Niederlander HAG, de Zeeuw RA, de Jong GJ. Ultra-rapid non-equilibrium solid-phase microextraction at elevated temperatures and direct coupling to mass spectrometry for the analysis of lidocaine in urine. *J Sep Sci* 2003; 26: 1563-8.
  128. Abdel-Rehim M. New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications - I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 801: 317-21.
  129. Klee MS, Blumberg LM. Theoretical and practical aspects of fast gas chromatography and method translation. *J Chromatogr Sci* 2002; 40: 234-47.
  130. Soriano T, Jurado C, Menendez M, Repetto M. Improved solid-phase extraction method for systematic toxicological analysis in biological fluids. *J Anal Toxicol* 2001; 25: 137-43.
  131. Stambouli A, Bellimam MA, El Karni N, Bouayoun T, El Bouri A. Optimization of an analytical method for detecting parafenylendiamine (PPD) by GC/MS-iontrap in biological liquids. *Forensic Sci Int* 2004; 146 Suppl: S87-92.
  132. Staerk U, Kulpmann WR. High-temperature solid-phase microextraction procedure for the detection of drugs by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2000; 745: 399-411.
  133. Ulrich S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *J Chromatogr A* 2000; 902: 167-94.
  134. Mosaddegh MH, Richardson T, Stoddart RW, McClure J. Application of solid-phase micro-extraction technology to drug screening and identification. *Ann Clin Biochem* 2001; 38 (Pt 5): 541-7.
  135. Augusto F, Valente ALP. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. *Trac-Trends Anal Chem* 2002; 21: 428-38.
  136. Mills GA, Walker V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *J Chromatogr A* 2000; 902: 267-87.
  137. Kataoka H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *Trac-Trends Anal Chem* 2003; 22: 232-44.
  138. Fucci N, De Giovanni N, Chiarotti M. Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva samples by SPME technique. *Forensic Sci Int* 2003; 134: 40-5.
  139. Legrand S, Dugay J, Vial K. Use of solid-phase microextraction coupled with gas chromatography for the determination of residual solvents in pharmaceutical products. *J Chromatogr A* 2003; 999: 195-201.
  140. Lanças FM, Queiroz MEC. Practical tips on preparing plasma samples for drug analysis using SPME. *LC-GC N Am* 2004; 22: 970-6.
  141. Kataoka H, Lord HL, Yamamoto S, Narimatsu S, Pawliszyn J. Development of automated in-tube SPME/LC/MS method for drug analysis. *J Microcolumn Sep* 2000; 12: 493-500.
  142. Gentili S, Cornetta M, Macchia T. Rapid screening procedure based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the detection of many recreational drugs in hair. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 801: 289-96.
  143. Lachenmeier DW, Kroener L, Musshoff F, Madea B. Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography and headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of drugs of abuse in hair samples. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003; 17: 472-8.
  144. Furton KG, Wang J, Hsu Y-L, Walton J, Almirall JR. The use of solid-phase microextraction-gas chromatography in forensic analysis. *J Chromatogr Sci* 2000; 38: 297-306.
  145. Frost RP, Hussain MS, Raghani AR. Determination of pharmaceutical process impurities by solid phase microextraction gas chromatography. *J Sep Sci* 2003; 26: 1097-103.
  146. Aebi B, Sturny-Jungo R, Bernhard W, Blanke R, Hirsch R. Quantitation using GC-TOF-MS: example of bromazepam. *Forensic Sci Int* 2002; 128: 84-9.
  147. De Martinis BS, Ruzzene MAM, Martin CCS. Determination of ethanol in human blood and urine by automated headspace solid-phase microextraction



- and capillary gas chromatography. *Anal Chim Acta* 2004; 522: 163-8.
148. 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* 2004; 1025: 85-92.
  149. Elber R, Frank A, Almog J. Chemical development of latent fingerprints: computational design of ninhydrin analogues. *J Forensic Sci* 2000; 45: 757-60.
  150. Almog J, Sears VG, Springer E, Hewlett DF, Walker S, Wiesner S, *et al.* Reagents for the chemical development of latent fingerprints: scope and limitations of benzo[f]ninhydrin in comparison to ninhydrin. *J Forensic Sci* 2000; 45: 538-44.
  151. Wilkinson D. A one-step fluorescent detection method for lipid fingerprints; Eh (TTA)3.2TOPO. *Forensic Sci Int* 1999; 99: 5-23.
  152. Jones N, Stoilovic M, Lennard C, Roux C. Vacuum metal deposition: Factors affecting normal and reverse development of latent fingerprints on polyethylene substrates. *Forensic Sci Int* 2001; 115: 73-88.
  153. Cantu AA. On the composition on physical developers used to visualize latent prints on paper. *Forensic Sci Rev* 2001; 13: 29-64.
  154. Almog J, Cohen Y, Azoury M, Hahn T-R. Genipin - A novel fingerprint reagent with colorimetric and fluorogenic activity. *J Forensic Sci* 2004; 49: 1-3.
  155. Roux C, Jones N, Lennard C, Stoilovic M. Evaluation of 1,2-indanedione and 5,6-dimethoxy-1,2-indanedione for the detection of latent fingerprints on porous surfaces. *J Forensic Sci* 2000; 45: 761-9.
  156. Tafaro JT. The use of microscopic *post mortem* changes in anagen hair roots to associate questioned hairs with known hairs and reconstruct events in two murder cases. *J Forensic Sci* 2000; 45: 495-9.
  157. Tanada N, Kashimura S, Kageura M, Hara K. Practical GC/MS analysis of oxidation dye components in hair fiber as a forensic investigative procedure. *J Forensic Sci* 1999; 44: 292-6.
  158. Hollenbeck TP, Siuzdak G, Blackledge RD. Electrospray and MALDI mass spectrometry in the identification of spermicides in criminal investigations. *J Forensic Sci* 1999; 44: 783-8.
  159. Cox RJ, Peterson HL, Young J, Cusik C, Espinoza EO. The forensic analysis of soil organic by FTIR. *Forensic Sci Int* 2000; 108: 107-16.
  160. Paul BD, Smith ML. LSD - An overview on drug action and detection. *Forensic Sci Rev* 1999; 11: 157-74.
  161. Reuschel SA, Eades D, Foltz RL. Recent advances in chromatographic and mass spectrometric methods for determination of LSD and its metabolites in physiological specimens. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 733: 145-59.
  162. White SA, Kidd AS, Webb KS. The determination of lysergide (LSD) in urine by high-performance liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry (IDMS). *J Forensic Sci* 1999; 44: 375-9.
  163. Sklerov JH, Kalasinsky KS, Ehorn CA. Detection of lysergic acid diethylamide (LSD) in urine by gas chromatography- ion trap tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 1999; 23: 474-8.
  164. Sklerov JH, Magluilo J.Jr, Shannon KK, Smith ML. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the detection of lysergide and a major metabolite, 2-oxo-3-hydroxy-LSD, in urine and blood. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 543-9.
  165. Bergemann D, Geier A, von Meyer L. Determination of lysergic acid diethylamide in body fluids by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection - a more sensitive method suitable for routine use. *J Forensic Sci* 1999; 44: 372-4.
  166. Kerrigan S, Brooks DE. Immunological extraction and detection of LSD in whole blood. *J Immunol Methods* 1999; 224: 11-8.
  167. Reuschel SA, Percy SE, Liu S, Eades DM, Foltz RL. Quantitative determination of LSD and a major metabolite, 2-oxo-3-hydroxy-LSD, in human urine by solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 1999; 23: 306-12.
  168. Rohrich J, Zornlein S, Becker J. Analysis of LSD in human body fluids and hair samples applying ImmunoElute columns. *Forensic Sci Int* 2000; 107: 181-90.
  169. Andera KM, Evans HK, Wojcik CM. Microchemical identification of gamma-hydroxybutyrate (GHB). *J Forensic Sci* 2000; 45: 665-8.
  170. LeBeau MA, Montgomery MA, Miller ML, Burmeister SG. Analysis of biofluids for gamma-hydroxybutyrate (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) by headspace GC-FID and GC-MS. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 421-8.
  171. McCusker RR, Paget-Wilkes H, Chronister CW, Goldberger BA. Analysis of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 1999; 23: 301-5.
  172. Couper FJ, Logan BK. Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in biological specimens by gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 1-7.
  173. Elian AA. A novel method for GHB detection in urine and its application in drug-facilitated sexual assaults. *Forensic Sci Int* 2000; 109: 183-7.
  174. LeBeau MA, Montgomery MA, Jufer RA, Miller ML. Elevated GHB in citrate-buffered blood. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 383-4.
  175. ElSohly MA, Salamone SJ. Prevalence of drugs used in cases of alleged sexual assault. *J Anal Toxicol* 1999; 23: 141-6.
  176. Meyers JE, Almirall JR. Analysis of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in spiked water and beverage samples using solid phase microextraction (SPME) on fiber derivatization/gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). *J Forensic Sci* 2005; 50: 31-6.
  177. Baldacci A, Theurillat R, Caslavská J, Pardubská H, Brenneisen R, Thormann W. Determination of gamma-hydroxybutyric acid in human urine by capillary electrophoresis with indirect UV detection and confirmation

- with electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2003; 990: 99-110.
178. Ohta H, Suzuki S, Ogasawara K. Studies on fentanyl and related compounds. IV. Chromatographic and spectrometric discrimination of fentanyl and its derivatives. *J Anal Toxicol* 1999; 23: 280-5.
  179. Kaferstein H, Sticht G. Comparison of nonradioactive microtiter plate enzyme immunoassays for the sensitive detection of fentanyl. *Forensic Sci Int* 2000; 113: 353-7.
  180. Sticht G, Kaferstein H. Detection of psilocin in body fluids. *Forensic Sci Int* 2000; 113: 403-7.
  181. Keller T, Schneider A, Regenscheit P, Dirnhofer R, Rucker T, Jaspers J, Kisser W. Analysis of psilocybin and psilocin in *Psilocybe subcubensis* Guzmán by ion mobility spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 1999; 99: 93-105.
  182. Gross ST. Detecting psychoactive drug in the developmental stages of mushrooms. *J Forensic Sci* 2000; 45: 527-37.
  183. Canfield DV, Smith M, Ritter RM, Chaturvedi AK. Preparation of carboxyhemoglobin standards and calculation of spectrophotometric quantitation constants. *J Forensic Sci* 1999; 44: 409-12.
  184. Oritani S, Zhu BL, Ishida K, Shimotouge K, Quan L, Fujita MQ, *et al.* Automated determination of carboxyhemoglobin contents in autopsy materials using head-space gas chromatography/mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 2000; 113: 375-9.
  185. Cruz-Landeria A, Lopez-Rivadulla M, Concheiro-Carro L, Fernandez-Gomez P, Tabernero-Duque MJ. A new spectrophotometric method for the toxicological diagnosis of cyanide poisoning. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 266-70.
  186. Djozan D, Amir-Zehni M. Determination of L-dopa and L-dopamine in aqueous solutions using in-loop SPME coupled with LC. *Chromatographia* 2005; 62: 127-32.
  187. Musteata FM, Pawliszyn J. Study of ligand-receptor binding using SPME: Investigation of receptor, free, and total ligand concentrations. *J Proteome Res* 2005; 4: 789-800.
  188. Zhang ZM, Cai JJ, Ruan GH, Li GK. The study of fingerprint characteristics of the emanations from human arm skin using the original sampling system by SPME-GC/MS. *J Chromatogr B* 2005; 822: 244-52.
  189. Curran AM, Rabin SI, Prada PA, Furton KG. Comparison of the volatile organic compounds present in human odor using SPME-GC/MS. *J Chem Ecol* 2005; 31: 1607-19.
  190. Schubert JK, Miekisch W, Birken T, Geiger K, Noldge-Schomburg GF. Impact of inspired substance concentrations on the results of breath analysis in mechanically ventilated patients. *Biomarkers* 2005; 10: 138-52.
  191. Salgado-Petinal C, Lamas JP, Garcia-Jares C, Llompart M, Cela R. Rapid screening of selective serotonin re-uptake inhibitors in urine samples using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2005; 382: 1351-9.
  192. Witter AE, Klinger DM, Fan X, Lam M, Mathers DT, Mabury SA. Quantitative determination of nicotine and cotinine in urine and sputum using a combined SPME-GC/MS method. *J Chem Educ* 2002; 79: 1257-60.
  193. Deng CH, Li N, Zhang XM. Rapid determination of amino acids in neonatal blood samples based on derivatization with isobutyl chloroformate followed by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 2004; 18: 2558-64.
  194. Spichiger M, Muhlbauer RC, Brenneisen R. Determination of menthol in plasma and urine of rats and humans by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2004; 799: 111-17.
  195. Tsoukali H, Raikos N, Theodoridis G, Psaroulis D. Headspace solid phase microextraction for the gas chromatographic analysis of methyl-parathion in *post-mortem* human samples. *Forensic Sci Int* 2004; 143: 127-32.
  196. Walles M, Mullett WM, Levens K, Borlak J, Wunsch G, Pawliszyn J. Verapamil drug metabolism studies by automated in-tube solid phase microextraction. *J Pharmaceut Biomed Anal* 2002; 30: 307-19.
  197. Mitani K, Narimatsu S, Izushi F, Kataoka H. Simple and rapid analysis of endocrine disruptors in liquid medicines and intravenous injection solutions by automated in-tube solid-phase microextraction/high performance liquid chromatography. *J Pharmaceut Biomed Anal* 2003; 32: 469-78.
  198. Lokhnauth JK, Snow NH. Solid phase micro-extraction coupled with ion mobility spectrometry for the analysis of ephedrine in urine. *J Sep Sci* 2005; 28: 612-8.
  199. Musteata FM, Pawliszyn J. Assay of stability, free and total concentration of chlorhexidine in saliva by solid phase microextraction. *J Pharmaceut Biomed* 2005; 37 (sp iss): 1015-24.
  200. Wen Y, Fan Y, Zhang M, Feng YQ. Determination of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in human plasma using polymer monolithic in-tube solid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2005; 382: 204-10.

Aceptado para su publicación el 23 de mayo de 2006