



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**

**Dirección de Postgrado**

**INNOVACIONES ANALÍTICAS EN SISTEMAS MINIATURIZADOS  
DE EXTRACCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE DROGAS Y  
FÁRMACOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS**

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia para optar al grado académico de  
Doctor en Ciencias y Tecnología Analítica

**POR: CARMINA BEATRIZ VEJAR VIVAR**

Profesora Guía: Dra. Claudia Mardones Peña  
Dpto. de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción, Chile

Profesor Co-Guía: Dr. Rafael Lucena Rodríguez  
Depto. de Química Analítica  
Universidad de Córdoba, España

Concepción, Chile, 2022

A mi abuelita, que esperaba este momento.

Sé que estaría orgullosa.

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría agradecer a todos quienes me acompañaron durante el desarrollo de mi tesis doctoral. En primer lugar, gracias a mis padres Ivna Vivar Muñoz e Iván Vejar Vera, quienes siempre han apoyado todos mis proyectos y me han entregado su amor incondicional. Sin ellos este trabajo no hubiese sido posible. Gracias también a toda mi familia, a mis amigos y compañeros, quienes han estado allí durante todos estos años, muchas veces desde la distancia.

También me gustaría agradecer al Departamento de Análisis Instrumental de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, especialmente a la Dra. Claudia Mardones, por guiarme con cariño y paciencia durante el desarrollo de esta tesis. Gracias por la confianza que puso en mí, permitiéndome seguir una línea de investigación que me resulta fascinante. Su apoyo, tanto académica como personalmente, han sido claves para sacar adelante este trabajo.

Gracias al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba, España, donde pude vivir una experiencia muy enriquecedora. En especial quisiera agradecer al Dr. Rafael Lucena, Rafa, quien fue un gran apoyo profesional y emocional durante mi tiempo lejos de casa.

Finalmente, gracias a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) por su apoyo al financiamiento de este trabajo mediante la Beca de Doctorado Nacional 21170443 y el proyecto FONDEQUIP 170023.

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Toxicología analítica.....	1
1.2. Metodologías bioanalíticas para el análisis toxicológico.....	2
1.3. Técnicas instrumentales en el análisis toxicológico.....	4
1.3.1. Análisis por GC-MS en toxicología.....	4
1.3.2. Uso de LC-MS en análisis toxicológico.....	5
1.3.3. Espectrometría de masas de alta resolución en el análisis toxicológico ...	8
1.4. Preparación de muestras biológicas para análisis toxicológico.....	10
1.4.1. Matrices biológicas en toxicología analítica.....	11
1.4.2. Técnicas para el tratamiento de muestras biológicas.....	13
1.5. Técnicas de preparación de muestras basadas en microextracción.....	17
1.5.1. Fundamentos de las técnicas de microextracción.....	17
1.5.2. Métodos basados en microextracción para análisis toxicológico.....	20
1.5.3. Nuevos materiales sorbentes para microextracción.....	26
1.5.4. Polidopamina como material para extracción.....	28
1.6. Estrategias para el análisis toxicológico no separativo.....	32
1.7. Referencias.....	35
CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	49
2.1. Hipótesis.....	49
2.2. Objetivo principal.....	49
2.3. Objetivos específicos.....	50
CAPÍTULO 3: ACOPLAMIENTO DIRECTO DE MEPS A ESI-QqTOF-MS PARA EL ANÁLISIS SIMULTÁNEO DE ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS Y BENZODIAZEPINAS EN SANGRE POSTMORTEM.....	51

Direct coupling of MEPS to ESI-QqTOF-MS for the simultaneous analysis of tricyclic antidepressants and benzodiazepines in postmortem blood.....	51
3.1. Introduction .....	54
3.2. Materials and methods.....	57
3.2.1. Reagents and materials.....	57
3.2.2. Postmortem blood samples .....	58
3.2.3. Direct analysis by MEPS-ESI-QqTOF.....	59
3.3. Results and discussion .....	62
3.3.1. MEPS conditions .....	62
3.3.2. Direct coupling of MEPS with MS .....	63
3.3.3. Method Validation.....	65
3.3.4. Application of the developed method .....	69
3.4. Conclusion .....	72
3.5. Acknowledgments .....	73
3.6. Supplementary information .....	74
3.6.1. Study of the MEPS material.....	74
3.6.2. UHPLC-QqTOF-MS method for MEPS sorbent selection .....	74
3.6.3. Simultaneous determination of benzodiazepines and tricyclic antidepressants by direct MEPS-MS analysis.....	76
3.7. References.....	77
<b>CAPÍTULO 4: AGUJAS HIPODÉRMICAS RECUBIERTAS CON POLIDOPAMINA COMO DISPOSITIVOS PARA MICROEXTRACCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS EN FLUÍDO ORAL POR MS/MS POR INFUSIÓN DIRECTA.....</b>	<b>81</b>
Polydopamine coated hypodermic needles as a microextraction device for the determination of tricyclic antidepressants in oral fluid by direct infusion MS/MS	81
4.1. Introduction .....	83
4.2. Experimental .....	86
4.2.1. Reagents and materials.....	86
4.2.2. Oral fluid sample collection.....	87
4.2.3. Preparation of PDA-coated hypodermic needles .....	88

4.2.4.	Microextraction procedure .....	88
4.2.5.	Direct infusion MS analysis.....	90
4.3.	Results and discussion .....	91
4.3.1.	Optimization of the coating procedure .....	91
4.3.2.	Optimization of the extraction method.....	93
4.3.3.	Method validation .....	97
4.3.4.	Application of the developed method for TCA analysis in oral fluid .....	99
4.4.	Conclusion .....	104
4.5.	Acknowledgements .....	105
4.6.	Supplementary information .....	106
4.6.1.	Multiple Reaction Monitoring (MRM) transitions for the direct infusion MS analysis .....	106
4.6.2.	Extraction procedure for the optimization of the pDA coating synthesis .....	107
4.6.3.	Optimization of the needle coating.....	107
4.6.4.	Optimization of the microextraction procedure.....	109
4.6.5.	Calibration models.....	110
4.7.	References.....	111
CAPÍTULO 5: AGUJA HIPODÉRMICA RECUBIERTA INTERNAMENTE DE POLDOPAMINA COMO DISPOSITIVO DE MICROEXTRACCIÓN Y EMISOR DE ELECTROSPRAY PARA EL ANÁLISIS DIRECTO DE DROGAS EN FLUIDO ORAL POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS AMBIENTAL .....		116
Polydopamine inner wall-coated hypodermic needle as microextraction device and electrospray emitter for the direct analysis of illicit drugs in oral fluid by ambient mass spectrometry.....		116
5.1.	Introduction .....	118
5.2.	Experimental section.....	120
5.2.1.	Reagents and samples .....	120
5.2.2.	Synthesis of polydopamine coated needles.....	121
5.2.3.	Microextraction procedure .....	121
5.2.4.	Mass spectrometry analysis.....	122
5.3.	Results and discussion .....	125

5.3.1.	Optimization of the interface .....	125
5.3.2.	Optimization of the extraction .....	127
5.3.3.	Method validation .....	129
5.3.4.	Comparison with other methods .....	130
5.4.	Conclusions .....	131
5.5.	Acknowledgements .....	135
5.6.	Supplementary information .....	136
5.6.1.	Extraction device .....	136
5.6.2.	Microextraction procedure. ....	137
5.6.3.	Calibration of the proposed interface by direct infusion of methadone standards.....	138
5.6.4.	Chemical characteristics of the target analytes.....	140
5.6.5.	Method validation .....	141
5.7.	References.....	142
CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA BASADA EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA EL SCREENING TOXICOLÓGICO DE MUESTRAS DE SANGRE <i>POSTMORTEM</i> .....		147
Metodología para el <i>screening</i> no dirigido de fármacos, drogas y sus metabolitos en muestras de sangre <i>postmortem</i> mediante UHPLC-QqTOF-MS/MS.....		147
6.1.	Introducción.....	149
6.2.	Materiales y métodos .....	151
6.2.1.	Reactivos y materiales.....	151
6.2.2.	Muestras de sangre <i>postmortem</i> .....	152
6.2.3.	Análisis instrumental.....	153
6.2.4.	Tratamiento de datos.....	154
6.2.5.	Librerías utilizadas para la identificación.....	155
6.2.6.	Validación del método y evaluación del efecto matriz .....	158
6.3.	Resultados y discusión .....	159
6.3.1.	Validación del método .....	159
6.3.2.	Efecto matriz .....	163

6.3.3. Aplicación del método.....	165
6.4. Conclusión .....	168
6.5. Agradecimientos .....	169
6.6. Referencias.....	170
CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES .....	172
PRODUCTIVIDAD Y BECAS.....	174
ANEXO: BASES PARA EL DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA BASADA EN GC-MS/MS PARA LA DETERMINACIÓN DE BENZODIAZEPINAS EN SANGRE.....	177



## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1-1. Comparación de algunos aspectos relacionados con el aislamiento y enriquecimiento de analitos mediante SPME y SPDE.
- Table 3-1. Linearity and figures of merit for studied benzodiazepines and tricyclic antidepressants.
- Table 3-2. Results for the determination of benzodiazepines and tricyclic antidepressants in postmortem blood samples.
- Table 3-S1. Precursor ions used for the analysis of each compound by direct MEPS-MS.
- Table 4-1. Figures of merit of the developed analytical method for the determination of TCAs in oral fluid.
- Table 4-2. Comparison of the sensitivity of the proposed method with other counterparts reported for the determination of tricyclic antidepressants in biofluids.
- Table 4-3. Analysis of single-blind samples using the developed strategy.
- Table 4-S1. Multiple reaction monitoring parameters for MS analyses.
- Table 4-S2. Regression results obtained for each target analyte.
- Table 5-1. Multiple reaction monitoring transitions of the three analytes and their corresponding internal standard compounds.
- Table 5-2. Validation results for the three selected analytes in the direct combination of NTME and AMS.
- Table 5-3. Comparison of the proposed method with other methods reported for the determination of drugs in oral fluid.
- Table 5-S1. Chemical characteristics of the three target drugs.

- Tabla 6-1. Información utilizada para la creación de la biblioteca interna para identificación de compuestos de relevancia toxicológica en muestras de sangre postmortem.
- Tabla 6-2. Datos de límite de identificación obtenidos para los analitos considerados en la validación del método.
- Tabla 6-3. Resultados para la repetibilidad del método a 3 niveles de concentración.
- Tabla 6-4. Resultados obtenidos para el efecto matriz, la recuperación y la eficiencia del proceso para el método desarrollado.
- Tabla 6-5. Compuestos identificados en muestras de sangre de casos forenses auténticos.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig. 1-1. Esquema del procedimiento para la preparación de muestras mediante dispositivos basados en agujas ejemplificado con MEPS.
- Fig. 1-2. Proceso utilizado para recubrir una superficie de acero inoxidable. Dopamina se oxida y se forma dopamina quinona, la cual polimeriza sobre la superficie formando 5,6-dihidroxiindol (cuadro azul) o 5,6-indolquinona (cuadro rojo). La forma de pDA del cuadro azul es la que se une a la superficie del acero.
- Fig. 3-1. Developed system for direct MEPS-ESI-QqTOF-MS analysis.
- Fig. 3-2. Study of the effect of the MEPS sorbent phase on extraction efficiency of BZDs and TCAs.
- Fig. 3-3. Extracted ion chromatogram for imipramine ( $C_{19}H_{24}N_2$   $[M+H]^+$  281.2012  $\pm$  0.01) obtained from an analyzed postmortem blood sample spiked at 250 ng mL<sup>-1</sup>. The selected area was used for quantitative analysis.
- Fig. 4-1. Image of the attachment of the PDA-coated hypodermic needle to the micropipette. This approach is used for needle conditioning and elution when a lower volume of solutions is required. For sample processing, however, the needle is attached to a 2 mL disposable plastic syringe.
- Fig. 4-2. Effect of the PDA-coating cycles on the extraction of the target analytes. The results are presented as the area under the curve (AUC) values once the MRM transition for each analyte is isolated.
- Fig. 4-3. Study of the effect of the sample extraction cycles on extraction efficiency.
- Fig. 4-4. Calibration curves obtained for each analyte by representing the analyte/IS area ratio against the concentration of the analytes. Each point represents the average of three independent measurements,

and error bars illustrate the standard deviation of the corresponding mean value.

- Fig. 4-S1. Extraction performance of needles synthesized using pDA precursor solutions with different concentration (2, 4 and 6 g/L).
- Fig. 4-S2. Study of the needle pre-treatment on the extraction capability of pDA coated needles. hypodermic needles on a 50 ng/mL solution of tricyclic antidepressants.
- Fig. 4-S3. Study of the effect of ionic strength over the extraction efficiency of pDA-coated needles. The ionic strength is expressed in salinity units (mmho/cm).
- Fig. 4-S4. Study of the effect of elution strokes on the analytical signal.
- Fig. 5-1. Manifold used for the direct MS analysis of the PDA-HNs after their use as extraction devices. The different elements and distances are specified. The needle is connected to an electric clamp and connected to a PEEK tube through which the eluent is pumped. The eluent desorbs the analytes from the PDA coating, and it is finally electrosprayed in the tip of the needle (for further details, read the text).
- Fig. 5-2. Effect of the spray voltage and flow rate on the analytical signal obtained for the direct infusion of a solution containing methadone at 50 µg/L and prepared in methanol containing 0.1% (v/v) formic acid. The peak area is obtained by the integration in a 0.6 min span of the chromatogram by triplicate.
- Fig. 5-3. Effect of the pH and the ionic strength (expressed in percentage of NaCl) on the extraction of the target analytes.
- Fig. 5-S1. Devices used for the microextraction procedure. A) Micropipette used for the needle conditioning and elution. B) Plastic syringe used for sample loading.
- Fig. 5-S2. Microextraction procedure used for the isolation of illicit drugs from oral fluid and their subsequent analysis by mass spectrometry.

- Fig. 5-S3. The panels represent three 0.6 min segments on the same chromatogram.
- Fig. 5-S4. Calibration graph obtained for the direct infusion of methadone standards (using methanol containing formic acid) in the range from 1 to 250  $\mu\text{g/L}$ .
- Fig. 5-S5. Matrix-match calibration curves were obtained by extracting blank samples spiked with the target analytes.
- Fig. 6-1. Cromatogramas de iones extraídos (EIC) para los 73 analitos incluidos en la biblioteca interna, considerando  $m/z$  de  $[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 0.01 \text{ Da}$  y una concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$  para cada solución estándar.

## GLOSARIO DE ACRÓNIMOS Y ABREVIACIONES EN INGLÉS

AMS:	<i>ambient mass spectrometry</i>
BIN:	<i>barrel in-needle</i>
C18:	<i>octadecylsilyl</i>
C8:	<i>octylsilyl</i>
CAR:	<i>carboxen</i>
DART:	<i>direct analysis in real time</i>
DDA:	<i>data dependent acquisition</i>
DIA:	<i>data independent acquisition</i>
DVB:	<i>divinylbenzene</i>
EI:	<i>electron ionization</i>
ESI:	<i>electrospray ionization</i>
FC:	<i>fast chromatography</i>
FIA:	<i>flow injection analysis</i>
FID:	<i>flame ionization detector</i>
GC:	<i>gas chromatography</i>
HPLC:	<i>high-performance liquid chromatography</i>
HR-MS:	<i>high resolution mass spectrometry</i>
HS:	<i>headspace</i>
IL:	<i>ionic liquids</i>
LC:	<i>liquid chromatography</i>
LLE:	<i>liquid-liquid extraction</i>
LOQ:	<i>limit of quantification</i>

LOD:	<i>limit of detection</i>
LR-MS:	<i>low resolution mass spectrometry</i>
MEPS:	<i>microextraction by packed sorbent</i>
MIP:	<i>molecularly imprinted polymers</i>
MRM:	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS:	<i>mass spectrometry</i>
NPS:	<i>new psychoactive substances</i>
NTD:	<i>needle-trap devices</i>
PA:	<i>polyacrylate</i>
pDA:	<i>polydopamine</i>
PDMS:	<i>polydimethylsiloxane</i>
PEG:	<i>polyethylene glycol</i>
PP:	<i>protein precipitation</i>
ppm:	<i>parts per million</i>
PPy:	<i>polypyrrole</i>
PS:	<i>polystyrene</i>
QqQ:	<i>triple quadrupole</i>
QqTOF:	<i>quadrupole-time of flight</i>
SCX:	<i>strong cation exchanger</i>
SNR:	<i>signal-to-noise ratio</i>
SPDE:	<i>solid phase dynamic extraction</i>
SPME:	<i>solid phase microextraction</i>
SPE:	<i>solid-phase extraction</i>
STA:	<i>systematic toxicological analysis</i>

TOF: *time of flight*

UHPLC: *ultra-high-performance liquid chromatography*

EIC: *extracted ion chromatogram*



## RESUMEN

La dificultad al trabajar sobre matrices biológicas y el surgimiento de nuevas drogas hacen de la toxicología un importante desafío analítico. La necesidad de reducir la complejidad y el impacto ambiental de los procesos químicos ha fomentado el desarrollo de estrategias analíticas más eficientes y sostenibles.

En esta Tesis Doctoral se desarrollaron distintas estrategias de análisis para la detección de drogas en matrices forenses, dando énfasis, principalmente, a los procesos de preparación de muestra y su acoplamiento instrumental. El primer método fue desarrollado para el análisis de antidepresivos y benzodiazepinas mediante el acoplamiento directo de un dispositivo comercial de microextracción a un espectrómetro de masas de alta resolución, con lo que fue posible reducir los tiempos de análisis y el uso de solventes orgánicos. Otros dos métodos se enfocaron en establecer las capacidades extractivas de polidopamina. Este polímero se usó como material de recubrimiento de dispositivos de microextracción en el análisis de antidepresivos y drogas de abuso en saliva mediante espectrometría de masas, sin una separación cromatográfica previa. Por último, se desarrolló un método de alta sensibilidad mediante cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución como método de “*screening*”. Su aplicación a muestras de sangre *postmortem* provenientes del Servicio Médico Legal permitió la identificación de fármacos, drogas y metabolitos de distintos grupos farmacológicos.

Estas estrategias permitieron el análisis eficiente, y relativamente sencillo, de drogas y fármacos en muestras biológicas con un enfoque más amigable con el medio ambiente.

## **ABSTRACT**

The complexity of biological matrices and the constant appearance of new drugs make toxicology a major analytical challenge. The need to increase the simplicity of the procedures and to reduce the environmental impact of chemical processes have encouraged the development of more efficient and sustainable analytical strategies.

In this PhD Thesis, different analytical strategies for the detection of drugs in forensic matrices were developed. The main emphasis was placed on sample preparation processes and their instrumental coupling. The first method was developed for the analysis of antidepressants and benzodiazepines by direct coupling of a commercial microextraction device to a high-resolution mass spectrometer, thus reducing analysis times and the use of organic solvents. Two other methods focused on establishing the extractive capabilities of polydopamine. This polymer was used as coating material for microextraction devices in the analysis of antidepressants and drugs of abuse in saliva by mass spectrometry, without a previous chromatographic separation. Finally, a highly sensitive method was developed using ultra-high efficiency liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry as a screening method. Its application to postmortem blood samples from the Forensic Medical Service of Chile allowed the identification of drugs and metabolites from different pharmacological groups.

These strategies allowed the efficient and relatively simple, analysis of drugs and pharmaceuticals in biological samples with a more environmentally friendly approach.

## **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO**

### **1.1. Toxicología analítica**

La toxicología analítica se encarga de la detección, identificación y cuantificación de diversos compuestos de interés toxicológico como fármacos, drogas y sus metabolitos, seguido de la interpretación farmacológica y toxicológica de los resultados [1]. En la mayoría de los casos, esta disciplina implica la determinación de distintos xenobióticos en diversas matrices biológicas como fluidos corporales o tejidos [2].

El análisis toxicológico es la única manera de obtener evidencia objetiva de la naturaleza y magnitud de la exposición de un individuo a uno o más compuestos potencialmente tóxicos. Esto lo convierte en una disciplina de gran importancia en sus distintas áreas de aplicación, por lo que los resultados obtenidos a partir de los procesos analíticos deben ser altamente confiables [3].

En la práctica clínica, el análisis toxicológico se realiza con el fin de poder tomar decisiones oportunas para el diagnóstico o tratamiento de un paciente que ha sufrido intoxicación o para obtener información sobre el uso o abuso de drogas [4]. Por otro lado, el análisis forense consiste en la aplicación de métodos y prácticas científicas aceptadas, en situaciones en las que los efectos adversos

de fármacos, drogas y otros compuestos químicos tengan consecuencias administrativas o médico-legales, y donde los resultados podrían llegar a ser utilizados ante la justicia. Sin embargo, resulta evidente que existe un solapamiento entre la toxicología clínica y forense en algunas situaciones de análisis *antemortem*, por lo que muchas veces las estrategias analíticas pueden ser similares en ambos casos [5].

En general, los resultados de los análisis toxicológicos tienen un gran impacto en la resolución de casos que pueden afectar la seguridad y salud públicas. Debido a ello, la obtención de datos analíticos fiables es la columna vertebral de estas disciplinas y, en consecuencia, la comunidad toxicológica ha prestado mucha atención en las últimas décadas al desarrollo de métodos alta calidad analítica [6]. Si bien el método analítico a utilizar dependerá de las circunstancias en las cuáles se realizará su aplicación, siempre será necesario que éste entregue resultados exactos y precisos cuando se utilice para el objetivo establecido [7].

## **1.2. Metodologías bioanalíticas para el análisis toxicológico**

La mayoría de los métodos bioanalíticos actuales incluyen un tratamiento de muestra de alto rendimiento y técnicas instrumentales sofisticadas que acoplan la separación y detección de los analitos, principalmente cromatografía líquida

(HPLC o UHPLC) o cromatografía de gases (GC), acopladas a espectrometría de masas (MS) [8].

Dependiendo del objetivo de la determinación, las estrategias para el análisis toxicológico pueden dividirse en métodos de *screening* y métodos confirmatorios [9]. Los métodos de *screening* se utilizan en el análisis general de compuestos desconocidos para la detección e identificación de la mayor cantidad posible de compuestos, esta estrategia se denomina “Análisis Toxicológico Sistemático” (STA) [10]. El análisis confirmatorio, por otro lado, se realiza cuando se desea establecer inequívocamente la presencia de un analito en una muestra y, muchas veces, se realiza cuando un ensayo de screening ha entregado un resultado positivo que debe ser confirmado [11].

La necesidad de un análisis confirmatorio es especialmente relevante en toxicología forense, ya que los resultados deben cumplir con ciertos requerimientos para poder ser utilizados como evidencia ante la ley. En el caso de toxicología clínica muchas veces el análisis cualitativo es suficiente, ya que su objetivo es entregar información que pueda ayudar al personal clínico a rápidamente desarrollar un plan de tratamiento adecuado para un paciente con sospecha de intoxicación [12].

Existen casos en donde es necesario establecer una relación entre las concentraciones de los analitos en la muestra y los efectos del fármaco o droga

sobre el comportamiento y el desarrollo de tareas, por ejemplo, para la conducción de un vehículo o el consentimiento sexual (toxicología conductual) [13]. Para ello, es necesario el análisis cuantitativo de una matriz adecuada y la interpretación de resultados. En estos casos, sería recomendable una preparación selectiva de la muestra, un sistema de separación optimizado y un modo de detección específico para dichos métodos, a fin de garantizar un rendimiento cuantitativo aceptable [5].

### **1.3. Técnicas instrumentales en el análisis toxicológico**

Debido a la gran cantidad de posibles analitos que podrían encontrarse presentes en una muestra biológica, se hace necesario contar con técnicas analíticas versátiles y de amplio espectro [13]. La elección de la técnica instrumental apropiada dependerá de muchos factores, entre ellos la naturaleza y la cantidad de los compuestos a analizar, el tiempo en que el resultado es requerido y el propósito para el cual se utilizará el resultado [5].

#### **1.3.1. Análisis por GC-MS en toxicología**

El análisis por GC-MS se ha utilizado desde hace varios años debido a que tiene varias ventajas, dentro de las cuales se encuentra la estandarización de las condiciones de la ionización electrónica (EI) a 70 eV que produce espectros

altamente reproducibles. Esto permite la existencia de librerías estandarizadas de espectros de masas que cuentan con información de millones de compuestos, lo que le otorga a la técnica un gran poder de identificación [14]. Otras ventajas de GC-MS, son su costo de instrumentación y operación moderados y la alta eficiencia y resolución cromatográfica de las columnas capilares, lo que permite una poderosa separación de los analitos [10].

Sin embargo, para que los compuestos puedan analizarse por GC deben ser volátiles y termoestables, por lo que en muchos casos es necesario modificar químicamente los compuestos mediante procesos de derivatización previo al análisis instrumental [15]. Este proceso implica un aumento en el tiempo y la complejidad del análisis, además de ser una gran fuente de variabilidad [10].

Debido al reducido número de compuestos que pueden detectarse por GC-MS, los avances en esta técnica no han sido muy significativos en los últimos años [16], más allá de la transición de los métodos a GC-MS/MS [17].

### 1.3.2. Uso de LC-MS en análisis toxicológico

El uso de métodos de LC (HPLC y UHPLC) para el análisis toxicológico se encuentra en aumento hace varios años y ha ido reemplazando a GC-MS. Esto se debe principalmente a su mayor versatilidad, pues cuenta con mayor cantidad de parámetros para su optimización [5]. Además, la posibilidad de analizar

compuestos no volátiles, polares y térmicamente inestables sin necesidad de derivatización implica una preparación de muestra bastante más simple [18].

En toxicología analítica se ha incorporado LC-MS para el desarrollo de métodos de *screening*, confirmatorios y cuantitativos [9]. Estas técnicas permiten a los laboratorios la inclusión de nuevos compuestos a sus librerías apenas sea necesario, ofreciéndoles una forma de mantener los métodos de *screening* actualizados a medida que las tendencias en el análisis de drogas y fármacos cambian y evolucionan [19].

Estas ventajas se ven aumentadas al utilizar sistemas de detección basados en espectrometría de masas en tándem o MS/MS, los que permiten la adquisición de los espectros de fragmentación de las moléculas de interés durante toda la separación cromatográfica [9]. Particularmente, el modo de monitoreo de reacciones múltiples (MRM), donde se estudian las transiciones específicas entre un ion precursor y algunos de sus productos, incrementa sustancialmente la sensibilidad y selectividad de los análisis [16].

Los instrumentos LC acoplados a triple cuadrupolo (QqQ) han sido ampliamente utilizados en toxicología forense y clínica para la determinación de fármacos, drogas y sus metabolitos mediante análisis dirigido [2,17]. Muchas veces estos métodos “multi-dirigidos” se usan para STA e incluyen un gran número de compuestos de interés. Como ejemplo, es posible mencionar un método por LC-



QqQ-MS/MS en modo MRM desarrollado recientemente por Al-Asmari, el cual permitió la identificación y cuantificación simultánea de 60 compuestos de interés toxicológico en sangre *postmortem*, utilizando extracción en fase sólida como preparación de la muestra y alcanzando una sensibilidad satisfactoria para todos los analitos y una adecuada exactitud de entre 95,0 y 104,1% (expresado como porcentaje de la concentración real) [20]. El uso de LC-QqQ-MS/MS en modo MRM también se aplicó para el screening toxicológico de 52 compuestos y sus metabolitos en muestras de orina, utilizando la técnica de “*dilute-and-shoot*” previa hidrólisis enzimática. La sensibilidad y eficiencia del método alcanzaron los valores recomendados para la gran mayoría de los analitos, con valores de límites de detección (LOD) entre 2 ng/mL (por ejemplo, para fentanilo y zolpidem) hasta 100 ng/L (para gabapentina). Estos resultados permitieron reemplazar el uso de pruebas de inmunoensayo en el laboratorio de rutina, sin que esto significara un aumento importante en los costos de análisis [19].

Si bien existen estos y muchos otros ejemplos en análisis toxicológico que demuestran la utilidad de LC acoplada a espectrometría de masas de baja resolución (LC-LR-MS), esta técnica presenta algunas limitaciones para su uso en métodos de *screening* de amplio rango. Aunque el análisis dirigido, por ejemplo en modo MRM, permite una detección muy sensible y selectiva, es necesario que los analitos se encuentren considerados dentro del método para poder ser detectados [21]. Esta es una desventaja de los modos de adquisición

dirigidos, ya que, aún al incluirse un gran número de compuestos en el método, toda la información de cualquier otro compuesto presente en la muestra se perderá [5].

### 1.3.3. Espectrometría de masas de alta resolución en el análisis toxicológico

Dentro de las innovaciones más relevantes en toxicología analítica en la última década, sobre todo en análisis forense, se encuentra la incorporación de la espectrometría de masas de alta resolución (HR-MS). Esto se debe, principalmente, a la alta complejidad de las muestras biológicas, lo que implica la necesidad de aumentar características como la selectividad, sensibilidad y reproducibilidad de los métodos analíticos utilizados [22].

Por otro lado, en los últimos años se ha producido la constante aparición de nuevos analitos de interés toxicológico, entre ellos las llamadas: "nuevas sustancias psicoactivas" (NPS). Estos compuestos no siempre se incluyen en los métodos toxicológicos dirigidos, principalmente porque no se suele tener mucho conocimiento sobre ellos, y, generalmente, no existen como estándares de referencia ni se encuentran caracterizados en bases de datos [21].

HR-MS es una herramienta extremadamente útil en estos casos, tanto para el screening como la confirmación de la identidad de una gran variedad de compuestos potencialmente tóxicos, lo que es particularmente desafiante debido su naturaleza desconocida [10]. Actualmente, se considera que los métodos

basados en LC-HR-MS son la mejor elección para el análisis no dirigido de compuestos desconocidos [10], lo que se debe a su alto poder de identificación junto a la relativa facilidad de desarrollo de métodos cualitativos y cuantitativos, lo que permite contar con métodos analíticos de gran flexibilidad, robustez, sensibilidad y selectividad [23].

Estos métodos permiten recolectar información de la masa exacta de los analitos, lo que hace posible aumentar la capacidad de detección del método [24]. Además, la posibilidad de realizar la adquisición de los datos de forma no dirigida permite el análisis retrospectivo de la data obtenida [25]. En estos casos no se debe perder de vista la importancia de la separación cromatográfica, sobre todo al trabajar con varios analitos y en modo *full-scan*, ya que esto permite obtener mejores espectros de masa exacta al reducir la coelución de los compuestos [2].

Actualmente, los instrumentos de HR-MS entregan una muy alta velocidad de *scan* y mejor relación señal/ruido (SNR) que los instrumentos QqQ-MS, además de no requerir una optimización del *scan*, como, por ejemplo, en MRM [22]. Los instrumentos de LC-HR-MS más comunes son los basados en tiempo de vuelo (TOF) u Orbitrap (OT). Los analizadores TOF suelen ser más utilizados en toxicología analítica, sobre todo por su menor costo. Una ventaja de TOF es su velocidad de *scan*, la que permite un buen desempeño independiente del tiempo de adquisición. En el caso de OT, su gran poder de resolución es directamente

proporcional al tiempo de adquisición, por lo que la obtención de un buen análisis implica mayor tiempo de adquisición [10].

Entre los ejemplos de uso de LC-HR en toxicología, se encuentra un estudio publicado por Grapp *et al.* en el cual se desarrolló y validó un método por HPLC-QqTOF para el *screening* de agentes psicoactivos en suero utilizando un método de análisis toxicológico sistemático por HPLC-QqTOF, con el que fue posible identificar 950 moléculas en 259 muestras reales (185 compuestos y sus metabolitos), un 240% de las identificadas por GC-MS. Para realizar la identificación inequívoca fue necesario considerar 2 o más iones fragmento para cada molécula [26]. Este, entre otros ejemplos, entregan evidencia de la utilidad de los métodos no dirigidos basados en LC-HR-MS para el análisis toxicológico.

#### **1.4. Preparación de muestras biológicas para análisis toxicológico**

En general, el análisis de xenobióticos en matrices biológicas es una actividad desafiante. [28]. Las muestras biológicas suelen ser altamente complejas, ya que pueden contener muchos interferentes como proteínas, sales y ácidos orgánicos, entre otros [29]. Por otro lado, los compuestos presentes en las muestras pueden ser numerosos y estar presentes en niveles de concentración considerablemente bajos [16]. Además, en toxicología analítica no se suele tener información sobre

los compuestos posiblemente presentes en las muestras, a diferencia de otras disciplinas como el monitoreo terapéutico de fármacos [30].

#### 1.4.1. Matrices biológicas en toxicología analítica

Generalmente, la elección de la matriz dependerá del objetivo del análisis y de la disponibilidad de la muestra. En el análisis antemortem (muestras de personas vivas), las matrices a analizar suelen incluir sangre, suero, plasma, orina, saliva y pelo, entre otras [31]. Para el análisis postmortem, también se pueden incluir muestras como humor vítreo, contenido gástrico y distintos tejidos [32].

La orina suele ser la matriz preferida para el análisis cualitativo debido a que sus concentraciones de analito son altas. Además, muchas veces es posible encontrar en ella metabolitos después de un tiempo relativamente largo desde la exposición [2]. La sangre periférica y sus derivados son las matrices preferidas para el análisis cuantitativo y para la correlación con los posibles efectos farmacológicos o toxicológicos debido a que son las menos afectadas por el fenómeno de redistribución postmortem [33].

La redistribución postmortem es el proceso responsable de los cambios en las concentraciones de drogas y fármacos a través de cuerpo luego del fallecimiento. Este fenómeno ocurre por diferentes mecanismos, entre ellos, la redistribución desde órganos que actúan como “reservorios” de xenobióticos, la autólisis celular, el movimiento de la sangre por variaciones de presión y fluidez, la

coagulación y la hemólisis, entre otros. Todo esto hace que sea prácticamente imposible comparar las concentraciones obtenidas de muestras postmortem con las esperadas en una muestra antemortem [34].

En el análisis postmortem existen situaciones en las cuales no es posible obtener muestras de sangre debido a pérdidas por trauma, hemólisis, calcinación o en cadáveres en avanzado estado de putrefacción. En ese caso se debe trabajar con las muestras que se encuentren disponibles, dependiendo del grado de descomposición. Sin embargo, muchas veces los resultados cuantitativos no serán de utilidad debido a los procesos explicados anteriormente [32].

Aunque la orina y la sangre y sus derivados se consideran como las matrices convencionales o tradicionales en análisis toxicológico clínico y forense, el uso de algunas matrices alternativas se viene revisando hace varios años [35]. Un ejemplo es el fluido oral, cuyo uso en toxicología se encuentra bien establecido [36]. Dentro de las ventajas del uso de saliva con respecto a las matrices convencionales se encuentra que su muestreo es sencillo, no-invasivo, seguro, no doloroso y evita problemas de privacidad y posible adulteración [37]. Además, esta matriz es menos compleja y tiene menor presencia de interferentes que la sangre o la orina. Sin embargo, también tiene algunas desventajas como su volumen limitado, la baja concentración presente de algunos analitos y que su composición puede verse influida por varios factores como el estado de salud del

individuo, el ritmo circadiano, su edad, género, uso de fármacos, alimentación, hábitos de fumar, entre otros [35].

Debe considerarse que la elección del dispositivo para recolectar la muestra es importante, ya que algunos polímeros pueden atrapar los analitos, disminuyendo su concentración en la muestra. También se han descrito cambios en el efecto matriz al utilizar diferentes dispositivos de recolección de muestras, lo que es indicativo de que la presencia de impurezas puede resultar en problemas de ionización en LC-MS [38].

A pesar de estas desventajas, actualmente se considera el fluido oral como una de las mejores matrices alternativas para establecer la exposición, por ejemplo, a sustancias psicoactivas [35]. Incluso, se ha utilizado fluido de la cavidad oral en el análisis postmortem de drogas, lo que resulta particularmente útil cuando la obtención de otras matrices se ve limitada [39].

#### 1.4.2. Técnicas para el tratamiento de muestras biológicas

A pesar de los grandes avances en la instrumentación analítica, las matrices muy complejas siguen siendo incompatibles con el análisis instrumental directo, por lo que preparación de muestras se mantiene como una etapa crítica del proceso analítico [27]. La obtención de un extracto adecuado es esencial para el proceso analítico, ya que permite mejorar la sensibilidad y selectividad del análisis al

reducir el efecto interferente de la matriz [6], además de proteger al instrumento de la contaminación y el deterioro prematuro [41].

La preparación de la muestra incluye la extracción, aislamiento y/o preconcentración de los analitos desde la matriz, haciéndolos más aptos para ser separados y detectados por el instrumento [28]. En bioanálisis se considera que el tratamiento de la muestra es la etapa más laboriosa del proceso y la que más tiempo consume [29]. Por ello, la elección de la técnica debe hacerse cuidadosamente, siempre considerando el objetivo del análisis. Por ejemplo, en el caso del análisis no dirigido para *screening* de compuestos desconocidos, la extracción debería ser sencilla y lo menos selectiva posible para poder extraer una gran cantidad y variedad de compuestos [2]. En el análisis cuantitativo, debido a que es necesario aumentar la sensibilidad de la determinación, el tratamiento de muestra debiese incluir una extracción altamente selectiva [30], considerando las características estructurales y las propiedades fisicoquímicas de los analitos y de las fases extractantes [31].

En general, la complejidad de la preparación de la muestra depende de la naturaleza de la matriz, la naturaleza de los compuestos a analizar, el método de separación y el método de detección usados [32]. Una preparación de muestra ideal debería ser rápida y sencilla de emplear, tener la menor cantidad de pasos posibles, ser económica, amigable con el medio ambiente y compatible con distintos instrumentos analíticos [33], sin embargo, esto no es siempre posible.



Las técnicas clásicas de preparación de muestras más comunes en bioanálisis son: extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE), precipitación de proteínas (PP) y la simple dilución de la muestra [33]. Todas estas corresponden a técnicas exhaustivas, es decir, la relación entre el volumen de fase extractante y la muestra es elevada, lo que permite garantizar una transferencia cuantitativa eficiente del analito y una alta sensibilidad para su detección [34].

La simple dilución seguida de la inyección directa de la muestra diluida, o “*dilute-and-shoot*”, es la estrategia más simple para la preparación de la muestra. Ésta consiste en la dilución de la muestra con matriz, agua o fase móvil, y su introducción directa en el instrumento. Si bien esta técnica permite ahorrar costos y tiempo de análisis, sólo puede utilizarse en matrices sencillas, ya que la presencia de interferentes de la matriz puede tener un efecto indeseado sobre la determinación de los analitos, principalmente por problemas de supresión iónica en LC-MS [35].

Para reducir el efecto matriz en muestras altamente complejas como sangre, plasma y otros tejidos, es necesario un paso de extracción de los analitos y de *clean-up* o “limpieza” de la muestra antes del análisis instrumental [36]. PP suele ser una técnica apropiada para el análisis toxicológico de muestras de sangre y sus derivados ya que es simple, rápida, económica y permite alcanzar mayor sensibilidad que la simple dilución [2]. Generalmente, se agrega un volumen de

solvente orgánico (acetonitrilo o metanol) a la muestra para precipitar las proteínas, seguido de centrifugación para sedimentarlas [37]. Sin embargo, PP no es capaz de eliminar completamente el efecto matriz, ya que la presencia de otros componentes endógenos, como sales y fosfolípidos, puede ser causa de supresión iónica en LC-MS, la que además aumenta cuando la concentración de los analitos es baja [8]. De todas maneras, muchas veces es necesario priorizar la rapidez y simplicidad del método, por lo que PP sigue siendo una alternativa muy utilizada en el screening cualitativo de muestras de sangre [5]. Además, la sensibilidad de las técnicas instrumentales modernas ha permitido disminuir el volumen de matriz solvente requeridos para PP, por lo que en algunos casos incluso se ha clasificado como una microextracción [38].

Cuando se requiere mayor selectividad, se pueden utilizar métodos de extracción basados en LLE o SPE, sin embargo, estas técnicas tienen varias limitaciones, entre ellas la necesidad de protocolos complejos, un alto consumo de tiempo y recursos, y dificultades para su automatización [39]. A pesar de que ambos métodos son reproducibles y permiten obtener una buena sensibilidad y recuperación, tienen como desventaja el uso de elevados volúmenes de muestra y solventes tóxicos, por lo que no cumplen con los principios de la química analítica sostenible. Debido a esto, los métodos clásicos se han ido reemplazando por otros miniaturizados y de menor impacto ambiental [40].

## **1.5. Técnicas de preparación de muestras basadas en microextracción**

La necesidad de mejorar la eficiencia de los procesos de preparación de muestras ha significado grandes avances en el desarrollo de nuevos procedimientos de extracción [41]. Dentro de los esfuerzos realizados para simplificar estos procesos se incluyen la miniaturización del dispositivo de extracción, reducción o eliminación del uso de solventes tóxicos, eliminación de pasos del tratamiento de muestra, reducción del volumen de muestra requerido, reducción del tiempo de equilibrio de la extracción, etc. [42]. Estas estrategias van en línea con los principios de la química analítica sostenible o “verde”, los que buscan disminuir el impacto ambiental del trabajo en el laboratorio y reducir el riesgo para los analistas [43].

### 1.5.1. Fundamentos de las técnicas de microextracción

En los últimos años distintas técnicas de microextracción se han introducido al bioanálisis [44], siendo las más utilizadas las que se basan en el uso de materiales sorbentes, ya que disminuyen considerablemente el gasto de solventes orgánicos [45]. La microextracción en fase sólida o SPME, es la técnica de microextracción basada en sorbente más utilizada [44,46]. En SPME se utiliza un recubrimiento adsorbente sobre una fibra inerte; esta fase extractante puede ser un material líquido (polímero) o sólido. La fibra recubierta es inmersa directamente en la muestra o en su espacio de cabeza (HS) [8]. Luego y los

analitos extraídos y concentrados en el sorbente son eluidos con solvente o desorbidos por efecto de la temperatura [42].

Comúnmente se considera a SPME como una miniaturización de SPE que integra las etapas de muestreo, preconcentración y extracción de los analitos [29]. Sin embargo, a diferencia de la última, esta técnica no es exhaustiva. Esto quiere decir que el proceso de transferencia de masa se basa en el equilibrio de partición de los analitos entre la matriz y la fase de extracción. Si suponemos un extractante (e) de volumen  $V_e$  que es expuesto a una muestra de volumen  $V_s$  con una concentración de analito inicial de  $C_s^0$  por un periodo de tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio, la cantidad extraída por el extractante puede determinarse mediante la siguiente ecuación:

$$(ec. 1-1) \quad n_e^{eq} = \frac{K_{es}V_eV_s}{K_{es}V_e+V_s} C_s^0$$

donde  $K_{es}$  ( $= C_e^{eq}/C_s^{eq}$ ) es el coeficiente de partición o de distribución utilizado en SPME y se define como la relación entre la concentración de analito en el extractante ( $C_e^{eq}$ ) y en la matriz de la muestra ( $C_s^{eq}$ ), en condiciones de equilibrio.

Además de la cantidad de analito extraído por el método, otros dos parámetros esenciales en la descripción cuantitativa de los procesos de microextracción son la eficacia de extracción del método o recuperación ( $R$ ) y el factor de enriquecimiento ( $E$ ), que pueden describirse como sigue:

$$(ec. 1-2) \quad R(\%) = \frac{n_e^{eq}}{n_s^0} \times 100$$

donde  $n_s^0$  es la cantidad inicial de analitos en la muestra. Combinando la ecuación 1 y la ecuación 2 y, suponiendo que la relación de volumen del extractante con respecto a la muestra ( $V_e/V_s$ ) está representada por  $\varphi$ ,

$$(ec. 1-3) \quad R(\%) = \frac{K_{es}}{K_{es} + \varphi^{-1}} \times 100$$

El factor de enriquecimiento ( $E$ ) puede definirse como:

$$(ec. 1-4) \quad E = \frac{c_e^{eq}}{c_s^0} = \frac{n_e^{eq}}{n_s^0} \times \frac{V_s}{V_e}$$

Finalmente, combinando las ecuaciones 3 y 4:

$$(ec. 1-5) \quad E = \frac{R}{\varphi}$$

Como se puede observar, la recuperación no sólo depende del coeficiente de partición del analito, sino también de la proporción entre las fases ( $\varphi$ ). Debido a que en microextracción esta relación es muy pequeña, la recuperación suele ser bastante baja, sin embargo, en muchos casos esto no afecta su aplicación. Esto, debido a la posibilidad de utilizar métodos en los cuales es posible inyectar todo el analito extraído por la fase extractante en el sistema de detección, lo que no es posible para las técnicas de extracción exhaustivas. Esto quiere decir que, aún

utilizando pequeñas cantidades de fase sorbente, es posible obtener una alta sensibilidad en la detección del analito [34].

Las principales ventajas de esta técnica son su simplicidad, su rapidez, la reducción de los volúmenes de solvente necesarios y la alta sensibilidad que se alcanza mediante su uso. Debido a esto, esta técnica de preparación de muestras es una herramienta útil en toxicología forense y analítica en general [47].

#### 1.5.2. Métodos basados en microextracción para análisis toxicológico

Existen distintos métodos basados en SPME, los que se pueden clasificar, a grandes rasgos, como métodos pasivos o estáticos (*static in-vessel microextraction*), donde los analitos se extraen desde un vial mediante exposición a la muestra de un dispositivo recubierto externamente de fase extractante, y dinámicos (*dynamic in-flow microextraction*), donde la muestra se hace fluir a través de la fase estacionaria para la extracción de los analitos [48], lo que permite alcanzar el equilibrio de extracción en un tiempo menor, en comparación con los métodos estáticos [49].

El método estático más común es SPME en fibra, sin embargo, existen otras configuraciones, varias de las cuales se han utilizado para el análisis toxicológico de muestras forenses. Por ejemplo, la determinación simultánea de cocaína y sus metabolitos en plasma fue posible utilizando un nuevo formato de fibra en puntas recubiertas con C18 biocompatible, disponibles comercialmente. Los extractos

obtenidos se analizaron por UHPLC-MS/MS, resultando en la adecuada cuantificación de los analitos en un rango entre 5 y 500 ng/mL , utilizando sólo 50 µL de muestra [50]. En otro trabajo publicado por Majda *et al.*, se hizo uso de la técnica de SPME por inmersión directa, también llamada DI-SPME, para el análisis rápido y eficiente de 25 drogas psicotrópicas en muestras de sangre postmortem y médula ósea, utilizando LC-TOF-MS, donde se obtuvieron valores de LOQ de entre 5,6 y 42,8 ng/mL [51]. Además de estos, existen numerosos ejemplos de aplicaciones de SPME para el análisis toxicológico de muestras biológicas, que han sido ampliamente revisados [33,47,52].

En el caso de SPME dinámica, la fase extractante se encuentra contenida dentro del dispositivo de extracción, lo que permite evitar algunos inconvenientes de SPME convencional como la fragilidad de la fibra, su reducido tiempo de vida útil, el desgaste del recubrimiento y su incompatibilidad con sorbentes orgánicos [53]. Además, la mayor cantidad de material sorbente permite aumentar su capacidad de extracción [49]. En los sistemas basados en puntas de pipeta o en agujas, como por ejemplo en microextracción por sorbente empacado o MEPS, la extracción se realiza mediante ciclos repetitivos de aspiración/dispensación, los que se pueden repetir según haga falta para llegar al equilibrio de extracción en una menor cantidad de tiempo [53].

MEPS es un ejemplo de una técnica de microextracción dinámica que actualmente se encuentra disponible comercialmente. Esta técnica consiste en

una jeringa que contiene una fase extractante empacada en un pequeño cartucho ubicado entre la aguja y el cilindro, llamado BIN, por sus siglas en inglés (*barrel-in-needle*) [47]. Al igual que en otras técnicas basadas en agujas, en MEPS la muestra líquida se hace fluir a través de la aguja con ayuda de una jeringa, causando que los analitos queden atrapados en la fase sólida extractante mediante distintos mecanismos como partición o intercambio iónico. Luego de la extracción y preconcentración de los analitos se puede agregar, de ser necesario, un paso de lavado para eliminación de interferentes. Finalmente, los analitos son desorbidos por efecto de la temperatura o de un solvente [42,44,49,54,55]. Un esquema de este proceso puede observarse en la Figura 1-1 [56].

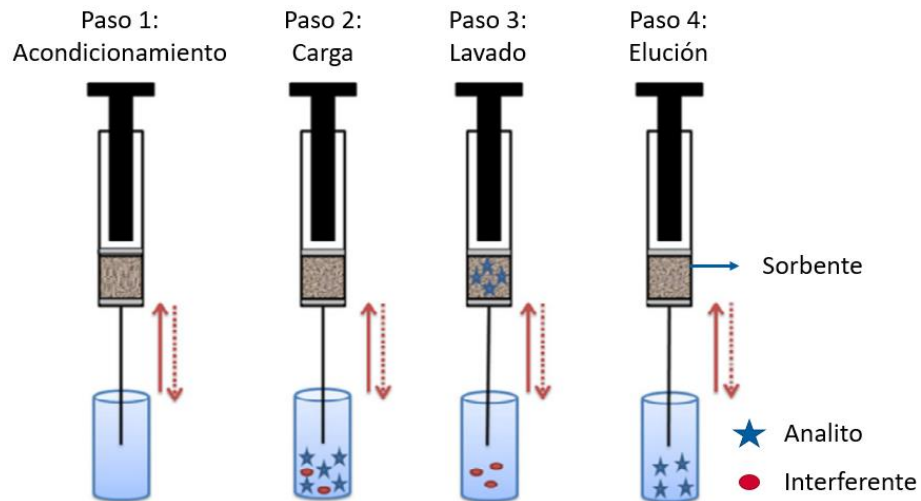


Fig. 1-1. Esquema del procedimiento para la preparación de muestras mediante dispositivos basados en agujas ejemplificado con MEPS.



MEPS se ha utilizado ampliamente en el análisis de compuestos potencialmente tóxicos en muestras biológicas. Como ejemplo es posible mencionar un trabajo realizado por Prata *et al.*, quienes realizaron la determinación de morfina, codeína y 6-monoacetilmorfina mediante GC-MS/MS en sangre completa, utilizando sólo 250 µL de muestra. Luego de la optimización de las condiciones de extracción, se realizó la derivatización de los compuestos, lo que permitió la cuantificación de todos los analitos con adecuados resultados de exactitud y precisión, obteniéndose un LOQ de 5 ng/mL [57]. Otro ejemplo relativamente reciente corresponde al análisis de nuevas drogas psicoactivas en fluido oral. En este trabajo, Rocchi *et al.* realizaron la extracción de 31 NPS de diferentes clases (catinonas y cannabinides sintéticos, feniletilaminas, piperazinas, etc.) mediante MEPS, logrando su correcta identificación y cuantificación utilizando UHPLC-MS/MS. Este método permitió obtener valores de LOQ entre 0,015 to 2,600 ng/mL para todos los analitos estudiados [58]. Por otro lado, también se ha realizado el análisis de drogas de abuso en plasma por UHPLC-MS/MS utilizando MEPS como preparación de muestra. El método desarrollado por Fernández, *et al.* permitió la determinación cuantitativa de 10 drogas y sus metabolitos con excelentes resultados en un rango lineal entre 0,5 y 500 ng/mL [59].

Dentro de las técnicas de microextracción dinámica basadas en agujas, podemos encontrar otros diseños como la extracción dinámica en fase sólida (SPDE), en la cual la fase extractante se encuentra recubriendo la superficie interna de una

aguja [40]. Estos dispositivos presentan una mayor superficie de contacto entre el sorbente y la muestra, lo que permite aumentar la sensibilidad del análisis [55]. Al igual que en el caso de MEPS, SPDE requiere un menor tiempo de análisis y una menor cantidad de muestra que SPME clásica, lo que se puede concluir de los datos presentados en la Tabla 1-1 [46].

Tabla 1-1. Comparación de algunos aspectos relacionados con el aislamiento y enriquecimiento de analitos mediante SPME y SPDE.

	<b>SPME</b>	<b>SPDE</b>
Volumen de muestra (mL)	0,5 – 20	0,1
Tipo de muestra	Gas, líquido, solido	Gas, líquido, solido
Volumen de recubrimiento (mL)	>1	0.5
Tiempo de extracción (min)	10 - 90	2 – 10
Factor de enriquecimiento	Alto	Muy alto

Algunos métodos de microextracción “en aguja”, como SPDE y dispositivos de “trampa” en aguja (NTD), se han utilizado bastante en análisis ambiental, como en muestras de agua [60] o aire [61,62], en análisis de alimentos [63], y en análisis de biomarcadores, por ejemplo en muestras de aire exhalado [64] y fluidos biológicos (plasma y orina) [65]. Sin embargo, su uso en tratamiento de muestras forenses no ha sido tan ampliamente explotado como podría suponerse,

considerando sus potencialidades de uso para esta aplicación. Un ejemplo del uso de NTD para el análisis de drogas fue recientemente publicado por Rahimpoor, *et al.*, quienes realizaron el monitoreo de concentraciones de derivados de anfetaminas en muestras de orina mediante HS-GC con detector de ionización de llama (FID). Utilizando este método, fue posible obtener valores de LOQ de entre 0,5 y 0,8  $\mu\text{g/mL}$ , lo que permitió el análisis satisfactorio de muestras reales de orina [66].

En general, comparadas con los métodos de preparación de muestras convencionales, las técnicas de microextracción basadas en agujas tienen como ventaja ser más amigables con el medio ambiente, más simples, y requerir un menor tiempo y trabajo para la extracción [49], además la forma de los dispositivos hace que los métodos sean más fácilmente automatizables y convenientes para procedimientos *on-line* [67]. Esto permite considerarlas como una buena alternativa para su uso como tratamiento de muestras biológicas.

Si bien, las agujas que se utilizan en estas técnicas son generalmente agujas para jeringas o microjeringas de tipo "*gastight*" (herméticas para gases) [49], la posibilidad de utilizar agujas jeringas desechables parece ser una buena y económica alternativa en el análisis de muestras biológicas, donde se prefieren dispositivos de un solo uso [68]. Aunque la idea de utilizar dispositivos reutilizables se puede considerar más sostenible, siempre se deben tener en cuenta las aplicaciones de la técnica para mantener su utilidad y funcionalidad,

las que se condicionan por la eficiencia, costo, velocidad y simplicidad del método, así como la seguridad del analista [69].

Es importante tener en cuenta que, si una técnica se desea implementar en formato miniaturizado, la fase extractante debe ser lo suficientemente eficiente para superar el potencial problema del bajo volumen de muestra [70]. A su vez, la reducida cantidad de sorbente disponible implica la necesidad de desarrollar materiales extractantes con una muy alta capacidad de extracción en comparación con las fases convencionales poliméricas y basadas en sílice [71].

### 1.5.3. Nuevos materiales sorbentes para microextracción

En la extracción basada en sorbente, los materiales para extracción disponibles en el mercado son limitados y no son eficaces para todos los tipos de analitos [70]. Las fases más comunes se basan en un polímero orgánico, sólido o semi-sólido, inmovilizado en un soporte como sílica o vidrio. En general, las más frecuentemente utilizadas en SPME son de polidimetilsiloxano (PDMS) solo o en mezcla con otros polímeros. Otras fases comúnmente usadas son poliacrilato (PA), divinilbenceno (DVB), polipirrol (PPY), carboxeno (CAR) y polietilenglicol (PEG) [53]. Para MEPS, las fases extractantes más utilizadas son básicamente las mismas que para SPE, entre ellas, sorbentes basados en sílica (C8, C18), intercambio catiónico fuerte (SCX), fases mixtas (C8/SCX) y poliestireno divinilbenceno (PS-DVB) [71].

La síntesis de materiales sorbentes no convencionales para la introducción de nuevas técnicas de extracción, y la modificación de las que ya existen, podría considerarse como el objetivo principal de la investigación actual en preparación de muestras [72]. El desarrollo de nuevos materiales sorbentes ha sido ampliamente estudiado con el objetivo de encontrar materiales más selectivos, con mayor capacidad de extracción, y para ampliar la disponibilidad de sorbentes más económicos y fáciles de sintetizar [45].

Como alternativa a las fases extractantes convencionales, en el último tiempo se han introducido nuevos materiales sorbentes, los que se han utilizado en diversos formatos para la preparación de muestras biológicas en el análisis de fármacos, drogas y otros xenobióticos [45,46,73–75]. Entre ellos es posible mencionar: polímeros molecularmente impresos (MIP) [76–80], líquidos iónicos (IL) [81,82], materiales basados en carbono [83,84], nanomateriales [70,84,85], polímeros sintéticos [86,87] y materiales naturales [88–90], entre otros. Muchos de estos materiales se han utilizado por sí solos o combinados, en distintos formatos de SPME, ya sea como fibras, sorbentes monolíticos, nanocompositos, recubrimiento de superficies, partículas, etc. [53,74,83–85,87,91–93]

Si bien se debe considerar que los nuevos materiales sorbentes tengan una gran capacidad de extracción, no se debe perder de vista que su síntesis debiese tener el menor impacto ambiental posible. Para ello, este proceso debería ser sencillo, tener pocos pasos y requerir la mínima cantidad de reactivos tóxicos o

contaminantes [94]. Aunque los materiales antes mencionados tengan una alta selectividad y presenten excelentes propiedades extractantes [67,74,75], en muchos casos su síntesis implica el uso de solventes y compuestos tóxicos, lo que hace contraproducente su uso desde un punto de vista medioambiental.

Con el objetivo de acercar las síntesis de nuevos materiales para microextracción a la química analítica sostenible, se han propuesto varias estrategias como el uso de materiales naturales como corcho [90] o algodón [94], el uso de polímeros reciclados [87] y el uso de materiales de síntesis sencilla y de bajo impacto ambiental, entre otras.

#### 1.5.4. Polidopamina como material para extracción

La polidopamina (pDA) es una bio-macromolécula análoga del pigmento natural eumelanina [95]. La potencialidad de pDA como recubrimiento de superficies fue descrita por primera vez por Lee *et al.* en el año 2007. En su publicación, se describe la propiedad altamente adhesiva de pDA, la cual es capaz de recubrir casi cualquier objeto sólo al sumergirlo en una solución acuosa de dopamina a un pH ligeramente básico [96].

En el método de recubrimiento más común, el sustrato se sumerge por cierto período de tiempo (generalmente algunas horas) en una solución acuosa levemente alcalina de dopamina, la cual se autooxida por acción del oxígeno formándose espontáneamente un recubrimiento nanométrico sobre la superficie

[97]. El método de oxidación en solución tampoco requiere una preparación significativa de la superficie ni una limpieza agresiva del sustrato antes de la deposición del recubrimiento [98]. Esta reacción es tan sencilla que no requiere ninguna instrumentación compleja ni condiciones de reacción extremas [99].

Sus excelentes propiedades adhesivas permiten el recubrimiento de materiales que muchas veces se consideran difíciles de modificar, como el acero inoxidable [83,91]. Éste corresponde a uno de los materiales más utilizados en procesos biomédicos, principalmente por sus buenas propiedades mecánicas, biocompatibilidad, razonable resistencia a la corrosión y bajo costo [92]. En un trabajo de Tyo, *et al.*, se usó pDA como recubrimiento para placas de acero inoxidable, las cuales son utilizadas como dispositivos para el monitoreo de patrones de migración de ballenas jorobadas, con el objetivo de hacerlas más biocompatibles y resistentes a la contaminación por microorganismos. En la Figura 1-2 se puede observar el proceso utilizado para el recubrimiento de la superficie de acero con pDA y la estructura resultante [102].

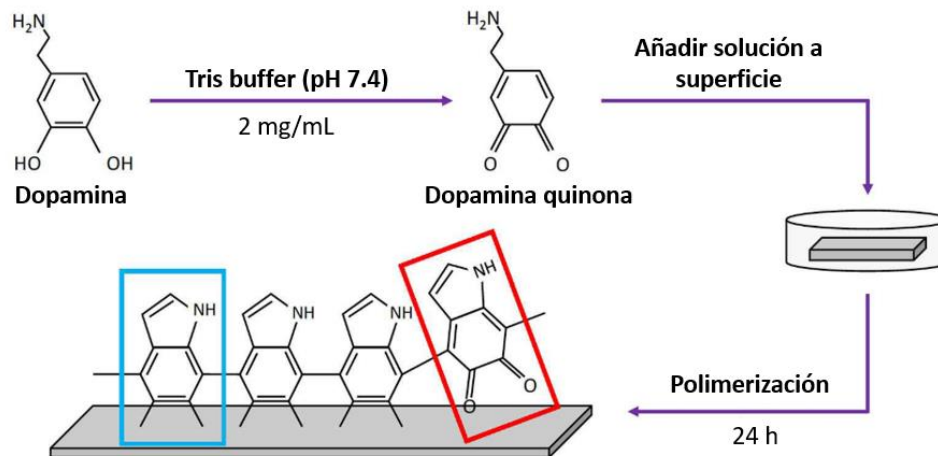


Fig. 1-2. Proceso utilizado para recubrir una superficie de acero inoxidable. Dopamina se oxida y se forma dopamina quinona, la cual polimeriza sobre la superficie formando 5,6-dihidroxiindol (cuadro azul) o 5,6-indolquinona (cuadro rojo). La forma de pDA del cuadro azul es la que se une a la superficie del acero.

En química analítica, el uso de pDA se ha enfocado en su gran capacidad como material de extracción [103]. Si bien existen muchas técnicas para la modificación química y funcionalización de superficies, muchas son útiles sólo sobre algunos sustratos específicos, requieren procesos complejos con varios pasos y/o necesitan de equipamiento costoso [104]. En ese sentido, los métodos de recubrimiento de superficies con pDA presentan muchas ventajas.

Diferentes materiales basados en este polímero se han utilizado como sorbentes en el tratamiento de muestras, por ejemplo, en análisis ambiental [103] y de alimentos [105]. Un ejemplo de su uso en bioanálisis corresponde a la extracción de antidepresivos desde muestras de orina utilizando un compuesto de pDA,



nanopartículas de plata y polipirrol, como sorbente empacado para MEPS. En este trabajo publicado por Bagheri *et al.*, fue posible la cuantificación de estos analitos con LOQs en los rangos entre 0,1 y 0,2 µg/L [106].

Las ventajas del uso de pDA como recubrimiento se basan en su conveniencia, biocompatibilidad y en el potencial para su funcionalización o modificación posterior [103]. Su preparación es relativamente económica debido a que el valor de dopamina como precursor no es particularmente elevado [98]. Sumado a esto, pDA ha demostrado tener una muy baja toxicidad aguda y tampoco interfiere con funciones fisiológicas [95]. Además, es un compuesto biodegradable, lo que es una ventaja tanto desde un punto de vista medioambiental, como de biocompatibilidad [99].

Al ser biocompatible, el uso de pDA como sorbente en sistemas de muestreo y preparación de muestras *in vivo* se presenta como una alternativa muy interesante para el análisis de muestras biológicas. Una aproximación a este tipo de análisis fue publicada por Xu *et al.*, quienes utilizaron una fibra de SPME recubierta con poliestireno (PS), pDA y glutaraldehído para el muestreo *in vivo* de fármacos en músculo de peces, obteniéndose valores de LOD de 1,1 ng/g para ácido mefenámico y 8,9 ng/g para fluoxetina [107].

## **1.6. Estrategias para el análisis toxicológico no separativo**

Dentro de los principios de la química analítica sostenible se encuentran la aplicación de técnicas de análisis directo para evitar el tratamiento de muestra, y la integración de los procesos analíticos para reducir el uso de energía y reactivos [69]. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, la mayoría de las matrices biológicas que se pueden analizar en toxicología analítica son muy complejas, por lo que es muy difícil eliminar totalmente la etapa de preparación de muestra. De todas maneras, la investigación reciente en bioanálisis se ha orientado a la reducción del impacto ambiental de sus procesos, incluyendo el acercamiento al análisis directo [108,109].

Una de las etapas que genera mayor contaminación y gasto de recursos en toxicología analítica es la separación cromatográfica [110]. Si bien los métodos para el análisis de varios compuestos requieren de la cromatografía para aumentar la sensibilidad y selectividad de la detección, las capacidades analíticas de las técnicas de MS y HR-MS actuales pueden ser suficientes para métodos cuantitativos en los cuales el análisis es dirigido sólo a un número restringido de moléculas [111].

El análisis por inyección de flujo (FIA) y la cromatografía rápida (FC) aprovechan la interfase entre la bomba de HPLC y el detector MS, pero en FIA no se utiliza columna cromatográfica [12], mientras que en FC se usa sólo el guarda-columna.

Estos métodos dependen sólo de la separación en el MS, por lo que su acoplamiento a HR-MS permite aumentar la selectividad gracias a la obtención de la masa exacta de los analitos [111]. A pesar de la rapidez de estos métodos, ambos implican el uso de solventes y requieren una preparación de muestra similar a LC [112].

Una estrategia para minimizar estas limitaciones corresponde al acoplamiento directo de la técnica instrumental con una técnica de tratamiento de muestra que permita aislar y enriquecer los analitos previo a su elución en el instrumento [113]. Esto puede realizarse mediante el uso de una interfase en la cual ocurra la elución o desorción y la ionización de los analitos de forma simultánea. Cuando esto ocurre en condiciones ambientales fuera del instrumento, se denomina *Ambient Mass Spectrometry (AMS)* [112].

Actualmente, existen muchas aproximaciones para el acoplamiento directo de la preparación de muestra con MS. Muchas de las interfases están basadas en el uso de dispositivos de extracción que también sirven como emisores de *electrospray* [114]. En la gran mayoría de los casos, se realiza una modificación química de la superficie del soporte para entregarle o aumentar su capacidad extractante [74]. Dentro de los materiales que se han usado como soporte para este tipo de análisis se encuentran papel [115], agujas [116], hilo [117], hojas de acero [118], palillos de madera [119], etc.

Sin lugar a duda, la posibilidad de poder utilizar un mismo dispositivo para la extracción y elución/ionización de los analitos es una gran ventaja en AMS, ya que implica un proceso de análisis más sencillo y conveniente [114]. Aunque su uso aún no se encuentra extendido hacia su aplicación fuera de los laboratorios de investigación, las potencialidades de la técnica son muy variadas, principalmente para el análisis clínico *in-situ*, *in-vivo* y en tiempo real [120].

A partir de todos estos antecedentes, es posible notar la relevancia del análisis toxicológico y las oportunidades analíticas que se presentan para mejorar los métodos ya existentes. Entre ellas podemos mencionar, principalmente, la posibilidad de realizar innovaciones con el objetivo de simplificar el análisis toxicológico, con el fin de disminuir los tiempos de análisis, el impacto ambiental de los procesos y los costos asociados, siempre manteniendo en primer lugar la utilidad y fiabilidad de los métodos.

## 1.7. Referencias

- [1] H.H. Maurer, Analytical Toxicology, Mol. Clin. Environ. Toxicol. 100 (2010) 317–338. [https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8338-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8338-1_9).
- [2] D. Remane, D.K. Wissenbach, F.T. Peters, Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology — An update, Clin. Biochem. 49 (2016) 1051–1071. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.07.010>.
- [3] R.J. Flanagan, A. Taylor, I.D. Watson, R. Whelpton, Fundamentals of Analytical Toxicology, 2008. <https://doi.org/10.1002/9780470516294>.
- [4] K.M. Rentsch, Knowing the unknown – State of the art of LCMS in toxicology, TrAC - Trends Anal. Chem. 84 (2016) 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.028>.
- [5] F.T. Peters, D.K. Wissenbach, F.P. Busardo, E. Marchei, S. Pichini, Method Development in Forensic Toxicology, Curr. Pharm. Des. 23 (2018). <https://doi.org/10.2174/1381612823666170622113331>.
- [6] S.M.R. Wille, S. Elliott, The Future of Analytical and Interpretative Toxicology: Where are We Going and How Do We Get There?, J. Anal. Toxicol. 45 (2021) 619–632. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa133>.
- [7] L.C. de C. Abrão, A.T. Silveira, H.D. de Faria, S.C. Machado, T.V. Mendes, R.V. Plácido, L.P. de A. Marciano, I. Martins, Toxicological analyses: analytical method validation for prevention or diagnosis, Toxicol. Mech. Methods. 31 (2021) 18–32. <https://doi.org/10.1080/15376516.2020.1839612>.
- [8] M.M. Moein, A. El Beqqali, M. Abdel-Rehim, Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 1043 (2017) 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.028>.
- [9] H. Oberacher, K. Arnhard, Current status of non-targeted liquid chromatography-tandem mass spectrometry in forensic toxicology, TrAC - Trends Anal. Chem. 84 (2016) 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.019>.
- [10] H. Oberacher, K. Arnhard, Compound identification in forensic toxicological analysis with untargeted LC-MS-based techniques, Bioanalysis. 7 (2015)

2825–2840. <https://doi.org/10.4155/bio.15.193>.

- [11] C. Yuan, D. Chen, S. Wang, Drug confirmation by mass spectrometry: Identification criteria and complicating factors, *Clin. Chim. Acta.* 438 (2015) 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.08.021>.
- [12] D. Pasin, A. Cawley, S. Bidny, S. Fu, Current applications of high-resolution mass spectrometry for the analysis of new psychoactive substances: a critical review, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 5821–5836. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0441-4>.
- [13] M.A. Martínez González, Criterios cualitativos en toxicología forense, *Rev. Esp. Med. Leg.* 38 (2012) 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.reml.2012.03.004>.
- [14] H. Chung, S. Choe, Overview of Forensic Toxicology, Yesterday, Today and in the Future, *Curr. Pharm. Des.* 23 (2018). <https://doi.org/10.2174/1381612823666170622101633>.
- [15] O.H. Drummer, Toxicology: Methods of Analysis, Antemortem, *Encycl. Forensic Leg. Med. Second Ed.* 4 (2015) 608–614. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800034-2.00379-7>.
- [16] N.G.S. Mogollón, C.D. Quiroz-Moreno, P.S. Prata, J.R. De Almeida, A.S. Cevallos, R. Torres-Guérrez, F. Augusto, New Advances in Toxicological Forensic Analysis Using Mass Spectrometry Techniques, *J. Anal. Methods Chem.* 2018 (2018). <https://doi.org/10.1155/2018/4142527>.
- [17] M. Fagiola, Current and future directions of high resolution and tandem mass spectrometry in postmortem and human performance toxicology, *Leg. Med.* 37 (2019) 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2019.02.004>.
- [18] A.T. Roemmelt, A.E. Steuer, M. Poetzsch, T. Kraemer, Liquid chromatography, in combination with a quadrupole time-of-flight instrument (LC QTOF), with sequential window acquisition of all theoretical fragmentation spectra (SWATH) acquisition: Systematic studies on its use for screenings in clinical and foren, *Anal. Chem.* 86 (2014) 11742–11749. <https://doi.org/10.1021/ac503144p>.
- [19] K.W. Kahl, J.Z. Seither, L.J. Reidy, LC-MS-MS vs ELISA: Validation of a Comprehensive Urine Toxicology Screen by LC-MS-MS and a Comparison of 100 Forensic Specimens, *J. Anal. Toxicol.* 43 (2019) 734–745. <https://doi.org/10.1093/jat/bkz066>.

- [20] A.I. Al-Asmari, Method for the identification and quantification of sixty drugs and their metabolites in postmortem whole blood using liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 309 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110193>.
- [21] M.R. Meyer, H.H. Maurer, Review: LC coupled to low- and high-resolution mass spectrometry for new psychoactive substance screening in biological matrices - Where do we stand today?, *Anal. Chim. Acta.* 927 (2016) 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.04.046>.
- [22] M.R. Meyer, A.G. Helfer, H.H. Maurer, Current position of high-resolution MS for drug quantification in clinical & forensic toxicology, *Bioanalysis.* 6 (2014) 2275–2284. <https://doi.org/10.4155/bio.14.164>.
- [23] H.H. Maurer, M.R. Meyer, High-resolution mass spectrometry in toxicology: current status and future perspectives, *Arch. Toxicol.* 90 (2016) 2161–2172. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1764-1>.
- [24] E. Jagerdeo, J.E. Schaff, Rapid screening for drugs of abuse in biological fluids by ultra high performance liquid chromatography/Orbitrap mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1027 (2016) 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.05.010>.
- [25] J.M. Colby, K.L. Thoren, K.L. Lynch, Suspect Screening Using LC-QqTOF Is a Useful Tool for Detecting Drugs in Biological Samples, *J. Anal. Toxicol.* 42 (2018) 207–213. <https://doi.org/10.1093/jat/bkx107>.
- [26] M. Grapp, C. Kaufmann, F. Streit, L. Binder, Systematic forensic toxicological analysis by liquid-chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry in serum and comparison to gas chromatography-mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 287 (2018) 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.03.039>.
- [27] M. Sajid, J. Plotka-Wasyłka, Combined extraction and microextraction techniques: Recent trends and future perspectives, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 103 (2018) 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.013>.
- [28] G. Alves, M. Rodrigues, A. Fortuna, A. Falcão, J. Queiroz, A critical review of microextraction by packed sorbent as a sample preparation approach in drug bioanalysis, *Bioanalysis.* 5 (2013) 1409–1442. <https://doi.org/10.4155/bio.13.92>.
- [29] S. Armenta, F.A. Esteve-Turrillas, S. Garrigues, M. de la Guardia, Smart materials for sample preparation in bioanalysis: A green overview, *Sustain.*

Chem. Pharm. 21 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100411>.

- [30] J.A.M. Pereira, J. Gonçalves, P. Porto-Figueira, J.A. Figueira, V. Alves, R. Perestrelo, S. Medina, J.S. Câmara, Current trends on microextraction by packed sorbent-fundamentals, application fields, innovative improvements and future applications, *Analyst*. 144 (2019) 5048–5074. <https://doi.org/10.1039/c8an02464b>.
- [31] N. Li, T. Zhang, G. Chen, J. Xu, G. Ouyang, F. Zhu, Recent advances in sample preparation techniques for quantitative detection of pharmaceuticals in biological samples, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 142 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116318>.
- [32] R.J. Flanagan, *Developing an analytical toxicology service: Principles and guidance*, 2004. <https://doi.org/10.2165/00139709-200423040-00005>.
- [33] N. Manousi, G. Raber, I. Papadoyannis, Recent advances in microextraction techniques of antipsychotics in biological fluids prior to liquid chromatography analysis, *Separations*. 4 (2017). <https://doi.org/10.3390/separations4020018>.
- [34] N. Reyes-Garcés, E. Gionfriddo, G.A. Gómez-Ríos, M.N. Alam, E. Boyacı, B. Bojko, V. Singh, J. Grandy, J. Pawliszyn, Advances in Solid Phase Microextraction and Perspective on Future Directions, *Anal. Chem.* 90 (2018) 302–360. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04502>.
- [35] F.A. Esteve-Turrillas, S. Armenta, M. de la Guardia, Sample preparation strategies for the determination of psychoactive substances in biological fluids, *J. Chromatogr. A*. 1633 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461615>.
- [36] R. Lucena, Making biosamples compatible with instrumental analysis, *J. Appl. Bioanal.* 1 (2015) 72–75. <https://doi.org/10.17145/jab.15.012>.
- [37] K.D. Clark, C. Zhang, J.L. Anderson, Sample preparation for bioanalytical and pharmaceutical analysis, *Anal. Chem.* 88 (2016) 11262–11270. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02935>.
- [38] G. de Paula Meirelles, A.L. Fabris, K. Ferreira dos Santos, J.L. Costa, M. Yonamine, Green Analytical Toxicology for the Determination of Cocaine Metabolites, *J. Anal. Toxicol.* (2022). <https://doi.org/10.1093/jat/bkac005>.
- [39] G. Navitha Reddy, A. Dilip Zagade, P. Sengupta, Current direction and advances in analytical sample extraction techniques for drugs with special



- emphasis on bioanalysis, *Bioanalysis*. 11 (2019) 313–332. <https://doi.org/10.4155/bio-2018-0144>.
- [40] G.D.O. Silveira, A.M.F. Pego, J. Pereira E Silva, M. Yonamine, Green sample preparations for the bioanalysis of drugs of abuse in complex matrices, *Bioanalysis*. 11 (2019) 295–312. <https://doi.org/10.4155/bio-2018-0208>.
- [41] N. Manousi, V. Samanidou, Green sample preparation of alternative biosamples in forensic toxicology, *Sustain. Chem. Pharm.* 20 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100388>.
- [42] A. Kabir, M. Locatelli, H.I. Ulusoy, Recent trends in microextraction techniques employed in analytical and bioanalytical sample preparation, *Separations*. 4 (2017). <https://doi.org/10.3390/separations4040036>.
- [43] R. Marcinkowska, J. Namieśnik, M. Tobiszewski, Green and equitable analytical chemistry, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 19 (2019) 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.04.003>.
- [44] X. Chen, X. Wu, T. Luan, R. Jiang, G. Ouyang, Sample preparation and instrumental methods for illicit drugs in environmental and biological samples: A review, *J. Chromatogr. A*. 1640 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461961>.
- [45] B.H. Fumes, M.R. Silva, F.N. Andrade, C.E.D. Nazario, F.M. Lanças, Recent advances and future trends in new materials for sample preparation, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 9–25. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.011>.
- [46] J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepańska, M. de la Guardia, J. Namieśnik, Miniaturized solid-phase extraction techniques, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 73 (2015) 19–38. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.026>.
- [47] C. D’ovidio, M. Bonelli, E. Rosato, A. Tartaglia, H.İ. Ulusoy, V. Samanidou, K.G. Furton, A. Kabir, I. Ali, F. Savini, M. Locatelli, U. de Grazia, Novel Applications of Microextraction Techniques Focused on Biological and Forensic Analyses, *Separations*. 9 (2022). <https://doi.org/10.3390/separations9010018>.
- [48] H. Kataoka, In-tube solid-phase microextraction: Current trends and future perspectives, *J. Chromatogr. A*. 1636 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461787>.

- [49] K. Kędziora-Koch, W. Wasiak, Needle-based extraction techniques with protected sorbent as powerful sample preparation tools to gas chromatographic analysis: Trends in application, *J. Chromatogr. A.* 1565 (2018) 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.046>.
- [50] L.D.L.F. Lizot, A.C.C. Da Silva, M.F. Bastiani, T.F. Maurer, R.Z. Hahn, M.S. Perassolo, M.V. Antunes, R. Linden, Simultaneous Determination of Cocaine and Metabolites in Human Plasma Using Solid Phase Micro-Extraction Fiber Tips C18 and UPLC-MS/MS, *J. Anal. Toxicol.* 44 (2020) 49–56. <https://doi.org/10.1093/jat/bkz042>.
- [51] A. Majda, K. Mrochem, R. Wietecha-Posłuszny, S. Zapotoczny, M. Zawadzki, Fast and efficient analyses of the post-mortem human blood and bone marrow using DI-SPME/LC-TOFMS method for forensic medicine purposes, *Talanta.* 209 (2020) 120533. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120533>.
- [52] V. Jalili, A. Barkhordari, A. Ghiasvand, Bioanalytical Applications of Microextraction Techniques: A Review of Reviews, *Chromatographia.* 83 (2020) 567–577. <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03884-1>.
- [53] H. Kataoka, A. Ishizaki, K. Saito, Recent progress in solid-phase microextraction and its pharmaceutical and biomedical applications, *Anal. Methods.* 8 (2016) 5773–5788. <https://doi.org/10.1039/c6ay00380j>.
- [54] K. Kędziora, W. Wasiak, Extraction media used in needle trap devices—Progress in development and application, *J. Chromatogr. A.* 1505 (2017) 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.05.030>.
- [55] P.S. Fedotov, G.I. Malofeeva, E.Y. Savonina, B.Y. Spivakov, Solid-Phase Extraction of Organic Substances: Unconventional Methods and Approaches, *J. Anal. Chem.* 74 (2019) 205–212. <https://doi.org/10.1134/S1061934819030043>.
- [56] L. Yang, R. Said, M. Abdel-Rehim, Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1043 (2017) 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.044>.
- [57] M. Prata, A. Ribeiro, D. Figueirinha, T. Rosado, D. Oppolzer, J. Restolho, A.R.T.S. Araújo, S. Costa, M. Barroso, E. Gallardo, Determination of opiates in whole blood using microextraction by packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1602 (2019) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.05.021>.

- [58] R. Rocchi, M.C. Simeoni, C. Montesano, G. Vannutelli, R. Curini, M. Sergi, D. Compagnone, Analysis of new psychoactive substances in oral fluids by means of microextraction by packed sorbent followed by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Drug Test. Anal.* 10 (2018) 865–873. <https://doi.org/10.1002/dta.2330>.
- [59] P. Fernández, M. González, M. Regenjo, A.M. Ares, A.M. Fernández, R.A. Lorenzo, A.M. Carro, Analysis of drugs of abuse in human plasma using microextraction by packed sorbents and ultra-high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1485 (2017) 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.021>.
- [60] Y. Yang, W. Mai, J. Gao, Z. Hu, J. Xu, S. Zou, An in-needle solid-phase microextraction device packed with etched steel wires for polycyclic aromatic hydrocarbons enrichment in water samples, *J. Sep. Sci.* 42 (2019) 1750–1756. <https://doi.org/10.1002/jssc.201801112>.
- [61] V. Jalili, R. Zendehtel, A. Bahramian, A. Barkhordari, Application of Needle Trap Device Based on the Carbon Aerogel for Trace Analysis of n-Hexane in Air Samples, *Chromatographia.* 82 (2019) 1515–1521. <https://doi.org/10.1007/s10337-019-03779-w>.
- [62] H. Li, C. Bi, X. Li, Y. Xu, A needle trap device method for sampling and analysis of semi-volatile organic compounds in air, *Chemosphere.* 250 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126284>.
- [63] Y. Bang, Y. Hwang, S. Lee, S. Park, S. Bae, Sol–gel-adsorbent-coated extraction needles to detect volatile compounds in spoiled fish, *J. Sep. Sci.* 40 (2017) 3839–3847. <https://doi.org/10.1002/jssc.201601373>.
- [64] Y. Li, J.H. Li, H. Xu, Graphene/polyaniline electrodeposited needle trap device for the determination of volatile organic compounds in human exhaled breath vapor and A549 cell, *RSC Adv.* 7 (2017) 11959–11968. <https://doi.org/10.1039/c6ra25453e>.
- [65] M.M. Moein, D. Jabbar, A. Colmsjö, M. Abdel-Rehim, A needle extraction utilizing a molecularly imprinted-sol-gel xerogel for on-line microextraction of the lung cancer biomarker bilirubin from plasma and urine samples, *J. Chromatogr. A.* 1366 (2014) 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.012>.
- [66] R. Rahimpour, A. Firoozichahak, S. Alizadeh, D. Nematollahi, Urinary bio-monitoring of amphetamine derivatives by needle trap device packed with the zirconium-based metal–organic framework, *Sci. Rep.* 12 (2022) 1–10.

<https://doi.org/10.1038/s41598-022-17861-1>.

- [67] I.Y. Eom, A.M. Tugulea, J. Pawliszyn, Development and application of needle trap devices, *J. Chromatogr. A.* 1196–1197 (2008) 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.090>.
- [68] J. Ríos-Gómez, B. Fresco-Cala, M.T. García-Valverde, R. Lucena, S. Cárdenas, Carbon nanohorn suprastructures on a paper support as a sorptive phase, *Molecules.* 23 (2018). <https://doi.org/10.3390/molecules23061252>.
- [69] P.M. Nowak, R. Wietecha-Posluszny, J. Pawliszyn, White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 138 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116223>.
- [70] B. Fresco-Cala, S. Cárdenas, Potential of nanoparticle-based hybrid monoliths as sorbents in microextraction techniques, *Anal. Chim. Acta.* 1031 (2018) 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.069>.
- [71] E.M. Reyes-Gallardo, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Polymer-nanoparticles composites in bioanalytical sample preparation, *Bioanalysis.* 7 (2015) 1723–1730. <https://doi.org/10.4155/bio.15.93>.
- [72] G. Lasarte-Aragonés, R. Lucena, S. Crdenas, M. Valcrcel, Nanoparticle-based microextraction techniques in bioanalysis, *Bioanalysis.* 3 (2011) 2533–2548. <https://doi.org/10.4155/bio.11.257>.
- [73] M. Abdel-Rehim, S. Pedersen-Bjergaard, A. Abdel-Rehim, R. Lucena, M.M. Moein, S. Cárdenas, M. Miró, Microextraction approaches for bioanalytical applications: An overview, *J. Chromatogr. A.* 1616 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460790>.
- [74] C.E.D. Nazario, B.H. Fumes, M.R. da Silva, F.M. Lanças, New materials for sample preparation techniques in bioanalysis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1043 (2017) 81–95. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.041>.
- [75] E.V.S. Maciel, A.L. de Toffoli, E.S. Neto, C.E.D. Nazario, F.M. Lanças, New materials in sample preparation: Recent advances and future trends, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 119 (2019) 115633. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115633>.
- [76] A.N. Hasanah, I. Susanti, M. Mutakin, An Update on the Use of Molecularly

Imprinted Polymers in Beta-Blocker Drug Analysis as a Selective Separation Method in Biological and Environmental Analysis, *Molecules*. 27 (2022). <https://doi.org/10.3390/molecules27092880>.

- [77] J.B. Ferreira, C. de Jesus Macrino, L.A.F. Dinali, J.F.A. Filho, C.F. Silva, K.B. Borges, W. Romão, Molecularly imprinted polymers as a selective sorbent for forensic applications in biological samples—a review, *Anal. Bioanal. Chem.* 413 (2021) 6013–6036. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03596-x>.
- [78] K. Köse, D.Y. Kehribar, L. Uzun, Molecularly imprinted polymers in toxicology: a literature survey for the last 5 years, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28 (2021) 35437–35471. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14510-4>.
- [79] T.P. De Brito, D.V.A. De Aguiar, I. Pereira, B.G. Vaz, Determining methamphetamine in urine by molecularly imprinted polymer assisted paper spray ionization mass spectrometry, *J. Braz. Chem. Soc.* 32 (2021) 269–276. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200177>.
- [80] P. García-Atienza, F.A. Esteve-Turrillas, S. Armenta, J.M. Herrero-Martínez, Ethylphenidate determination in oral fluids by molecularly imprinted polymer extraction and ion mobility spectrometry, *Microchem. J.* 178 (2022) 107423. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107423>.
- [81] K.D. Clark, M.N. Emaus, M. Varona, A.N. Bowers, J.L. Anderson, Ionic liquids: solvents and sorbents in sample preparation, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 209–235. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700864>.
- [82] K.D. Clark, M.J. Trujillo-Rodríguez, J.L. Anderson, Advances in the analysis of biological samples using ionic liquids, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 4567–4573. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0898-9>.
- [83] T. Chatzimitakos, C. Stalikas, Carbon-based nanomaterials functionalized with ionic liquids for microextraction in sample preparation, *Separations*. 4 (2017). <https://doi.org/10.3390/separations4020014>.
- [84] M. Ahmadi, H. Elmongy, T. Madrakian, M. Abdel-Rehim, Nanomaterials as sorbents for sample preparation in bioanalysis: A review, *Anal. Chim. Acta.* 958 (2017) 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.062>.
- [85] K. Murtada, F. de Andrés, M. Zougagh, Á. Ríos, Strategies for antidepressants extraction from biological specimens using nanomaterials for analytical purposes: A review, *Microchem. J.* 150 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104193>.

- [86] E.M. Reyes-Gallardo, R. Lucena, S. Cárdenas, Silica nanoparticles-nylon 6 composites: synthesis, characterization and potential use as sorbent, *RSC Adv.* 7 (2017) 2308–2314. <https://doi.org/10.1039/c6ra24739c>.
- [87] H. Ghambari, E.M. Reyes-Gallardo, R. Lucena, M. Saraji, S. Cárdenas, Recycling polymer residues to synthesize magnetic nanocomposites for dispersive micro-solid phase extraction, *Talanta.* 170 (2017) 451–456. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.026>.
- [88] V. Alampanos, V. Samanidou, Current trends in green sample preparation before liquid chromatographic bioanalysis, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 31 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100499>.
- [89] M.C. Díaz-Liñán, R. Lucena, S. Cárdenas, A.I. López-Lorente, Unmodified cellulose filter paper, a sustainable and affordable sorbent for the isolation of biogenic amines from beer samples, *J. Chromatogr. A.* 1651 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462297>.
- [90] G. Mafra, M.T. García-Valverde, J. Millán-Santiago, E. Carasek, R. Lucena, S. Cárdenas, Returning to nature for the design of sorptive phases in solid-phase microextraction, *Separations.* 7 (2020) 1–22. <https://doi.org/10.3390/separations7010002>.
- [91] J.A. Ocaña-González, R. Fernández-Torres, M.Á. Bello-López, M. Ramos-Payán, New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review, *Anal. Chim. Acta.* 905 (2016) 8–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.041>.
- [92] J. Zheng, J. Huang, Q. Yang, C. Ni, X. Xie, Y. Shi, J. Sun, F. Zhu, G. Ouyang, Fabrications of novel solid phase microextraction fiber coatings based on new materials for high enrichment capability, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 108 (2018) 135–153. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.08.021>.
- [93] J. Moreda-Piñeiro, A. Moreda-Piñeiro, Recent advances in combining microextraction techniques for sample pre-treatment, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.025>.
- [94] M.T. García-Valverde, C.A. Ledesma-Escobar, R. Lucena, S. Cárdenas, Tunable polarity carbon fibers, a holistic approach to environmental protection, *Molecules.* 23 (2018). <https://doi.org/10.3390/molecules23051026>.
- [95] N. Orishchin, C.C. Crane, M. Brownell, T. Wang, S. Jenkins, M. Zou, A. Nair, J. Chen, Rapid Deposition of Uniform Polydopamine Coatings on

- Nanoparticle Surfaces with Controllable Thickness, *Langmuir*. 33 (2017) 6046–6053. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00671>.
- [96] H. Lee, S.M. Dellatore, W.M. Miller, P.B. Messersmith, Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings, *Science* (80-. ). 318 (2007) 426–430. <https://doi.org/https://www.science.org/doi/epdf/10.1126/science.1147241>.
- [97] P. Delparastan, K.G. Malollari, H. Lee, P.B. Messersmith, Direct Evidence for the Polymeric Nature of Polydopamine, *Angew. Chemie*. 131 (2019) 1089–1094. <https://doi.org/10.1002/ange.201811763>.
- [98] J.H. Ryu, P.B. Messersmith, H. Lee, Polydopamine Surface Chemistry: A Decade of Discovery, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 10 (2018) 7523–7540. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b19865>.
- [99] Y. Liu, K. Ai, L. Lu, Polydopamine and its derivative materials: Synthesis and promising applications in energy, environmental, and biomedical fields, *Chem. Rev.* 114 (2014) 5057–5115. <https://doi.org/10.1021/cr400407a>.
- [100] F. Yu, S. Chen, Y. Chen, H. Li, L. Yang, Y. Chen, Y. Yin, Experimental and theoretical analysis of polymerization reaction process on the polydopamine membranes and its corrosion protection properties for 304 Stainless Steel, *J. Mol. Struct.* 982 (2010) 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2010.08.021>.
- [101] A. Bekmurzayeva, W.J. Duncanson, H.S. Azevedo, D. Kanayeva, Surface modification of stainless steel for biomedical applications: Revisiting a century-old material, *Mater. Sci. Eng. C*. 93 (2018) 1073–1089. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.08.049>.
- [102] A. Tyo, S. Welch, M. Hennenfent, P. Kord Fooroshani, B.P. Lee, R. Rajachar, Development and Characterization of an Antimicrobial Polydopamine Coating for Conservation of Humpback Whales, *Front. Chem.* 7 (2019). <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00618>.
- [103] D. Che, J. Cheng, Z. Ji, S. Zhang, G. Li, Z. Sun, J. You, Recent advances and applications of polydopamine-derived adsorbents for sample pretreatment, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 97 (2017) 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.08.002>.
- [104] S. El Yakhlifi, V. Ball, Polydopamine as a stable and functional nanomaterial, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 186 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110719>.

- [105] C. Ye, Y. Wu, Z. Wang, Modification of cellulose paper with polydopamine as a thin film microextraction phase for detection of nitrophenols in oil samples, *RSC Adv.* 6 (2016) 9066–9071. <https://doi.org/10.1039/c5ra23232e>.
- [106] H. Bagheri, S. Banihashemi, F.K. Zandian, Microextraction of antidepressant drugs into syringes packed with a nanocomposite consisting of polydopamine, silver nanoparticles and polypyrrole, *Microchim. Acta.* 183 (2016) 195–202. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1606-5>.
- [107] J. Xu, S. Huang, R. Wu, R. Jiang, F. Zhu, J. Wang, G. Ouyang, Bioinspired Polydopamine Sheathed Nanofibers for High-Efficient in Vivo Solid-Phase Microextraction of Pharmaceuticals in Fish Muscle, *Anal. Chem.* 87 (2015) 3453–3459. <https://doi.org/10.1021/ac5048357>.
- [108] M. Thirukumaran, V. Singh, Y. Arao, Y. Fujito, M. Nishimura, T. Ogura, J. Pawliszyn, Solid-phase microextraction- probe electrospray ionization devices for screening and quantitating drugs of abuse in small amounts of biofluids, *Talanta.* 231 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122317>.
- [109] W. Fan, D. Yang, N. Ding, P. Chen, L. Wang, G. Tao, F. Zheng, S. Ji, Application of core-satellite polydopamine-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>nanoparticles-hollow porous molecularly imprinted polymer combined with HPLC-MS/MS for the quantification of macrolide antibiotics, *Anal. Methods.* 13 (2021) 1412–1421. <https://doi.org/10.1039/d0ay02025g>.
- [110] A. Molina-Díaz, M. Beneito-Cambra, D. Moreno-González, B. Gilbert-López, Ambient mass spectrometry from the point of view of Green Analytical Chemistry, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 19 (2019) 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.05.005>.
- [111] G. Gachumi, R.W. Purves, C. Hopf, A. El-Aneed, Fast Quantification without Conventional Chromatography, the Growing Power of Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 92 (2020) 8628–8637. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00877>.
- [112] J.T. Shelley, S.P. Badal, C. Engelhard, H. Hayen, Ambient desorption/ionization mass spectrometry: evolution from rapid qualitative screening to accurate quantification tool, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 4061–4076. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1023-9>.
- [113] G.A. Gómez-Ríos, M.F. Mirabelli, Solid Phase Microextraction-mass spectrometry: Metanoia, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 112 (2019) 201–211.



<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.030>.

- [114] X. Li, W. Ma, H. Li, W. Ai, Y. Bai, H. Liu, Sampling and analyte enrichment strategies for ambient mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 715–724. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0658-2>.
- [115] M.C. Díaz-Liñán, M.T. García-Valverde, A.I. López-Lorente, S. Cárdenas, R. Lucena, Silver nanoflower-coated paper as dual substrate for surface-enhanced Raman spectroscopy and ambient pressure mass spectrometry analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 3547–3557. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02603-x>.
- [116] H. Bagheri, E. Babanezhad, F. Khalilian, An interior needle electropolymerized pyrrole-based coating for headspace solid-phase dynamic extraction, *Anal. Chim. Acta.* 634 (2009) 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.12.047>.
- [117] S. Jackson, D.J. Swiner, P.C. Capone, A.K. Badu-Tawiah, Thread spray mass spectrometry for direct analysis of capsaicinoids in pepper products, *Anal. Chim. Acta.* 1023 (2018) 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.008>.
- [118] G.A. Gómez-Ríos, M. Tascon, J. Pawliszyn, Coated blade spray: Shifting the paradigm of direct sample introduction to MS, *Bioanalysis.* 10 (2018) 257–271. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0153>.
- [119] T.T. Ng, P.K. So, B. Hu, Z.P. Yao, Rapid detection and quantitation of drugs-of-abuse by wooden-tip electrospray ionization mass spectrometry, *J. Food Drug Anal.* 27 (2019) 428–438. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.09.002>.
- [120] T.H. Kuo, E.P. Dutkiewicz, J. Pei, C.C. Hsu, Ambient Ionization Mass Spectrometry Today and Tomorrow: Embracing Challenges and Opportunities, *Anal. Chem.* 92 (2020) 2353–2363. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05454>.
- [121] O. González, M.E. Blanco, G. Iriarte, L. Bartolomé, M.I. Maguregui, R.M. Alonso, Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect, *J. Chromatogr. A.* 1353 (2014) 10–27. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.077>.
- [122] A.T. Roemmelt, A.E. Steuer, T. Kraemer, Liquid Chromatography, in Combination with a Quadrupole Time-of-Flight Instrument, with Sequential

Window Acquisition of All Theoretical Fragment-Ion Spectra Acquisition:  
Validated Quantification of 39 Antidepressants in Whole Blood As Part of a  
Simultaneous, Anal. Chem. 87 (2015) 9294–9301.  
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02031>.

## **CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Hipótesis**

La innovación en estrategias para el análisis de drogas de abuso y fármacos, y el desarrollo de nuevos materiales para el tratamiento de fluidos biológicos mediante sistemas miniaturizados de extracción acoplados a espectrometría de masas, permite la sensibilidad y selectividad requeridas en toxicología forense alcanzando una adecuada eficiencia y contribuyendo al análisis sostenible.

### **2.2. Objetivo principal**

Desarrollar estrategias analíticas basadas en sistemas miniaturizados de extracción acoplados a espectrometría de masas, para el análisis de drogas y fármacos en muestras biológicas, con enfoque en su eficiencia y sostenibilidad ambiental.

### 2.3. Objetivos específicos

- 1) Establecer las ventajas del acoplamiento directo de un sistema comercial de tratamiento de muestra (MEPS) con un espectrómetro de masas de alta resolución, para la determinación de fármacos de relevancia toxicológica en el contexto de un bioanálisis sostenible.
- 2) Establecer las potencialidades de polidopamina como fase extractante mediante el diseño de un dispositivo de microextracción en fase sólida para el análisis de fármacos en fluido oral por espectrometría de masas.
- 3) Diseñar un dispositivo para la microextracción de drogas de abuso y su incorporación como emisor en el sistema de electrospray de un espectrómetro de masas.
- 4) Desarrollar un método para el *screening* toxicológico cualitativo de muestras de sangre *postmortem* del Servicio Médico Legal, mediante una simple precipitación de proteínas miniaturizada y análisis por UHPLC-qTOF-MS/MS

**CAPÍTULO 3: ACOPLAMIENTO DIRECTO DE MEPS A ESI-QQTOF-MS  
PARA EL ANÁLISIS SIMULTÁNEO DE ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS Y  
BENZODIAZEPINAS EN SANGRE POSTMORTEM**

En esta sección se presentan los resultados que dieron origen al siguiente artículo, publicado en *Microchemical Journal* en diciembre del 2021 (doi: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106797>).

**Direct coupling of MEPS to ESI-QqTOF-MS for the simultaneous analysis of tricyclic antidepressants and benzodiazepines in postmortem blood**

Carmina Vejar-Vivar<sup>a</sup>, Luis Bustamante<sup>a</sup>, Rafael Lucena<sup>b</sup>, Christian Ortega<sup>c</sup>, Mariela Valenzuela<sup>c</sup>, Claudia Mardones<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Department of Instrumental Analysis, Faculty of Pharmacy, University of Concepción, PO Box 160-C, Concepción, Chile.*

<sup>b</sup> *Affordable and Sustainable Sample Preparation (AS<sub>2</sub>P) Research group. Departamento de Química Analítica, Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica IUNAN, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Marie Curie, E-14071 Córdoba, España.*

<sup>c</sup> *Laboratory of the Forensic Medical Service of Chile, Servicio Médico Legal, Camino a Penco 4018, Concepción, Chile.*

## Abstract

The combination of chromatography and mass spectrometry is the golden standard in forensic sciences. Although this approach provides high sensitivity and selectivity levels, it is time-consuming. The circumvention of the chromatography can increase the sample throughput, but the selectivity must be compensated by using a selectivity enhanced instrumental technique, such as high-resolution mass spectrometry (HRMS), and designing an appropriate sample preparation step. Microextraction by packed sorbent (MEPS) has proven potential to treat complex biological samples in a fast and reproducible way. It allows processing low sample volumes, remaining a green procedure due to low solvent consumption. This article presents the direct coupling of a MEPS syringe to the electrospray ionization source (ESI) of a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (QqTOF) using an infusion pump for sample introduction, as a proof of concept. The developed method was validated for the simultaneous analysis of benzodiazepines and tricyclic antidepressants in postmortem blood samples. Limits of quantification (LOQ) were between 25 and 50 ng mL<sup>-1</sup> for all compounds. Accuracy and precision were evaluated at three concentration levels (50, 125 and 350 ng mL<sup>-1</sup>) and expressed in terms of relative error (%RE) and relative standard deviation (%RSD), respectively. Both parameters were better than 20% for the lower concentration evaluated and better than 15% for the other two concentration levels. The developed method was used to analyze authentic postmortem blood

samples, to test the applicability in the forensic toxicological context. The results are in agreement with the data provided by the medico-legal services. Also, the application of HRMS has allowed the identification of unexpected targets in the samples.

### **3.1. Introduction**

Drug analysis in forensic biological samples is particularly challenging, mainly because of the high complexity of the matrices, the presence of many possible compounds of interest, and their typically low concentration [1]. The identification of a wide range of analytes is usually achieved by non-targeted analysis, which is possible using high-resolution mass spectrometry (HRMS) [2]. HRMS has been applied as a promising tool for forensic toxicological analysis, mainly because of its high mass accuracy for identity assignment and sensitivity [3-9]. Most approaches combine an appropriate sample preparation step with chromatographic separation, resulting in highly sensitive and robust methods, but requiring a larger time for analysis [10]. However, the direct combination of sample preparation techniques with HRMS is currently of great concern in different fields, mainly owing to their fast analysis speed, high efficiency, and the less amount of solvent needed for analysis, which is in line with the concept of “green” or sustainable analytical chemistry [11-15].

Whole blood is the most useful matrix for postmortem toxicological analysis, since the presence of drugs in the sample can be best related to a physiological or pharmacological effect. Therefore, the obtained result from this analysis could be of assistance to the authorities to reconstruct events in the investigation of a case [16]. However, blood is a complex matrix that presents many interfering components such as proteins, lipids, and salts, among other substances [17].



Also, in some cases, blood volume obtained from an autopsy may be restricted due to loss by trauma, decomposition, or other special situations. The analysis of postmortem blood presents additional challenges because of its high viscosity and the eventual haemolysis or clot [9]. All these reasons make the clean-up of whole postmortem blood samples highly recommended.

In general, sample preparation is a valuable step in forensic analytical toxicology because it allows to isolate, clean up and enrich analytes before instrumental analysis [18]. Several microextraction techniques have been developed to reduce the overall time of analysis, sample volume and manipulation, and solvent consumption [19]. Microextraction by packed sorbent (MEPS) is a miniaturization of conventional solid-phase extraction (SPE). This technique has been extensively reviewed as a simple, fast, and green sample preparation technique [20-24]. Because of the small sample volumes needed for the extraction, it reduces the sample preparation time and the amount of solvent needed [22]. Generally, biological samples must be diluted or deproteinated before being loaded into the MEPS device to avoid clogging [20]. Acetonitrile and methanol are common solvents used to precipitate proteins in blood samples [24,25]. MEPS has been used for the analysis of many drugs in different biological samples, mainly followed by liquid (LC) or gas chromatography (GC) coupled to MS [25-28]. There are some publications where direct MS analysis of MEPS eluates without chromatographic separation has been described [29-33]. Vlčková *et al.*

achieved a rapid and sensitive analysis for amphetamine and methadone in spiked urine samples by direct injection of MEPS eluates into a mass spectrometer with an electrospray ionization source (ESI-MS) [29]. More recently, a method for the MS analysis of MEPS extracts was reported to be efficient and fast for identifying ketamine in fruit juices [31]. Other authors have focused on the direct elution of the analytes into the MS source. For instance, Jagerdeo *et al.* developed a fast method for the screening of cocaine and metabolites in urine by using MEPS to introduce the extracts into direct analysis in real-time (DART) ionization source with a time-of-flight (TOF) mass analyzer [32]. Another approach was proposed by Candish *et al.* for the rapid analysis of opiates and urinary metabolites using controlled directional flow MEPS coupled to ESI-TOF-MS [30]. However, to the best of our knowledge, there are no reports of the direct and simultaneous elution and injection of the MEPS extract into the ESI source coupled to QqTOF-HRMS or the application of the MEPS-MS approach for samples as complex as postmortem whole blood.

In Chile, tricyclic antidepressants (TCAs) and benzodiazepines (BZDs) are the compounds most frequently involved in drug poisoning, which can lead to death [34]. In this work, we propose a method that involves sample preparation and clean-up by MEPS and its direct coupling to ESI-QqTOF-HRMS for the simultaneous determination of TCAs and BZDs in postmortem blood samples. Overall, this method could present several advantages for analyzing biological

samples in forensic services, mainly in terms of analysis time and solvent consumption. After validation, the application of the method was evaluated for the analysis of authentic forensic samples, including the identification of non-targeted compounds.

## **3.2. Materials and methods**

### 3.2.1. Reagents and materials

All reagents were of analytical grade or better and purchased from Merck (Darmstadt, Germany) unless otherwise specified. Drug standard solutions of BZDs (alprazolam, chlordiazepoxide, clonazepam, diazepam, flunitrazepam, lorazepam, nitrazepam, nordazepam and triazolam) and TCAs (amitriptyline, desipramine, doxepin, clomipramine, and imipramine) were kindly provided by the Chilean Forensic Service (Servicio Médico Legal). A 10 mg/L stock standard solution containing all analytes was prepared in methanol and stored at -20 °C. Working standard solutions were prepared by evaporating the stock solution solvent and its reconstitution in an aqueous solution of formic acid at pH 3 for MEPS optimization or postmortem blood for the matrix-matched calibration and method validation. Prazepam (500 ng mL<sup>-1</sup>) was used as the internal standard (IS) for MS measurements since it has been typically employed in the Servicio

Médico Legal of Chile, and it is frequently employed in forensic analysis worldwide [35-37].

Acetonitrile was used for blood deproteination. Formic acid, ammonia, and ammonium formate solutions prepared in ultrapure water were used for reconstitution and pH adjustments of the samples before MEPS extraction. Acetonitrile, isopropanol, formic acid ( $\geq 98\%$ ), and water of LC-MS grade were used for sample preparation and simultaneous elution/direct infusion of sample extracts into the MS. Sodium formate, water, and isopropanol of LC-MS grade were used for instrument calibration.

The commercial MEPS device consisted of a 250 mL gastight syringe and BIN (Barrel Insert and Needle) assemblies containing C18, C8, or M1 (mixed C8+SCX) sorbents (SGE, Melbourne, Australia).

### 3.2.2. Postmortem blood samples

Five authentic postmortem blood samples were provided by the Servicio Médico Legal of Chile in graduated centrifuge tubes. The samples were stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis. A pool of blank blood collected during medico-legal autopsies was analyzed by the forensic services to check the absence of analytes. The samples were reanalyzed in our laboratory by LC-MS for additional confirmation. Working solutions containing the analytes at different concentration levels were prepared by spiking blank postmortem blood. These solutions were used for building the

matrix-matched calibration model. Prior to MEPS clean-up, the postmortem blood samples were protein depleted to avoid clogging of the device. A volume of 200  $\mu\text{L}$  of blood was spiked with the internal standard and mixed with 600  $\mu\text{L}$  of acetonitrile at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The solution was shaken with vortex for 30 seconds, and then it was submitted to orbital shaking for 10 minutes and centrifuged at 13000 rpm for 10 minutes at a temperature of  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was then separated and evaporated to dryness since it contained a high amount of acetonitrile, which is not compatible with MEPS sample loading. The residue was reconstituted in 100  $\mu\text{L}$  of an aqueous solution of formic acid at pH 3 before MEPS loading.

### 3.2.3. Direct analysis by MEPS-ESI-QqTOF

The developed system for the direct MEPS-MS method consisted of coupling the MEPS syringe with the ESI-QqTOF using an infusion pump (New Era Pump Systems Inc, New York, USA), as shown in Figure 3-1.

MS conditions for the analysis were the following: nebulizer gas pressure of 0.7 bar, dry gas flow rate of 6 L/min, capillary voltage of 4500 V and the dry gas temperature adjusted to  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The instrument was calibrated daily before use by the direct infusion of a 10 mM solution of sodium formate in water/isopropanol (1:1). This procedure of calibration was repeated after each cycle of nine chromatograms.

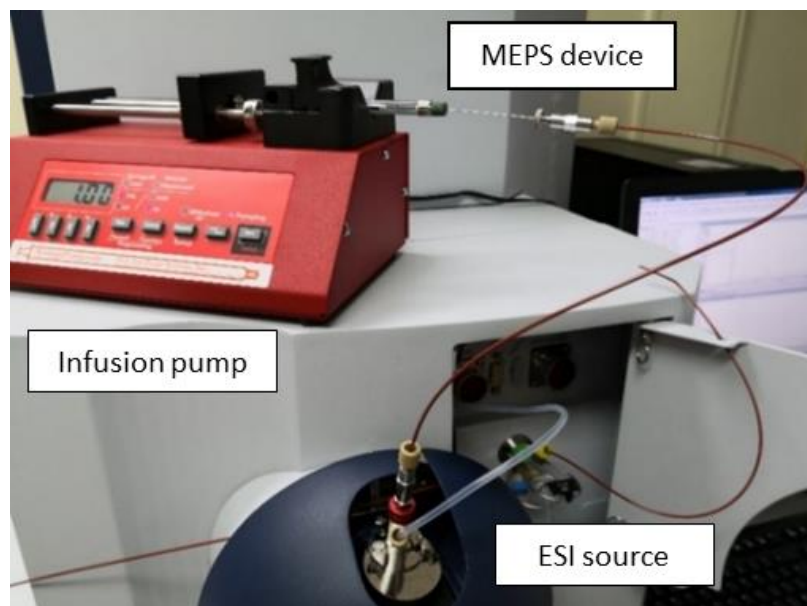


Fig. 3-1. Developed system for direct MEPS-ESI-QqTOF-MS analysis.

The MEPS-MS procedure was performed using a 250  $\mu\text{L}$  MEPS syringe with a C8 BIN. The study for the selection of the MEPS sorbent is available as Supplementary Material.

The MEPS-MS protocol was as follows: sorbent was firstly conditioned with 100  $\mu\text{L}$  acetonitrile and then with 100  $\mu\text{L}$  of an aqueous solution adjusted to pH 3 with formic acid. A volume of 100  $\mu\text{L}$  of the pre-treated postmortem blood sample was aspirated and discharged through the syringe four times, followed by a washing step using 100  $\mu\text{L}$  of the acidic aqueous solution. A volume of 100  $\mu\text{L}$  of acetonitrile with 0.1% formic acid was loaded into the MEPS syringe, which then was sent into the infusion pump at a rate of 16  $\mu\text{L}/\text{min}$  for direct elution and sample

introduction into the ESI source. A peek tube with a stainless-steel adapter was used for direct coupling the MEPS needle into the ESI source, allowing the simultaneous elution and ionization of the analytes in a single step. The total data acquisition time for each sample was 2 minutes. After each extraction, the sorbent was washed 4 times with 100  $\mu$ L of the acidic aqueous solution and 4 times with 100  $\mu$ L acetonitrile before the following sample analysis.

Data acquisition was carried out using the software Bruker otofControl 4.1. The instrumental response for the direct MEPS-MS method was observed as a chromatogram of the sum of all m/z intensity in time. Generation of an extracted ion chromatogram (EIC) for each molecular ion ( $\pm 0.01$  Da) and signal integration for quantitative analysis were achieved using the DataAnalysis 4.4 software. The analytical response for each target analyte was defined as the ratio between the areas of the target analyte and the IS ( $A/A_{IS}$ ). Areas were usually obtained from a 0.5 min section of the chromatogram to achieve better repeatability. For data processing, Microsoft Excel version 2006 (Microsoft, Washington, United States) and XLSTAT (Addinsoft, Paris, France) were used.

### 3.3. Results and discussion

#### 3.3.1. MEPS conditions

Initial MEPS protocol was based on the tutorial article from Abdel-Rehim *et al.* [22]. To maintain the procedure as simple as possible, thus reducing cross-contamination and minimizing the exposure of the researchers to the biological samples, the reconstitution solution (water/formic acid at pH 3) was used as the MEPS loading medium. The prioritization of simplicity and security in the analysis is in agreement with the White Analytical Chemistry principles as the functionality of the approach (fully described in the validation and application sections) is assured [38].

The study for selecting the MEPS sorbent was conducted using an UHPLC-QqTOF-MS method detailed in the Supplementary Material. Three different sorbents for extraction were evaluated: two based on reversed-phase, C8 and C18, and a mixed cation-exchange/reversed phase, M1 (C8+SCX). One-way ANOVA was used to evaluate the presence of statistical differences between them. Among the tested sorbents, the best results were provided by the C8 sorbent for most analytes (Figure 3-2) in which higher relative areas were obtained, mainly for TCAs, for which the analyte/IS area ratio ( $A/A_{IS}$ ) was significantly higher with C8 than with the other two sorbents ( $p > 0.05$ ). Only for flunitrazepam the relative area was higher with the sorbent M1 ( $p > 0.05$ ). RSD



values were similar for all tested sorbents. For this reason, all the following experiments were performed using C8 as extraction sorbent. This variable was evaluated since it is critical for MEPS selectivity because the retention capability depends on the interaction between the sorptive phase and the analytes [24].

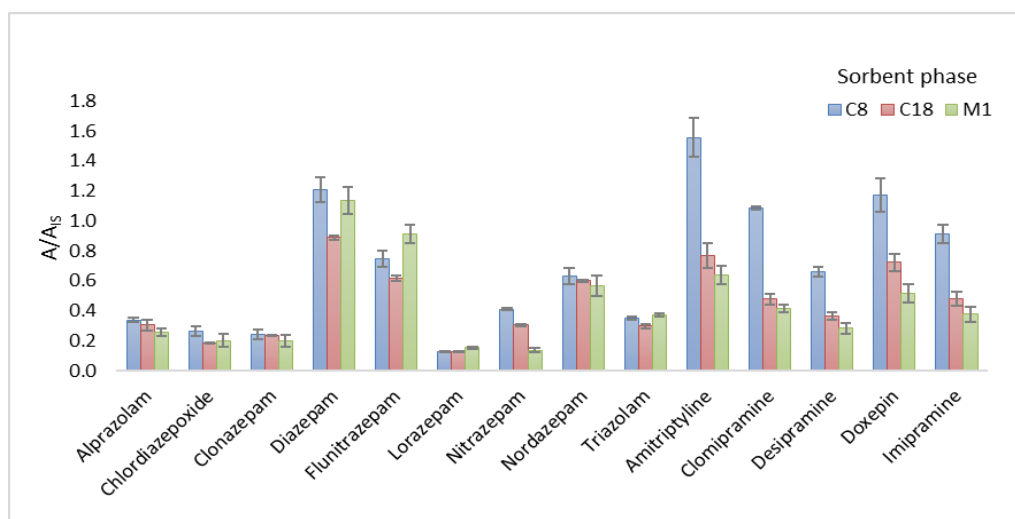


Fig. 3-2. Study of the effect of the MEPS sorbent phase on extraction efficiency of BZDs and TCAs.

### 3.3.2. Direct coupling of MEPS with MS

Finally, the direct coupling between MEPS and ESI-QqTOF was considered. The objective was the fast non-separative analysis of BZDs and TCAs. The MEPS syringe was directly connected to the ESI source using a 0.13 mm peek tube with a stainless-steel fitting. Before the elution step, the tip of the MEPS needle was

inserted into a PTFE tube inside the fitting connected to the peek tube. The outer diameter of the needle was larger than the inner diameter of the PTFE tube to avoid leakages. For this same reason, the direct introduction of the elution solvent into the MS instrument was carried out at a rate of 16  $\mu\text{L}/\text{min}$ , allowing to obtain a chromatogram with a stable MS intensity in time for each analysis. As an example, an extracted ion chromatogram obtained for the molecular ion of imipramine is shown in Figure 3-3.

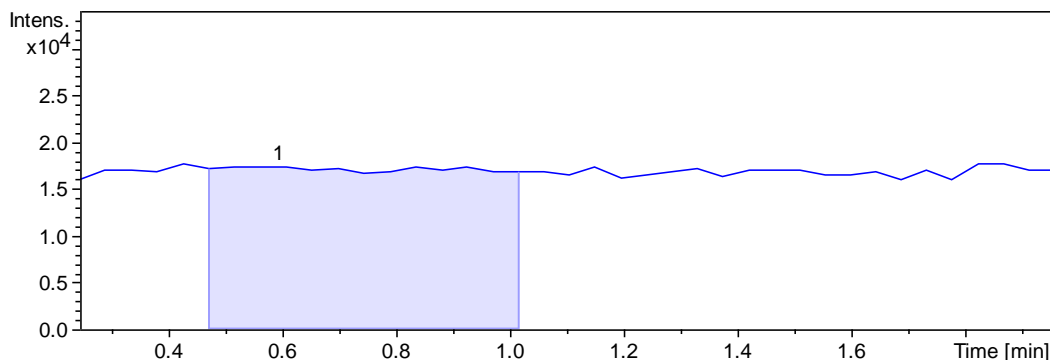


Fig. 3-3. Extracted ion chromatogram for imipramine ( $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  281.2012  $\pm$  0.01) obtained from an analyzed postmortem blood sample spiked at 250  $\text{ng mL}^{-1}$ . The selected area was used for quantitative analysis.

Acetonitrile with 0.1% formic acid was used as elution solvent to ensure maximum desorption and ionization of analytes in a single step. All analytes and the internal standard were observed as protonated molecular ions with an MS error of less than 5 ppm in the matrix, considering the average mass spectra. This

demonstrates that the calibration protocol was adequate for this type of analysis. Although detection was carried out using a single ion for each analyte, MS/MS spectra for the most abundant parent ions was also collected, therefore fragmentation information can also be used for identity confirmation in data analysis when necessary. The Table 3-S1, available as Supplementary Material, includes the most abundant precursor ions observed for each analyte. Including extraction and instrumental analysis the overall time for each sample was approximately 12 minutes, but it could be reduced with further investigation on the automatization of the MEPS-MS coupling. However, the analysis time is still much lower than conventional methods such as SPE followed by HPLC-MS.

### 3.3.3. Method Validation

The analytical performance of the developed method was evaluated using a matrix-matched calibration model built under optimal conditions. Blank postmortem blood samples were spiked with the analytes, and the obtained relative areas were plotted against the known concentrations to obtain each calibration curve. Results for clonazepam and lorazepam did not fulfil the acceptance criteria for the validation since it was not possible to establish an acceptable linear response between the tested concentration levels for clinical and toxicological analysis. The calibration curve parameters for all analytes that showed an acceptable linear response are shown in Table 3-1, including linear

range, slope, intercept, and determination coefficient ( $R^2$ ).  $R^2$  values were better than 0.99 in all cases. The limit of quantification (LOQ) was estimated for each analyte as the lowest concentration point of the calibration curve that could be determined with acceptable accuracy and precision ( $\leq 20\%$ ). This allowed to obtain LOQ values equal or below  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  for all compounds. According to values mentioned in the literature [39-41], LOQs obtained were below the lowest therapeutic concentrations for chlordiazepoxide, diazepam, nordazepam, amitriptyline, clomipramine, and imipramine. For nitrazepam, desipramine and doxepin, LOQs were within the therapeutic concentration range, and for alprazolam, flunitrazepam and triazolam it was near to the upper concentration limit, therefore quantification of these analytes by the developed method could only be possible in overdose cases.

Although the developed non-separative method did not achieve LOQs as low as the obtained with separation by HPLC-MS [5,9,42-44], the sensitivity of the direct MEPS-MS method was adequate for toxicological screening and for the quantitative analysis of most of the investigated drugs. It also involved a much shorter time for the combined sample extraction and instrumental analysis, and the use of a small volume of blood and organic solvents. Therefore, the method fits its purpose.

Table 3-1. Linearity and figures of merit for studied benzodiazepines and tricyclic antidepressants.

Compound	LDR (ng mL <sup>-1</sup> )	Intercept (b)	Slope (a) (mL ng <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	LOQ (ng mL <sup>-1</sup> )	Concentration (ng mL <sup>-1</sup> )		%RSD	%RE
						Spiked	Measured		
Alprazolam	25–500	0.0056 ± 0.0150	0.0012 ± 0.0001	0.9931	25	50	40.8 ± 1.6	3.8	-18.5
						125	126.8 ± 6.5	5.1	-1.4
						300	359.2 ± 55.3	15.4	-2.6
Chlordiazepoxide	50 – 500	-0.0314 ± 0.0146	0.0015 ± 0.0001	0.9936	50	50	59.4 ± 0.5	0.9	18.8
						125	114.2 ± 7.0	6.1	8.6
						300	334.4 ± 25.0	7.5	4.5
Diazepam	50 – 500	-0.0505 ± 0.0312	0.0049 ± 0.0001	0.9937	50	50	42.4 ± 0.1	0.2	-15.2
						125	118.1 ± 10.6	9.0	5.5
						300	368.1 ± 27.1	7.4	-5.2
Flunitrazepam	25 – 500	0.0191 ± 0.0063	0.0009 ± 0.0000	0.9923	25	50	40.2 ± 7.8	19.4	-19.6
						125	140.9 ± 9.4	6.7	-12.7
						300	341.8 ± 3.6	1.1	2.3
Nitrazepam	50 – 400	-0.0065 ± 0.0185	0.0018 ± 0.0001	0.9914	50	50	56.2 ± 0.1	0.1	12.5
						125	129.9 ± 6.3	4.9	-3.9
						300	328.5 ± 21.2	6.5	6.1
Nordazepam	50–500	-0.0110 ± 0.0161	0.0027 ± 0.0001	0.9944	50	50	53.0 ± 1.9	3.6	5.9
						125	109.1 ± 8.6	7.9	12.7
						300	352.1 ± 25.2	7.1	-0.6

Triazolam	50–500	$-0.0272 \pm 0.0098$	$0.0011 \pm 0.0000$	0.9930	50	50	$52.4 \pm 1.8$	3.3	4.9
						125	$110.2 \pm 10.0$	9.1	11.9
						300	$328.7 \pm 2.1$	0.6	6.1
Amitriptyline	25–500	$-0.0616 \pm 0.0320$	$0.0073 \pm 0.0001$	0.9971	25	50	$55.1 \pm 3.9$	7.0	10.1
						125	$112.9 \pm 16.0$	14.2	9.7
						300	$343.9 \pm 5.2$	1.5	1.7
Clomipramine	50–400	$0.0357 \pm 0.0177$	$0.0018 \pm 0.0001$	0.9961	50	50	$56.6 \pm 10.9$	19.3	13.1
						125	$141.1 \pm 15.9$	11.2	-12.9
						300	$354.3 \pm 35.9$	10.1	-3.8
Desipramine	50–500	$-0.0684 \pm 0.0312$	$0.0043 \pm 0.0001$	0.9905	50	50	$53.9 \pm 2.9$	5.4	7.8
						125	$111.7 \pm 15.9$	14.2	10.6
						300	$363.2 \pm 23.9$	6.6	-3.8
Doxepin	25–500	$-0.0936 \pm 0.0538$	$0.0087 \pm 0.0002$	0.9948	25	50	$54.6 \pm 3.2$	5.9	9.3
						125	$118.1 \pm 16.8$	14.2	5.6
						300	$336.1 \pm 11.1$	23.3	4.0
Imipramine	25–500	$-0.0406 \pm 0.0401$	$0.0054 \pm 0.0002$	0.9927	25	50	$50.2 \pm 2.0$	4.0	0.4
						125	$122.0 \pm 17.8$	14.6	2.4
						300	$339.9 \pm 18.0$	5.3	2.9

LDR: Linear dynamic range; LOQ: Limit of quantification; RSD: relative standard deviation; RE: Relative error.

Accuracy and precision for the direct MEPS-MS method were evaluated using blood samples spiked at 3 levels of concentration: 50, 125 and 350 ng mL<sup>-1</sup>. Results were expressed as the relative error (%RE) for accuracy and relative standard deviation (%RSD) for precision as repeatability. Obtained values are also presented in Table 3-1.

Values equal or below 15% RE and 15% RSD, for accuracy and repeatability respectively, were set as suitable for bioanalytical sample analysis, except at the low level of concentration (50 ng mL<sup>-1</sup>) for which values of 20% for %RE and %RSD were considered acceptable [45].

#### 3.3.4. Application of the developed method

The developed direct MEPS-MS method was applied to analyze 5 authentic postmortem blood samples obtained from medico-legal autopsies and provided by the laboratory of the Servicio Médico Legal. In agreement with the qualitative results obtained by forensic services, the identification of amitriptyline was accomplished for 2 samples, flunitrazepam was detected in one sample and nordazepam was determined in 2 samples, one of them also containing diazepam. In all cases, the exact mass for the molecular ion was determined with an error of less than 5 ppm. The MEPS-MS method was also used for the quantification of these analytes. Table 3-2 shows the obtained results.

For samples 2, 4 and 5 the measured concentrations of the detected compounds were within therapeutic levels. The concentration of amitriptyline in sample 1 was above the linear range of the method, therefore it was not quantified because it could be considered toxic since it was above the upper therapeutic level. The concentration of flunitrazepam in sample 3 was also above therapeutic levels. However, due to the processes of postmortem redistribution and drug metabolism, additional information is necessary to establish correlations between drug concentrations in postmortem samples and their potential relation to the intoxication or death of an individual [16].

Table 3-2. Results for the determination of benzodiazepines and tricyclic antidepressants in postmortem blood samples.

Sample	Compound	Molecular formula	Error ppm	Concentration (ng mL <sup>-1</sup> )
1	Amitriptyline	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N	2.3	n.q. <sup>a</sup>
2	Nordazepam	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O	3.3	84.0 ± 6.6
3	Flunitrazepam	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> FO <sub>3</sub>	1.8	166.9 ± 1.8
4	Nordazepam	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O	2.9	314.2 ± 22.3
	Diazepam	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> ClO	1.6	129.2 ± 11.6
5	Amitriptyline	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N	4.8	166.2 ± 23.6

<sup>a</sup>Not quantified, only detected.



Most multi-targeted methods for analyzing these or more compounds use separative techniques such as LC before MS determination, usually with multiple reaction monitoring (MRM) as a highly selective data acquisition mode [9,43-44]. These approaches could result in better sensitivity for quantification, but they only allow to determine target analytes, therefore, the information about the presence of other compounds of interest is missed. The proposed method allows the screening of compounds that were not targeted using the same data obtained to quantify targeted analytes. By using this approach, tramadol, an opioid drug used for the treatment of moderate to severe pain, and its metabolite N-desmethyltramadol were detected in an analyzed sample. Mass errors observed for these compounds were 0.4 ppm for tramadol and 4 ppm for its metabolite. Fragmentation data was also used for compound identification by comparing with the spectra available in the MassBank High Quality Mass Spectral Database. This is an advantage of using HRMS instruments since exact mass and fragmentation data can be obtained for qualitative analysis of untargeted molecules [5,42], with the limitations given by the sample preparation process.

### **3.4. Conclusion**

The use of the direct MEPS-MS method for forensic toxicological analysis was achieved through the direct coupling of a C8 MEPS syringe attached to the ESI source of a quadrupole time-of-flight mass spectrometer. With this arrangement, developing the simultaneous elution and ionization of the analytes into the MS was possible. The developed method was validated for the analysis of 7 benzodiazepines and 5 tricyclic antidepressants with appropriate results for linearity, accuracy, and repeatability. The developed method allows the determination of 7 benzodiazepines and 5 tricyclic antidepressants with appropriate results for linearity, accuracy, and repeatability. This approach reduced considerably the time required for each analysis and the organic solvent consumption. Future perspectives include further automatization of coupled MEPS sample preparation and the MS analysis to determine a wider number of drugs and pharmaceuticals. Although postmortem blood was the evaluated matrix in this investigation, the method could be validated for its use in other biological matrices such as urine or oral fluid.

### **3.5. Acknowledgments**

The authors would like to thank Servicio Médico Legal of Concepción, Chile for their collaboration in this investigation and to the Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), Chile for the financial support through the Beca Doctorado Nacional 21170443 program and the projects Fondecyt EQM-170023 and Fondecyt 1191276.

### **3.6. Supplementary information**

#### **3.6.1. Study of the MEPS material**

The extraction conditions were evaluated using an aqueous standard solution containing the analytes at a final concentration of 1000 ng/mL. Prazepam was used as the internal standard at 500 ng/mL for all measurements. The experiments were carried out at pH 3 for each different MEPS cartridge. The MEPS loading volume was fixed at 100  $\mu$ L in all experiments. To avoid carryover, a washing step consisting of 4 cycles with the acid aqueous solution at pH 3 and 4 cycles with acetonitrile was used after each extraction with C8 and C18 cartridges. For the M1 sorbent the washing solvents were 1%  $\text{NH}_4\text{OH}$  in acetonitrile and 1% formic acid in 10% isopropanol. Acetonitrile with 0.1% of formic acid was used as elution solvent. An UHPLC-QqTOF-MS method described below was used for this study and the response for the extraction efficiency was considered as the analyte/IS area ratio ( $A/A_{\text{IS}}$ ). A better efficiency was considered as a higher relative area and lower relative standard deviation (%RSD).

#### **3.6.2. UHPLC-QqTOF-MS method for MEPS sorbent selection**

After the extraction of each solution by MEPS, a chromatographic method was used to analyze the resulting extracts and measure the obtained results of each

experiment. An UHPLC Elute LC system (Bruker Daltonics GmbH, Germany) was used for this purpose. The chromatographic separation was achieved using a Waters BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7  $\mu$ m) at 35°C. Mobile phases were 0.1% formic acid as solvent A and acetonitrile with 0.1% formic acid as solvent B. The gradient program started at 0% of solvent B for 1 minute, followed by an increase to 20% of B in 1 minute, then to 55% of B in 10 minutes and finally to 100% of B in 1 minute, holding for 3 minutes and then back to initial conditions for a total run time with column equilibration of 18 minutes. Flow rate was 0.3 mL/min and the injection volume was 10  $\mu$ L in partial loop injection mode. The mass spectrometer was a Compact QqTOF mass analyzer (Bruker Daltonics GmbH, Germany) with an ESI source. 20  $\mu$ L of sodium formate 10 mM in water/isopropanol (1:1) was injected at the beginning of each analysis as internal calibration. Nitrogen was used as nebulizer, drying and collision gas. The MS conditions were as follows: nebulizer gas pressure: 4.0 bar, dry gas flow rate: 9 L/min, dry gas temperature: 200 °C, and capillary voltage: 4500 V. MS/MS spectra were collected in automatic data-dependant acquisition mode for the most intense detected ions. All MS analysis were carried out in positive ionization mode between 50–1000 m/z values. The software Bruker otofControl 4.1.402.322-7977-vc110 6.3.3.11 was used for data acquisition and instrument control and the software Compass DataAnalysis 4.4 software (Bruker Daltonics GmbH, Germany), for data processing.

3.6.3. Simultaneous determination of benzodiazepines and tricyclic antidepressants by direct MEPS-MS analysis

Table 3-S1. Precursor ions used for the analysis of each compound by direct MEPS-MS.

Compound	Molecular formula	Precursor ion [M+H] <sup>+</sup> (m/z)
Alprazolam	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> Cl	309.0907
Chlordiazepoxide	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>3</sub> O	300.0904
Clonazepam	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub> ClO <sub>3</sub>	316.0489
Diazepam	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> ClO	285.0795
Flunitrazepam	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> FO <sub>3</sub>	314.0941
Lorazepam	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	321.0197
Nitrazepam	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	282.0878
Nordazepam	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O	271.0638
Triazolam	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	343.0517
Amitriptyline	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N	278.1908
Clomipramine	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> Cl	315.1628
Desipramine	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub>	267.1861
Doxepin	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO	280.1701
Imipramine	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub>	281.2017

### 3.7. References

- [1] S. Broecker, S. Herre, B. Wüst, J. Zweigenbaum, F. Pragst, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 400 (1), 101–117. (<https://doi.org/10.1007/s00216-010-4450-9>).
- [2] K.M. Rentsch, *TrAC- Trends Anal. Chem.*, 2016, 84, 88–93. (<https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.028>).
- [3] E. Partridge, S. Trobbiani, P. Stockham, T. Scott, C. Kostakis, *J. Anal. Toxicol.*, 2018, 42 (4), 220-231 (<https://doi.org/10.1093/jat/bkx108>).
- [4] M. Grapp, C. Kaufmann, F. Streit, L. Binder, *Forensic Sci. Int.*, 2018, 287, 63–73. (<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.03.039>).
- [5] S. Bidny, K. Gago, P. Chung, D. Albertyn, D. Pasin, *J. Anal. Toxicol.*, 2017, 41, 181–195. (<https://doi.org/10.1093/jat/bkw118>).
- [6] J.M. Colby, K.L. Thoren, K.L. Lynch, *J. Anal. Toxicol.*, 2018, 42, 207–213. (<https://doi.org/10.1093/jat/bkx107>).
- [7] H.H. Maurer, *Ther. Drug Monit.*, 2018, 40, 389–393. (<https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000525>).
- [8] D. Remane, D.K. Wissenbach, F.T. Peters, *Clin. Biochem.*, 2016, 49 (13-14), 1051–1071. (<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.07.010>).
- [9] A.I. Al-Asmari, *Forensic Sci. Int.*, 2020, 309, 110193, (<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110193>).
- [10] J.A. Michely, M.R. Meyer, H.H. Maurer, *Anal. Chem.*, 2017, 89 (21), 11779–11786. (<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03398>).
- [11] A.M. Casas-Ferreira, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2017, 1043, 74–80. (<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.07.052>).
- [12] A. Khaled, J.R. Belinato, J. Pawliszyn, *Talanta*, 2020, 217, 121095. (<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121095>).

- [13] M. Dai, G. Huang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2020, 34 (10). (<https://doi.org/10.1002/rcm.8759>)
- [14] E. Nazdrajíc, M. Tascon, D.A. Rickert, G.A. Gómez-Ríos, V. Kulasingam, J. B. Pawliszyn, *Anal. Chim. Acta.*, 2021, 1144, 53–60. (<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.11.056>).
- [15] D.A. Rickert, G.A. Gómez-Ríos, E. Nazdrajíc, M. Tascon, V. Kulasingam, J. B. Pawliszyn, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, 412 (21), 5067–5076. (<https://doi.org/10.1002/rcm.7887>).
- [16] O.H. Drummer, *Encycl. Forensic Leg. Med. Second Ed.*, 2016, 608–614. (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800034-2.00380-3>).
- [17] A. Pouliopoulos, E. Tsakelidou, A. Krokos, H.G. Gika, G. Theodoridis, N. Raikos, *J. Anal. Toxicol.* 2018, 42 (5), 337–345. (<https://doi.org/10.1093/jat/bky006>).
- [18] [18] Y. He, M. Concheiro-Guisan, *Biomed. Chromatogr.* 2019, 33, 1–12. (<https://doi.org/10.1002/bmc.4444>).
- [19] A. Kabir, M. Locatelli, H. Ulusoy, *Separations*, 2017, 4 (4), 36. (<https://doi.org/10.3390/separations4040036>).
- [20] L. Yang, R. Said, M. Abdel-Rehim, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed, Life Sci.*, 2017, 1043, 33–43. (<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.044>).
- [21] M.M. Moein, R. Said, M. Abdel-Rehim, *Bioanalysis*, 2015, 7 (17), 2155–2161. (<https://doi.org/10.4155/bio.15.154>).
- [22] M. Abdel-Rehim, *Anal. Chim. Acta.*, 2011, 701 (2), 119–128. (<https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.05.037>).
- [23] G. Alves, M. Rodrigues, A. Fortuna, A. Falcão, J. Queiroz, *Bioanalysis*, 2013, 5 (11), 1409–1442. (<https://doi.org/10.4155/bio.13.92>).
- [24] J.A.M. Pereira, J. Gonçalves, P. Porto-Figueira, J.A. Figueira, V. Alves, R. Perestrelo, S. Medina, J.S. Câmara, *Analyst*, 2019, 144 (17) 5048–5074. (<https://doi.org/10.1039/C8AN02464B>).



- [25] P. Fernández, M. González, M. Regenjo, A.M. Ares, A.M. Fernández, R.A. Lorenzo, A.M. Carro, *J. Chromatogr. A.*, 2017, 1485, 8–19. (<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.021>).
- [26] M. Wóznikiewicz, R. Wietecha-Posłuszny, A. Moos, M. Wieczorek, P. Knihnicki, P. Kóscielniak, *J. Chromatogr. A.*, 2014, 1337, 9–16. (<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.037>).
- [27] R. Rocchi, M.C. Simeoni, C. Montesano, G. Vannutelli, R. Curini, M. Sergi, D. Compagnone, *Drug Test. Anal.*, 2018, 10 (5), 865–873. (<https://doi.org/10.1002/dta.2330>).
- [28] M. Prata, A. Ribeiro, D. Figueirinha, T. Rosado, D. Oppolzer, J. Restolho, A.R.T. S. Araújo, S. Costa, M. Barroso, E. Gallardo, *J. Chromatogr. A.*, 2019, 1602, 1–10. (<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.05.021>).
- [29] H. Vlcková, A. El-Beqqali, L. Nováková, P. Solich, M. Abdel-Rehim, *J. Sep. Sci.*, 2014, 37 (22), 3306–3313. (<https://doi.org/10.1002/jssc.201400523>).
- [30] E. Candish, A. Gooley, H.J. Wirth, P.A. Dawes, R.A. Shellie, E.F. Hilder, *J. Sep. Sci.*, 2012, 35 (18), 2399–2406. (<https://doi.org/10.1002/jssc.201200466>).
- [31] S.S. Sahota J. Singh G. Bansal R.K. Garg, *Curr. Sci.*, 2016, 110 (6), 1059–1062. (doi: 10.18520/cs/v110/i6/1059-1062)
- [32] E. Jagerdeo, M. Abdel-Rehim, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, 20 (5), 891–899. (<https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.01.010>).
- [33] Z. Altun, L.G. Blomberg, E. Jagerdeo, M. Abdel-Rehim, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2006, 29 (6), 829–839. (<https://doi.org/10.1080/10826070500530526>).
- [34] J.F. Collao, R. Favereau, R. Miranda, C. Aceitón, *Rev. Med. Chil.*, 2019, 147, 416–425. (<https://doi.org/10.4067/s0034-98872019000400416>).
- [35] M. Tominaga, T. Michiue, S. Oritani, T. Ishikawa, H. Maeda, *J. Anal. Toxicol.*, 2016, 40 (5), 367–373 (<https://doi.org/10.1093/jat/bkw028>).

- [36] M. Deville, N. Dubois, E. Cieckiewicz, P. De Tullio, E. Lemaire, C. Charlier, *Forensic Sci. Int.*, 2019, 299, 89–94. (<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.03.023>).
- [37] F. Bravo, R. Ulloa, K. Venegas, M.C. Contzen, D. Rios, M. Briceño, P. Buc Calderon, J. Benites, *J. Chil. Chem. Soc.*, 2014, 59, 2602–2605. (<https://doi.org/10.4067/S0717-97072014000300016>).
- [38] P.M. Nowak, R. Wietecha-Postuszny, J. Pawliszyn, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2021, 138, 116223. (<https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116223>).
- [39] M. Schulz, S. Iwersen-bergmann, H. Andresen, A. Schmoltdt, *Crit. Care.*, 2012, 16, 2–5. (<https://doi.org/10.1186/cc11441>).
- [40] R. Jett, C. Skaggs, N.E. Manicke, *Anal. Methods.*, 2017, 9 (34), 5037–5043. (<https://doi.org/10.1039/C7AY01009E>).
- [41] D.K. Molina, *J. Forensic Sci.*, 2010, 55 (2), 565. (<https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01314.x>).
- [42] A.T. Roemmelt, A.E. Steuer, M. Poetzsch, T. Kraemer, *Anal. Chem.*, 2014, 86 (23), 11742–11749. (<https://doi.org/10.1021/ac503144p>).
- [43] C. Sempio, L. Morini, C. Vignali, A. Groppi, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2014, 970, 1–7. (<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.08.039>).
- [44] M. De Boeck, S. Missotten, W. Dehaen, J. Tytgat, E. Cuypers, *Forensic Sci. Int.*, 2017, 274, 44–54. (<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.12.026>).
- [45] O. González, M.E. Blanco, G. Iriarte, L. Bartolomé, M.I. Maguregui, R.M. Alonso, *J. Chromatogr. A.*, 2014, 1353, 10–27. (<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.077>).

**CAPÍTULO 4: AGUJAS HIPODÉRMICAS RECUBIERTAS CON  
POLIDOPAMINA COMO DISPOSITIVOS PARA MICROEXTRACCIÓN  
PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS EN  
FLÚIDO ORAL POR MS/MS POR INFUSIÓN DIRECTA**

En este capítulo se presentan los resultados que dieron origen al siguiente artículo, publicado en RSC Advances en junio del 2021 (doi: <https://doi.org/10.1039/D1RA02721B>).

**Polydopamine coated hypodermic needles as a microextraction device  
for the determination of tricyclic antidepressants in oral fluid by direct  
infusion MS/MS**

Carmina Vejar-Vivar,<sup>a,b</sup> María Teresa García-Valverde,<sup>a</sup> Claudia Mardones,<sup>b</sup> Rafael Lucena,<sup>a\*</sup> and Soledad Cárdenas<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Affordable and Sustainable Sample Preparation (AS<sub>2</sub>P) Research group. Departamento de Química Analítica, Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica IUNAN, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Marie Curie, E-14071 Córdoba, España.*

<sup>b</sup> *Departamento de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Casilla 237, Correo 3, Concepción, Chile*

## Abstract

In-needle microextraction consists of the confinement of the sorbent, by coating or packing, inside a metallic needle. The size of the needles reduces the eluent requirements providing an efficient preconcentration of the analytes. In this work, hypodermic needles coated with polydopamine (PDA) are presented as microextraction devices to isolate six tricyclic antidepressants from oral fluid samples. The coating consists of the in-surface polymerization of dopamine at pH 8.5 and mild conditions (room temperature and water as solvent). The PDA coating over the stainless-steel surface confers the needles with a high extraction ability towards the target analytes. After the extraction, the eluates were analyzed by direct infusion MS spectrometry, working in multiple reaction monitoring (MRM) mode, which provided a sample throughput of 30 samples per hour. The variables affecting the synthesis (number of coating cycles, the concentration of dopamine, and needle surface pre-treatment) and the extraction (sample salinity, sample loading cycles, and the number of elution strokes) were studied in depth. Under the optimum conditions, a matrix-matched calibration model was built. The limits of quantification are between 2 and 5 ng mL<sup>-1</sup> with linear ranges up to 1000 ng mL<sup>-1</sup> for all analytes. The precision, expressed as relative standard deviation (RSD), is better than 10% for all analytes. Accuracy was calculated as recovery, and the obtained values are between 84% and 107%. A single-blind assay was also performed to evaluate the suitability of the method for real application.

#### **4.1. Introduction**

Tricyclic antidepressants (TCAs) are psychoactive drugs used to treat depression and other psychiatric disorders such as anxiety and phobias [1]. Lately, they have also been used to treat other conditions like chronic pain and migraine [2]. The determination of TCAs in biological samples is of great importance in clinical and forensic toxicology [3]. The high variability of the treatment response makes it important to control drug levels for each patient. Therapeutic drug monitoring of TCAs is highly recommended because of TCAs' narrow therapeutic window, given the risk of cardiac and central nervous system toxicity [4]. TCAs should also be controlled since they may cause sedation and could affect cognitive and psychomotor functioning. In fact, they are considered driving-impairing medicines [5].

Although blood, plasma, or urine are the common bioanalytical specimens for determining antidepressants and other pharmaceuticals [6-11], oral fluid (OF) has demonstrated many advantages as an alternative matrix. OF is easy to be collected and presents high stability if properly stored. Human OF can be produced at a rate up to  $6 \text{ mL min}^{-1}$  [12], making multisampling possible for repetitive or periodical analysis, such as pharmacodynamics studies. Besides, the concentration of drugs in OF and plasma are usually correlated [13-14], which is of paramount importance as the plasma concentration defines the actual therapeutic or toxic effects. However, OF analysis faces the same challenges

observed for conventional biosamples, namely: the low concentration of the analytes and the high presence of interferents [15]. The extraction of TCAs from OF by solid-phase extraction [16] and liquid-liquid extraction [17] has been reported as suitable approaches to overcome both issues.

In-needle microextraction techniques consist of the confinement of the sorbent inside a metallic needle. The sorbent can be coated as a thin film on the inner surface of the needle [18-20] or packed (as particles or monolith) inside it [21-23]. In both cases, the technique allows the sample to flow through the sorbent boosting the interaction with the target analytes. The miniaturized size of the needles requires little solvent for the elution, even when high sample volumes are processed, which is particularly interesting for an efficient preconcentration. In-needle microextraction, often named as needle trap, has been extensively used in biological [20,24-26], food [27-28], and environmental analysis [29]. The technique is commonly combined with a previous headspace step, as a clean-up step, when complex samples are processed [25-28]. Abdel-Rehim *et al.* reported using molecularly imprinted polymers as a strategy to overcome the sample complexity, thus allowing the direct extraction of urine samples [24]. The search for new materials is of great interest to improve the performance and expand the application scope of the technique [30].

Hypodermic needles (HN) are cheap and disposable materials extensively used in medicine. HNs have been mainly used to house the extraction probes for *in-*

*vivo* approaches in the sample preparation context [31-33]. In this article, the use of HNs as the actual microextraction device is presented. The surface of a stainless-steel needle is coated with polydopamine (PDA), a very promising sorbent [34]. PDA is a highly adhesive polymer that can be easily obtained by the *in-situ* oxidative polymerization of dopamine, a small catecholamine [35]. Inspired by mussel adhesive proteins, Lee *et al.* developed a single-step surface modification method based on the dip-coating in an alkaline dopamine solution [36]. The self-polymerization of dopamine can be used to deposit a thin film of PDA on a wide variety of organic and inorganic materials. The chemical structure of PDA is still under discussion, but the adhesion properties are related to the presence of many catechols and amine groups [37]. Although the synthetic mechanism is not fully described, this method is a versatile and straightforward coating procedure [38]. These advantages, added to its unique chemical and physical properties, allow its application in various fields, such as chemical, biological, medical, and materials sciences [39]. In the microextraction field, PDA has been used to coat nickel foam [40] and cellulose substrates [41-42]. Also it has been combined with nanomaterials like graphene [43] or magnetic nanoparticles [44-45].

In this article, PDA coated HNs are proposed as microextraction devices to isolate six TCAs from oral fluid samples. The low price and availability of the HNs and the simple coating process allow to develop individual extraction units for each

sample. This disposability results essential in bioanalysis to avoid cross contamination and reduce the risks associated to the continuous exposure to the analysts to biosamples. The needles were attached to a plastic syringe or a micropipette, depending on the specific step of the extraction protocol, to handle the different solutions. The analytes are determined by direct infusion mass spectrometry (MS), which increased the sample throughput up to 30 samples per hour, guaranteeing a good selectivity level.

## **4.2. Experimental**

### 4.2.1. Reagents and materials

All reagents were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), unless otherwise indicated. Stock standard solutions of the tricyclic antidepressants (clomipramine, trimipramine, imipramine, amitriptyline, desipramine, and nortriptyline) were prepared in methanol at a concentration of 5000 mg L<sup>-1</sup> and stored at 4 °C. Working standard solutions were prepared by diluting the stock solutions in milli-Q water (Millipore Corp., Madrid, Spain) or oral fluid samples. Deuterated clomipramine-d<sub>3</sub>, desipramine-d<sub>3</sub>, and nortriptyline-d<sub>3</sub> were used as the internal standards (IS) for MS measurements. A stock solution containing the three IS was prepared in methanol at a concentration of 10 mg L<sup>-1</sup> and stored at -20 °C.



Ammonia and sodium sulphate solutions were used for pH and ionic strength adjustment of aqueous solutions (standards and samples), respectively. Trizma<sup>®</sup> buffer, dopamine, and sodium hydroxide solutions were employed for the coating of hypodermic needles of 40 mm in length and 0.8 mm in diameter (Becton Dickinson, Huesca, Spain) with a PDA layer. Acetonitrile, milli-Q water, and acetic acid were used as solvents for direct infusion MS analysis.

#### 4.2.2. Oral fluid sample collection

For the optimization, blank oral fluid samples were collected using the Salivette<sup>®</sup> sampler (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), which consists of a cotton roll that is introduced into the patient's mouth for at least 2 min without chewing. The rolls were then squeezed with a disposable 5 mL plastic syringe, and the recovered oral fluid was stored in glass vials at 4 °C until analysis. Because of the current world's sanitary situation (SARS-CoV-2 pandemic), oral fluid samples were donated only by the first author of this publication. For real samples analysis, including the matrix-matched calibration, using a cotton pad for sampling is not recommended for compounds with amine groups since a strong interaction between the analytes and the cellulose substrate has been found [46]. For this purpose, the spitting method is proposed for sample acquisition [47].

Blank oral fluid samples spiked with the analytes were finally used for matrix-matched calibration. Before analysis, oral fluid was diluted at 1:1 ratio with a

solution of 2% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to adjust the salinity to approximately 12 mmho cm<sup>-1</sup>. The pH was also adjusted to 10 with dilute ammonia solution.

#### 4.2.3. Preparation of PDA-coated hypodermic needles

Stainless-steel HNs were immersed at a depth of approximately 2.5 cm into a solution of dopamine (2 mg mL<sup>-1</sup>) freshly prepared in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5). The solution was magnetically stirred for 24 h at room temperature to allow the deposition of a PDA layer on the SS surface. The HNs were washed with Milli-Q water and subjected to ultrasound sonication for 5 min to remove the non-bonded PDA. After washing, the modified HNs were dried in an oven for 5 min. They then were left at room temperature until being used.

#### 4.2.4. Microextraction procedure

The design of the PDA-coated needles (PDA-HNs) permits the solutions to flow through their inner volume. For sample processing, the PDA-HN was directly attached to a 2 mL plastic syringe by the conventional Luer connector. For needle conditioning and elution, when a lower volume of solutions is required, the needle was attached to a 10-100 µL Labmate-Pro micropipette. The upper part (approximately 2.5 cm in length) of a plastic 200 µL pipette tip is used as a connector, as shown in Figure 4-1.

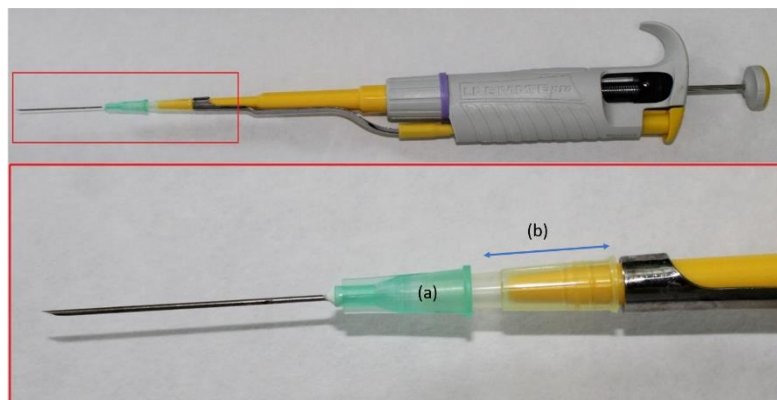


Fig. 4-1. Image of the attachment of the PDA-coated hypodermic needle to the micropipette. This approach is used for needle conditioning and elution when a lower volume of solutions is required. For sample processing, however, the needle is attached to a 2 mL disposable plastic syringe.

The sample preparation was achieved as follows: first, the PDA-HN was conditioned by the aspiration and ejection of 100  $\mu$ L of methanol followed by 100  $\mu$ L of an alkaline aqueous solution (pH = 10) using the micropipette. A volume of 2 mL of diluted oral fluid, which contained the deuterated standards at a final concentration of 50 ng/mL each, was placed into a centrifuge tube. Then, the sample was drawn and ejected 5 times (each time is named extraction cycle), using the 2 mL plastic syringe. The PDA-HN was then attached to the pipette again and two washing steps using 100  $\mu$ L of the alkaline aqueous solution (pH 10) were performed. Finally, the needle was eluted in a single stroke with 200  $\mu$ L of methanol, collected in an HPLC vial. A volume of 5  $\mu$ L of the extract was analyzed by direct infusion MS for identification and quantification of the analytes.

#### 4.2.5. Direct infusion MS analysis

All analyses were performed into an Agilent 6420 Triple Quadrupole MS with an electrospray source working in the positive ionization mode. A carrier phase (90% ACN with 0.1% acetic acid) at a 2 mL min<sup>-1</sup> rate was used for driving the analytes to the spectrometer providing a sample throughput of 30 samples per hour. The general MS operating conditions were set as follows: the capillary voltage was established at 2000 V, the flow rate of the drying gas (N<sub>2</sub>) was 9 mL min<sup>-1</sup>, its temperature was set at 300 °C, and the nebulizer pressure was 40 psi. Agilent MassHunter Software (version B.06.00, Santa Clara, CA, USA) was used for data analysis. The detection was achieved by Multiple Reaction Monitoring (MRM) transitions, and the specified parameters for each analyte and internal standards are presented in Table 4-S1 (Supplementary information).

The quantitative results were expressed as the ratio between the analyte and the internal standard areas. Clomipramine, desipramine, and nortriptyline were corrected by their corresponding deuterated labeled compounds while clomipramine-d<sub>3</sub> was also used for correcting the signals from trimipramine, imipramine, and amitriptyline.

### **4.3. Results and discussion**

#### 4.3.1. Optimization of the coating procedure

The optimization of the PDA coating process considered three different variables, namely: the number of coating cycles, the concentration of dopamine, and HN surface pre-treatment. All these variables were evaluated following a simple extraction procedure that is described in detail in the supplementary information.

The number of coating cycles needed to obtain an efficient coverage of the needle with PDA was initially evaluated. Each coating cycle consisted of immersing the HN to a depth of approximately 2.5 cm into a freshly prepared dopamine solution ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ) for 24 h under magnetic stirring. This variable was evaluated at four different levels, namely: 0 (uncoated needles), 1, 2, and 3 cycles. The results, shown in Figure 4-2, indicate the negligible capacity of uncoated needles to extract the analytes and the pivotal role of PDA for the efficient isolation of the compounds. Although for some analytes (clomipramine and imipramine) a better extraction can be achieved for larger coating cycles, one coating cycle was selected as the optimum value to save resources (dopamine, energy) and make the synthesis faster.

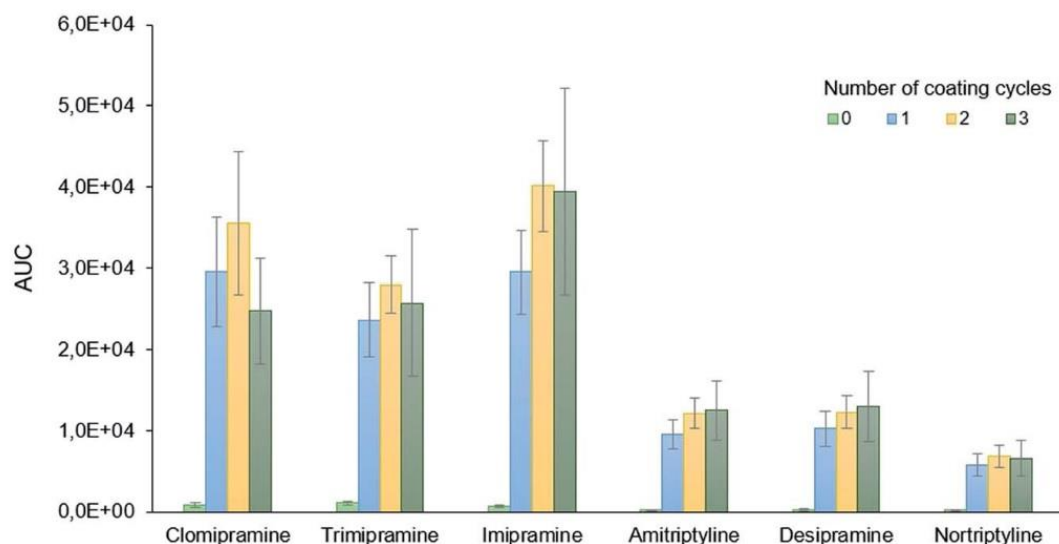


Fig. 4-2. Effect of the PDA-coating cycles on the extraction of the target analytes. The results are presented as the area under the curve (AUC) values once the MRM transition for each analyte is isolated.

The concentration of dopamine in the precursor solution may impact the HN coating, and it was studied at three different levels (2, 4, and 6 g L<sup>-1</sup>). As it is shown in Figure 4-S1, the extraction capability of the PDA-HN decreases as the concentration of dopamine increased. This result could be explained since a higher concentration of dopamine in solution may favor the bulk polymerization over the PDA deposition on the stainless-steel needle, resulting in a more ineffective coating. In fact, the more concentrated solutions (4 and 6 g L<sup>-1</sup>) becomes darker during the synthesis due to the aggregation of PDA in the solution.

Commercial HNs are coated with a thin layer of silicone oil to reduce friction during skin penetration. Although the experiments mentioned above have demonstrated the capability of PDA-coated needles for the extraction of TCAs, two different surface treatments previous to the HNs coating were evaluated to ensure optimal functionalization. The first one consisted of the sonication of the needles in an aqueous solution of  $\text{HNO}_3$  (32.5% v/v) for 15 minutes to obtain a surface rich in hydroxyl groups [48]. The second pre-treatment involved the sonication of the HN with toluene for 15 minutes to eliminate the silicone layer. As observed in Figure 4-S2, the best results are obtained for the needles without any pre-treatment before being coated with PDA. For some analytes, such as clomipramine or nortriptyline, a slight improvement in the signal may be noticed for the extraction using needles treated with  $\text{HNO}_3$ . These results indicate that the potential presence of silicon oil does not interfere in the deposition of PDA over the needle surface. For simplicity, no pre-treatment was applied to the HNs in further studies.

#### 4.3.2. Optimization of the extraction method

The extraction performance was optimized considering the effect of three variables, namely: ionic strength, sample loading cycles, and the number of elution strokes. The pH was fixed at 10 to assess that the analytes are mainly in their non-protonated form. The sample volume was established at 2 mL, an affordable volume for oral fluid analysis, especially if the oral fluid needs to be

diluted before its processing. Aqueous standards containing the analytes at a final concentration of  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  were processed following the general workflow presented in Section 4.2.4.

The ionic strength of the sample may have a thermodynamic (salting-out effect) and kinetic (reducing the diffusion rates of the analytes) impact on the extraction. The effect of the salinity was evaluated by extracting 5 standard solutions with increasing concentrations of  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , selected as the model electrolyte, in the range from 0 to 2%. These  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  concentrations were transformed into salinity units (in the  $0.03\text{-}19.18 \text{ mmho cm}^{-1}$  interval) using a conductometer. As it is shown in Figure 4-S3, the presence of salt negatively affects the extraction of the analytes. However, the extraction performance remained almost constant for concentrations higher than 1%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (salinity over  $10.8 \text{ mmho cm}^{-1}$ ). Oral fluid samples have their own salinity, which is *ca.*  $2.13 \text{ mmho cm}^{-1}$  (average value obtained after measuring different oral fluid pools) when oral fluid is 1:1 diluted in alkaline water. This 1:1 dilution has been found to be an adequate ratio in our previous works to reduce the oral fluid viscosity for an appropriate extraction. To minimize the salinity effect on the extraction, it should be adjusted to a value between 10 and  $15 \text{ mmho cm}^{-1}$  when analyzing real samples.

The extraction cycles, defined as the times the sample is drawn and ejected from the 2 mL syringe, were evaluated from 1 to 10. As is shown in Figure 4-3, the extraction efficiency increased with the number of cycles. For clomipramine,



trimipramine, and amitriptyline, a decrease is observed from 5 to 10 cycles, while a slight increase is observed for the rest of the analytes. The precision values and the sample throughput, however, are better for 5 cycles which were finally selected as the optimum conditions.

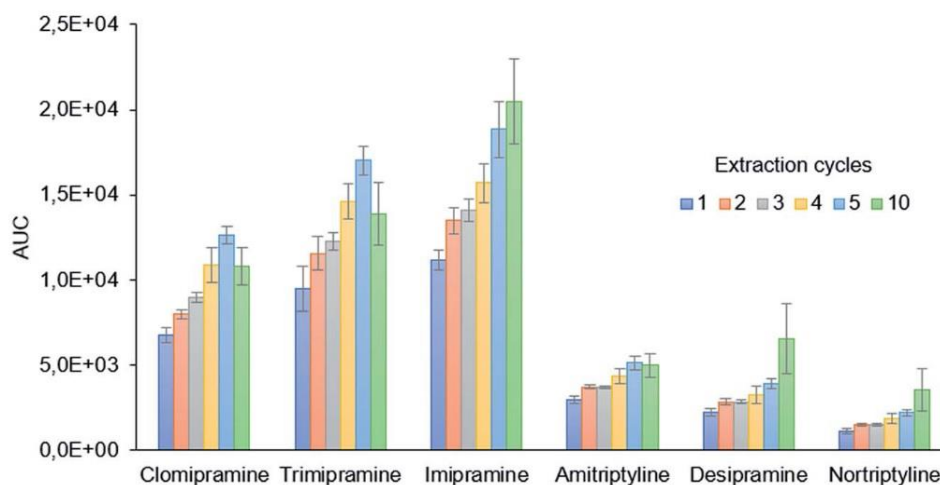


Fig. 4-3. Study of the effect of the sample extraction cycles on extraction efficiency.

Finally, the number of elution strokes was evaluated. The results showed (Figure 4-S4) that a single stroke was enough to obtain an efficient elution of the TCAs for MS analysis.

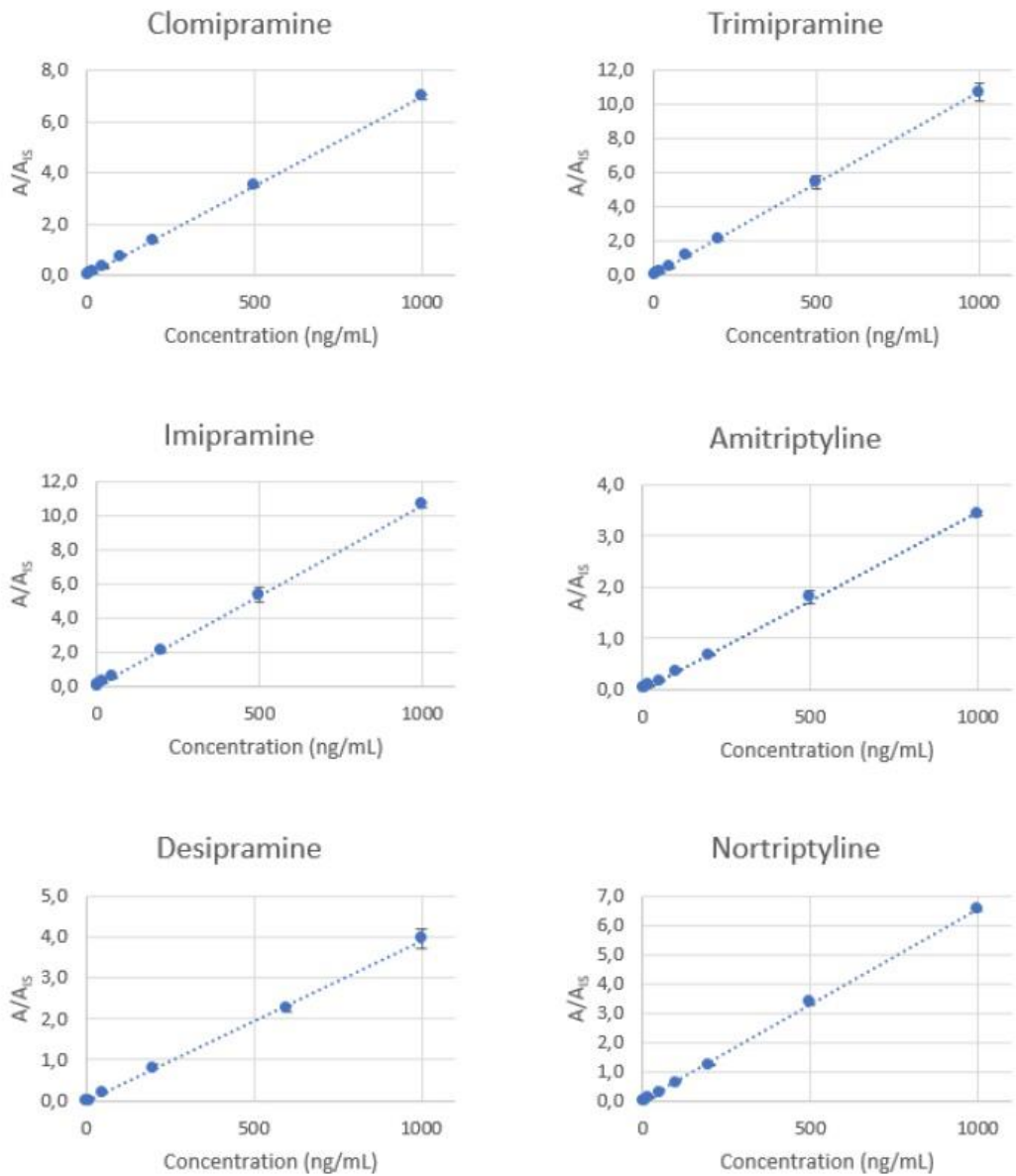


Fig. 4-4. Calibration curves obtained for each analyte by representing the analyte/IS area ratio against the concentration of the analytes. Each point represents the average of three independent measurements, and error bars illustrate the standard deviation of the corresponding mean value.

#### 4.3.3. Method validation

The developed analytical method was validated in terms of linearity, sensitivity, precision, and accuracy using matrix-matched calibration curves for each antidepressant. Oral fluid samples were initially 1:1 v:v diluted with a solution of 2% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to adjust the salinity to approximately 12 mmho cm<sup>-1</sup>. The pH was also adjusted to 10 with dilute ammonia solution. These standards were spiked with the target analytes at seven concentration levels up to 1000 ng mL<sup>-1</sup>, maintaining the concentration of the three IS at 50 ng mL<sup>-1</sup>. Each standard was processed following the optimized microextraction workflow, and the final extracts were analyzed by direct infusion mass spectrometry. The calibration curves obtained by representing the analyte/IS area ratio *versus* the concentration are shown in Figure 4-4, while the slope, intercept, and  $R^2$  values are summarized in Table 4-S2.

Good linearity values ( $R^2 > 0.99$ ) were achieved for all the analytes. Limits of quantification (LOQ) are defined as the lower concentration that could be determined with a relative standard deviation (RSD) less than 20%, presenting a signal to noise ratio higher than 10. These values were between 2 and 5 ng mL<sup>-1</sup> for all analytes. The precision of the method was expressed as the relative standard deviation (RSD) and was calculated from oral fluid samples spiked at three different concentration levels (6, 60, and 600 ng mL<sup>-1</sup>) and analyzed in triplicate. The obtained RSD values ranged from 2.1% to 9.6%. A recovery study

was done using an independent oral fluid pool, and the results were found to be between 84% and 107%, showing a good accuracy level. Each extraction was performed using independent PDA-coated needles, so batch-to-batch reproducibility could also be evaluated. Table 4-1 summarizes the figures of merit of the method.

Table 4-1. Figures of merit of the developed analytical method for the determination of TCAs in oral fluid.

Analyte	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	R <sup>2</sup>	Linear range (ng/mL)	RSD (% n = 3)			Recovery (% n = 3)		
					6 ng/L	60 ng/L	600 ng/L	6 ng/L	60 ng/L	600 ng/L
Clomipramine	1.5	5	0.9997	5 - 1000	2.2	2.1	4.7	95 ± 2	99 ± 2	92 ± 4
Trimipramine	1.5	5	0.9969	5 - 1000	7.2	6.0	7.1	101 ± 6	87 ± 5	95 ± 7
Imipramine	0.6	2	0.9983	2 - 1000	6.6	3.2	2.1	100 ± 8	106 ± 3	98 ± 2
Amitriptyline	1.5	5	0.9984	5 - 1000	9.6	2.8	2.1	96 ± 11	94 ± 3	95 ± 2
Desipramine	0.6	2	0.9966	2 - 1000	9.6	2.8	2.1	90 ± 10	84 ± 2	84 ± 2
Nortriptyline	1.5	5	0.9994	5 - 1000	3.0	4.6	3.6	92 ± 3	107 ± 5	96 ± 3

<sup>a</sup>LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; RSD, relative standard deviation.

Table 4-2 compares the sensitivity of the proposed method with other alternatives reported for the determination of tricyclic antidepressants in biofluids, including saliva, urine, plasma and blood [1,6-7,9,12,16,49-53]. Our method provides a

wider linear range, allowing the determination of the target compounds at the therapeutic level. In the oral fluid applications, the sensitivity of the new method is intermediate and only surpassed by the method based on high-resolution MS, although the latter provided a narrower linearity range. The reported methods made use of a previous separation (by gas or liquid chromatography) of the analytes, thus providing an enhanced selectivity. However, this enhancement is done at the expense of the analysis time. The use of the direct infusion MS provides a high sample throughput, and the chromatographic selectivity is compensated by an efficient extraction and the use of MS as the instrumental technique.

#### 4.3.4. Application of the developed method for TCA analysis in oral fluid

Since no positive samples for these analytes were available to evaluate the validated method, a “single-blind” analysis was performed. For this purpose, an analyst prepared six “blind” samples by spiking blank oral fluid with different concentrations of the target analytes, while a different analyst for whom the composition and concentration of each sample were unknown, performed the extraction and analysis of the samples. The method allowed the correct identification of all analytes in all samples, while the recovery values are also calculated (Table 4-3) with achieved values ranging between  $77 \pm 1$  ng/mL for clomipramine in sample 6 and  $119 \pm 8$  ng/mL for imipramine in sample 3.

Table 4-2. Comparison of the sensitivity of the proposed method with other counterparts reported for the determination of tricyclic antidepressants in biofluids

Matrix	Sample preparation	Instrumental technique	Analytes	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Linear range	Ref.
Oral fluid	PDA coated in-needle microextraction	LC-MS/MS	Clomipramine	1.5	5	5 - 1000	This paper
			Trimipramine	1.5	5	5 - 1000	
			Imipramine	0.6	2	2 - 1000	
			Amitriptyline	1.5	5	5 - 1000	
			Desipramine	0.6	2	2 - 1000	
			Nortriptyline	1.5	5	5 - 1000	
Urine	MEPS (PDA-Ag-PPY)	GC-MS	Amitriptyline	0.03	0.10	0.03 - 100	1
			Imipramine	0.05	0.20	0.05 - 100	
Whole blood	Protein precipitation	LC-QTOF-MS	Amitriptyline	n.a.	25	25 - 600	6
			Clomipramine		20	20 - 900	
			Desipramine		50	50 - 600	
			Imipramine		20	20 - 600	
			Trimipramine		10	10 - 600	
Urine	poly(GMA-co-EDMA-MWCNTs) monolith pipette tip	LC-UV	Desipramine	9	14	14 - 1000	7
			Amitriptyline	15	30		
			Trimipramine	15	29		
Plasma	Cloud-point extraction	LC-MS/MS	Amitriptyline	n.a.	10	10-750	9
			Clomipramine				
			Desipramine				
			Imipramine				
			Nortriptyline				
			Trimipramine				

Oral fluid	MEPS (C8/SCX)	UHPLC-TOF-MS	Desipramine	0.04	0.14	2 - 10	12
			Nortriptyline	0.01	0.03		
			Imipramine	0.03	0.09		
			Amitriptyline	0.02	0.08		
Oral fluid	SPE (mixed mode Cerex® Trace-B cartridges)	LC-MS/MS	Amitriptyline	-	10	10 - 1000	16
			Clomipramine				
			Desipramine				
			Imipramine				
			Nortriptyline				
			Trimipramine				
Urine	MWCNTs SPE	LC-UV	Desipramine	40.6	135	-	49
			Imipramine	50.0	166		
			Nortriptyline	35.9	119		
			Amitriptyline	20.1	67		
			Trimipramine	30.0	97		
			Clomipramine	18.1	59		
Plasma	Liquid-liquid extraction	UHPLC-MS/MS	Amitriptyline	0.2	10	10 -1000	50
			Clomipramine	0.4	10		
			Desipramine	2.0	10		
			Imipramine	2.0	10		
			Nortriptyline	1.0	10		
Postmortem blood	Salting-out assisted liquid-liquid extraction	UPLC-QTOF-MS	Amitriptyline	0.010	0.05	0.05 - 2	51
			Clomipramine	0.005	0.05		
			Desipramine	0.010	0.05		
			Imipramine	0.005	0.05		
			Nortriptyline	0.010	0.05		
			Trimipramine	0.005	0.05		
Postmortem blood	Mini-QuEChERS	UHPLC-MS/MS	Amitriptyline	0.0003	0.001	0.001 - 0.500	52
			Nortriptyline	0.0003	0.001		

Whole blood	Supported extraction	liquid	UPLC-MS/MS	Imipramine	0.0030	0.010	0.001–200	53
				Desipramine	0.0003	0.001		
				Clomipramine	0.0003	0.001		
				Amitriptyline	0.0003	0.001		

<sup>a</sup>PDA-Ag-PPy, polydopamine, silver nanoparticles, and polypyrrole composite; MEPS, microextraction in packed syringe; poly-(GMA-co-EDMA- MWCNTs), poly-(methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) containing multiwalled carbon nanotubes; SPE, solid phase extraction; LC, liquid chromatography; UHPLC, ultrahigh pressure liquid chromatography; GC, gas chromatography; MS, mass spectrometry; QTOF, quadrupole time-of-flight; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification.



Table 4-3. Analysis of single-blind samples using the developed strategy

Spiked sample	Identified analyte	Spiked concentration (ng/mL)	Recovery (%)
1	Clomipramine	100	104 ± 68
	Amitriptyline	50	89 ± 9
2	Trimipramine	60	97 ± 6
	Nortriptyline	40	99 ± 4
3	Imipramine	250	119 ± 8
	Desipramine	150	106 ± 5
4	Clomipramine	50	102 ± 2
	Imipramine	370	117 ± 12
	Desipramine	350	89 ± 1
5	Trimipramine	100	93 ± 6
	Nortriptyline	80	103 ± 1
6	Clomipramine	500	77 ± 1
	Amitriptyline	300	96 ± 5

#### **4.4. Conclusion**

A microextraction device consisting of the coating of stainless-steel hypodermic needles with polydopamine is described in the present article. The extraction capability of the needles towards six TCA drugs in oral fluid is illustrated, demonstrating the pivotal role of the PDA coating in the analyte's isolation.

The coating of the HN is straightforward and reproducible, and it allows to obtain inexpensive and disposable extraction devices, which makes them highly suitable for bioanalysis. In fact, these features are relevant to avoid cross-contamination and unnecessary handling of biological materials.

PDA-HN were employed to extract clomipramine, trimipramine, imipramine, amitriptyline, desipramine, and nortriptyline from oral fluid samples, allowing the rapid and successful direct MS analysis of up to 30 samples per hour. The precision and accuracy of the measurements fulfill the quality criteria in bioanalysis.

The use of oral fluid as the sample presents several advantages compared to other matrixes like blood or urine, since its collection is non-invasive and uncomplicated, and it does not require an extensive sample treatment.

Although it has not been evaluated in this article, the biocompatibility of polydopamine opens the door to be in-vivo applied to make the simultaneous sampling and extraction possible.

#### **4.5. Acknowledgements**

Financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CTQ2017-83175R) is gratefully acknowledged. C. V.-V. expresses her gratitude to the Gobierno de Chile for the grant “Beca ANID Doctorado Nacional Folio No. 2117044”.

## 4.6. Supplementary information

### 4.6.1. Multiple Reaction Monitoring (MRM) transitions for the direct infusion MS analysis

Table 4-S1. Multiple reaction monitoring parameters for MS analyses

Analyte	Precursor ion [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Product ions (m/z)*	Collision energy (V)	Fragmentor voltage (V)
Clomipramine	315.2	<b>86.1</b>	18	114
		58.2	50	
Trimipramine	295.2	<b>100.2</b>	20	125
		58.2	40	
Imipramine	281.2	<b>86.1</b>	18	96
		58.2	50	
Amitriptyline	278.2	233.1	20	140
		<b>91.1</b>	40	
Desipramine	267.1	<b>72.2</b>	15	145
		44.2	20	
Nortriptyline	264.2	105.1	22	96
		<b>91.1</b>	30	
Clomipramine-d3 (IS)	318.2	<b>89.2</b>	18	132
		61.2	46	
Desipramine-d3 (IS)	270.2	193.0	42	132
		<b>75.2</b>	18	
Nortriptyline-d3 (IS)	267.2	105.1	22	96
		<b>91.1</b>	30	

\*Quantitation transition in bold

#### 4.6.2. Extraction procedure for the optimization of the pDA coating synthesis

For the optimization of the pDA coating procedure, a simple extraction method using hypodermic needles synthesized under different conditions was used for the extraction of clomipramine (CLO), trimipramine (TRI), imipramine (IMI), amitriptyline (AMI), desipramine (DES) and nortriptyline (NOR) from an aqueous solution (50 ng/mL) adjusted to pH 10 using  $\text{NH}_4\text{OH}$  (1 M). The extraction was carried out using an orbital shaker (1000 rpm). For conditioning, needles were first immersed in methanol for 30 s and then in an alkaline solution of ultrapure water adjusted to pH 10 with ammonia. Then, each needle was immersed into 5 mL of an aqueous analyte solution (50 ng/mL) for 30 min. Two washing steps were performed with ultrapure water (pH 10) prior to elution in 200  $\mu\text{L}$  of methanol into HPLC vials with insert. Finally, each vial was analysed by mass spectrometry. Take note that this extraction procedure evaluates the pDA attached to both the outer and inner surfaces of the needle.

#### 4.6.3. Optimization of the needle coating

The optimization of the pDA coating process considered three different variables, namely: number of coating cycles, concentration of dopamine and needle surface pre-treatment. Figure 4-S1 and 4-S2 shows the latter variables that are described and commented in the main text.

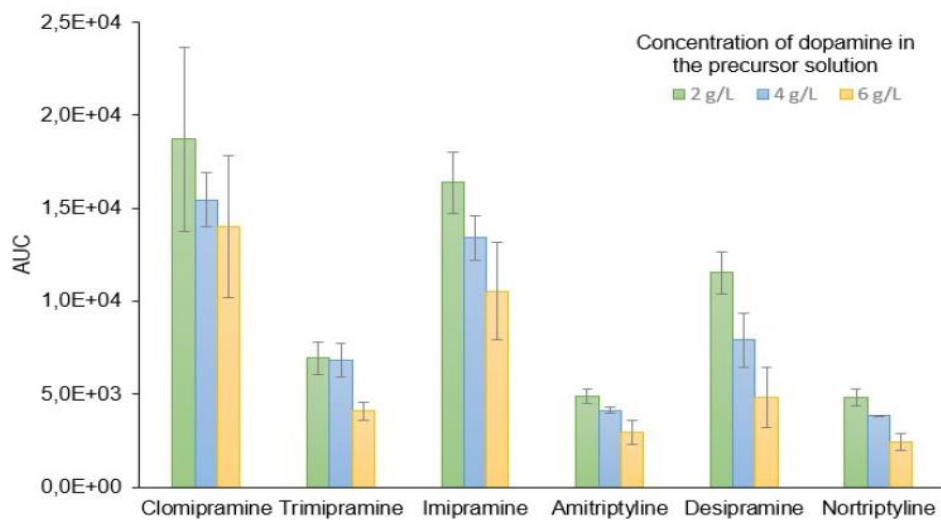


Fig. 4-S1. Extraction performance of needles synthesized using pDA precursor solutions with different concentration (2, 4 and 6 g/L).

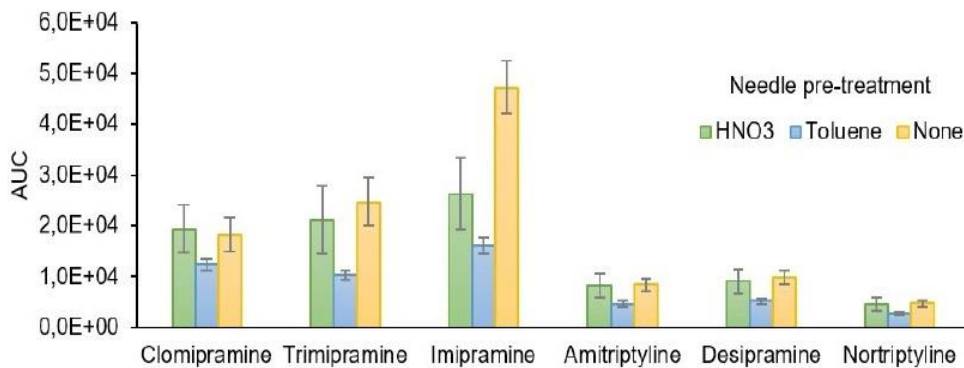


Fig. 4-S2. Study of the needle pre-treatment on the extraction capability of pDA coated needles. hypodermic needles on a 50 ng/mL solution of tricyclic antidepressants.

#### 4.6.4. Optimization of the microextraction procedure

The extraction performance was optimized considering the effect of three variables, namely: ionic strength, sample loading cycles, and the number of elution strokes. Figure 4-S3 presents the effect of the ionic strength, expressed as salinity (mmho/cm), on the extraction of the target compounds.

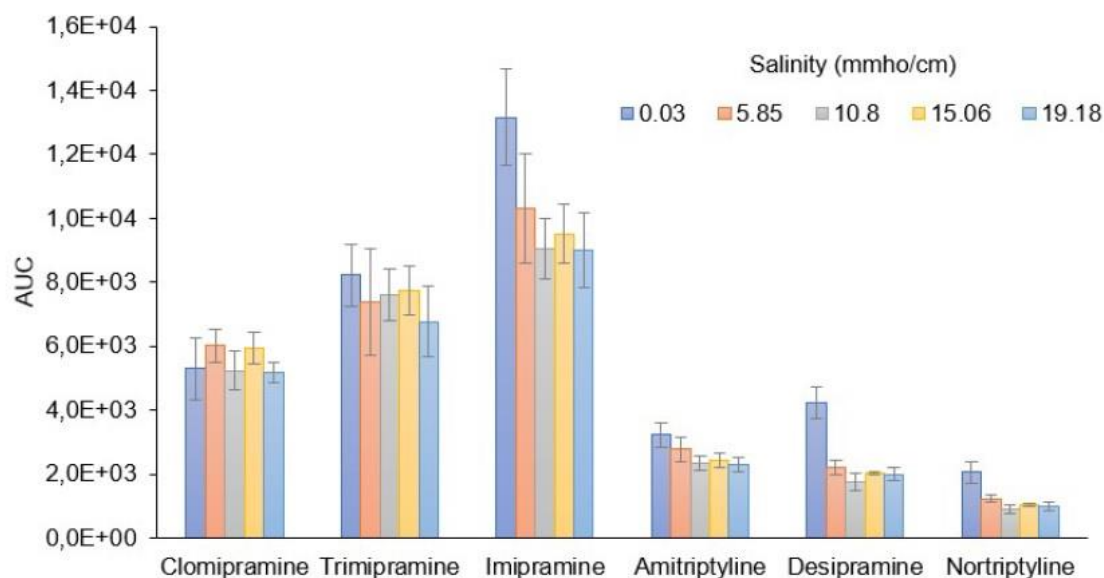


Fig. 4-S3. Study of the effect of ionic strength over the extraction efficiency of pDA-coated needles. The ionic strength is expressed in salinity units (mmho/cm).

Finally, the number of elution strokes was evaluated. The results showed (Figure 4-S4) that a single stroke was enough to obtain an efficient elution of the TCAs for MS analysis.

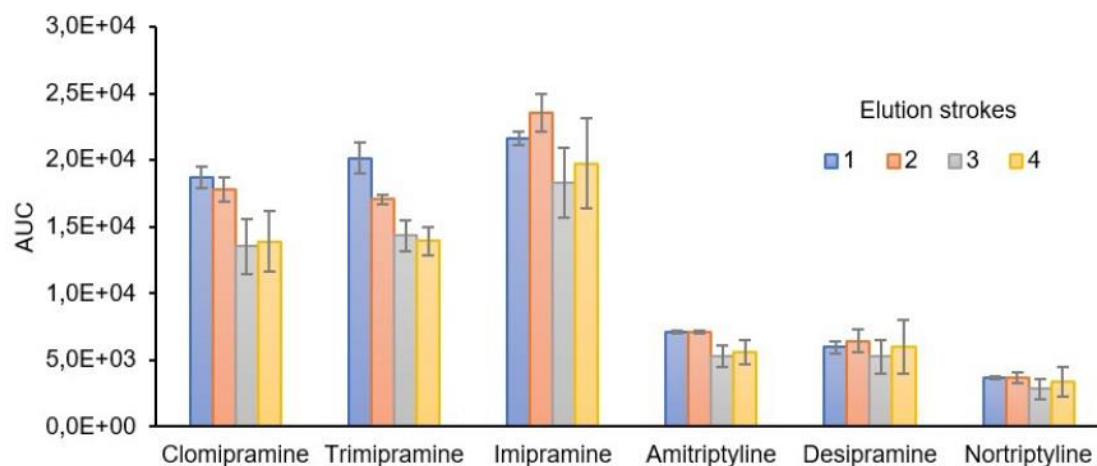


Fig. 4-S4. Study of the effect of elution strokes on the analytical signal.

#### 4.6.5. Calibration models

Table 4-S2. Regression results obtained for each target analyte.

Analyte	Slope	Intercept	R <sup>2</sup>
Clomipramine	0.0070	-0.0011	0.9997
Trimipramine	0.0107	-0.0090	0.9969
Imipramine	0.0106	0.0113	0.9983
Amitriptyline	0.0035	0.0036	0.9984
Desipramine	0.0039	0.0024	0.9966
Nortriptyline	0.0065	0.0019	0.9994



#### 4.7. References

- [1] H. Bagheri, S. Banihashemi and F. K. Zandian, *Microchim. Acta*, 2016, 183, 195–202. (<https://doi.org/10.1007/s00604-015-1606-5>).
- [2] C. Coulter, M. Taruc, J. Tuyay and C. Moore, *J. Anal. Toxicol.*, 2010, 34, 64–72. (<https://doi.org/10.1093/jat/34.2.64>).
- [3] N. Manousi and V. F. Samanidou, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2019, 20, 24–38. (<https://doi.org/10.2174/1389557519666190617150518>)
- [4] A. de Castro, M. Concheiro, O. Quintela, A. Cruz and M. López-Rivadulla, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, 48, 183–193. (<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.05.024>)
- [5] E. Gutiérrez-Abejón, F. Herrera-Gómez, P. Criado-Espejel and F. J. Álvarez, *Pharmaceuticals*, 2020, 13 (4), 61. (<https://doi.org/10.3390/ph13040061>).
- [6] A. T. Roemmelt, A. E. Steuer and T. Kraemer, *Anal. Chem.*, 2015, 87, 9294–9301. (<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02031>).
- [7] B. Fresco-Cala, Ó. Mompó-Roselló, E. F. Simó-Alfonso, S. Cárdenas and J. M. Herrero-Martínez, *Microchim. Acta*, 2018, 185, 127. (<https://doi.org/10.1007/s00604-017-2659-4>).
- [8] V. Alves, J. Gonçalves, C. Conceição, H. M. T. Câmara and J. S. Câmara, *J. Chromatogr. A*, 2015, 1408, 30–40. (<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.021>).
- [9] E. Gniazdowska, N. Korytowska, G. Kludka and J. Giebułtowiec, *Pharmaceuticals*, 2020, 13, 1–25. (<https://doi.org/10.3390/ph13120458>).
- [10] A. Luiz Oenning, L. Birk, S. Eller, T. Franco de Oliveira, J. Merib and E. Carasek, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2020, 1143, 122069. (<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122069>)

- [11] L. Mifsud Buhagiar, C. Sammut, Y. Chircop, K. Axisa, N. Sammut Bartolo, J. Vella Szijj, A. Serracino Inglott and G. LaFerla, *Biomed. Chromatogr.*, 2019, 33, 1–9. (<https://doi.org/10.1002/bmc.4679>).
- [12] M. Wóznikiewicz, R. Wietecha-Posłuszny, A. Moos, M. Wieczorek, P. Knihnicki and P. Kóscielniak, *J. Chromatogr. A*, 2014, 1337, 9–16. (<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.037>).
- [13] S. Chojnowska, T. Baran, I. Wilńska, P. Sienicka, I. Cabaj-Wiater and M. Knás, *Adv. Med. Sci.*, 2018, 63, 185–191. (<https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.11.002>).
- [14] E. Bassotti, G. M. Merone, A. D'Urso, F. Savini, M. Locatelli, A. Tartaglia, P. Dossetto, C. D'Ovidio and U. de Grazia, *Forensic Sci. Int.*, 2020, 312, 110330. (<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110330>).
- [15] R. Lucena, *J. Appl. Bioanal.*, 2015, 1, 72–75. (<https://doi.org/10.17145/jab.15.012>).
- [16] S. S. Shin, D. Borg and R. Stripp, *J. Anal. Toxicol.*, 2020, 44, 610–617. (<https://doi.org/10.1093/jat/bkz117>).
- [17] B. Desharnais, M. J. Lajoie, J. Laquerre, P. Mireault and C. D. Skinner, *Forensic Sci. Int.*, 2020, 317, 110506. (<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110506>).
- [18] H. Bagheri, E. Babanezhad and F. Khalilian, *Anal. Chim. Acta*, 2009, 634, 209–214. (<https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.12.047>).
- [19] D. Djozan, M. A. Farajzadeh, S. M. Sorouraddin, T. Baheri and J. Norouzi, *Chromatographia*, 2012, 75, 139–148. (<https://doi.org/10.1007/s10337-011-2173-5>).
- [20] Y. Li, J. Li and H. Xu, *RSC Adv.*, 2017, 7, 11959–11968. (<https://doi.org/10.1039/C6RA25453E>).
- [21] H. Bagheri, Z. Ayazi and A. Aghakhani, *Anal. Chim. Acta*, 2011, 683, 212–220. (<https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.10.026>).

- [22] Y. Yang, W. Mai, J. Gao, Z. Hu, J. Xu and S. Zou, *J. Sep. Sci.*, 2019, 42, 1750–1756. (<https://doi.org/10.1002/jssc.201801112>).
- [23] X. Zhang, J. Chen, L. Lian, X. Wang, X. Guo, H. Chen, B. Zhu, S. Hou and D. Lou, *Chromatographia*, 2019, 82, 953–960. (<https://doi.org/10.1007/s10337-019-03720-1>).
- [24] M. M. Moein, D. Jabbar, A. Colmsjö and M. Abdel-Rehim, *J. Chromatogr. A*, 2014, 1366, 15–23. (<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.012>).
- [25] P. Porto-Figueira, J. A. M. Pereira and J. S. Câmara, *Anal. Chim. Acta*, 2018, 1023, 53–63. (<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.027>).
- [26] J. Ghafari, M. Vahabi, S. F. Dehghan and R. Zendehtdel, *Biomed. Chromatogr.*, 2020, 34, e4924. (<https://doi.org/10.1002/bmc.4924>).
- [27] J. M. Warren, D.-R. Parkinson and J. Pawliszyn, *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61, 492–500. (<https://doi.org/10.1021/jf303508m>).
- [28] J. Chen, B. Zhang, D. Zheng, X. Dang, Y. Ai and H. Chen, *Anal. Methods*, 2018, 10, 5783–5789. (<https://doi.org/10.1039/C8AY01894D>).
- [29] H. Li, C. Bi, X. Li and Y. Xu, *Chemosphere*, 2020, 250, 126284. (<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126284>).
- [30] K. Kędziora and W. Wasiak, *J. Chromatogr. A*, 2017, 1505, 1–17. (<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.05.030>).
- [31] D. Vuckovic, I. de Lannoy, B. Gien, R. E. Shirey, L. M. Sidisky, S. Dutta and J. Pawliszyn, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, 50, 5344–5348. (<https://doi.org/10.1002/anie.201006715>).
- [32] P. Donabella, N. Rogers, R. Levin and F. M. Musteata, *Bioanalysis*, 2015, 7, 661–670. (<https://doi.org/10.4155/bio.15.7>).
- [33] B. Bojko, N. Looby, M. Olkowicz, A. Roszkowska, B. Kupcewicz, P. Reck dos Santos, K. Ramadan, S. Keshavjee, T. K. Waddell, G. Gómez-Ríos, M. Tascon, K. Gorýnski, M. Cypel and J. Pawliszyn, *J. Pharm. Anal.*, 2021, 11, 37–47. (<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.08.011>).

- [34] D. Che, J. Cheng, Z. Ji, S. Zhang, G. Li, Z. Sun and J. You, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2017, 97, 1–14. (<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.08.002>).
- [35] V. Ball, D. Del Frari, V. Toniazzo and D. Ruch, *J. Colloid Interface Sci.*, 2012, 386, 366–372. (<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.07.030>).
- [36] H. Lee, S. M. Dellatore, W. M. Miller and P. B. Messersmith, *Science*, 2007, 318, 426–430. (<https://doi.org/10.1126/science.1147241>).
- [37] J. Liebscher, *Eur. J. Org. Chem.*, 2019, 2019, 4976–4994. (<https://doi.org/10.1002/ejoc.201900445>).
- [38] J. H. Ryu, P. B. Messersmith and H. Lee, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, 10, 7523–7540. (<https://doi.org/10.1021/acsmi.7b19865>).
- [39] Y. Liu, K. Ai and L. Lu, *Chem. Rev.*, 2014, 114, 5057–5115. (<https://doi.org/10.1021/cr400407a>).
- [40] T. Sun, M. Wang, D. Wang and Z. Du, *Talanta*, 2020, 207, 120244. (<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120244>).
- [41] J. Feng, M. Sun, S. Han, X. Ji, C. Li, X. Wang and Y. Tian, *J. Sep. Sci.*, 2019, 42, 2163–2170. (<https://doi.org/10.1002/jssc.201801333>).
- [42] C. Ye, Y. Wu and Z. Wang, *RSC Adv.*, 2016, 6, 9066–9071. (<https://doi.org/10.1039/C5RA23232E>).
- [43] Q. Xu, K. Qiao, C. Yan, Z. Liu, R. Lu and W. Zhou, *Anal. Methods*, 2020, 12, 3115–3122. (<https://doi.org/10.1039/D0AY00562B>).
- [44] W. Fan, D. Yang, N. Ding, P. Chen, L. Wang, G. Tao, F. Zheng and S. Ji, *Anal. Methods*, 2021, 13, 1412–1421. (<https://doi.org/10.1039/D0AY02025G>).
- [45] J. Grau, J. L. Benedé and A. Chisvert, *Talanta*, 2021, 122375. (<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122375>).
- [46] Ł. Sobczak and K. Gorýnski, *Analyst*, 2020, 145, 7279–7288. (<https://doi.org/10.1039/D0AN01379J>).

- [47] F. G. Bellagambi, T. Lomonaco, P. Salvo, F. Vivaldi, M. Hangouët, S. Ghimenti, D. Biagini, F. Di Francesco, R. Fuoco and A. Errachid, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2020, 124, 115781. (<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115781>).
- [48] A. Bekmurzayeva, W. J. Duncanson, H. S. Azevedo and D. Kanayeva, *Mater. Sci. Eng., C*, 2018, 93, 1073–1089. (<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.08.049>)
- [49] M. Cruz-Vera, R. Lucena, S. Cárdenas and M. Valcárcel, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 391, 1139–1145. (<https://doi.org/10.1007/s00216-008-1871-9>)
- [50] M. del Mar Ramírez Fernández, S. M. R. Wille and N. Samyn, *Ther. Drug Monit.*, 2012, 34, 11–24. (<https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e31823bf0fd>).
- [51] S. Bidny, K. Gago, P. Chung, D. Albertyn and D. Pasin, *J. Anal. Toxicol.*, 2017, 41, 181–195. (<https://doi.org/10.1093/jat/bkw118>)
- [52] A. Pouliopoulos, E. Tsakelidou, A. Krokos, H. G. Gika, G. Theodoridis and N. Raikos, *J. Anal. Toxicol.*, 2018, 42, 337–345. (<https://doi.org/10.1093/jat/bky006>).
- [53] W. Ma, X. Gao, H. Guo and W. Chen, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2021, 1171, 122608. (<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122608>)

**CAPÍTULO 5: AGUJA HIPODÉRMICA RECUBIERTA INTERNAMENTE DE  
POLDOPAMINA COMO DISPOSITIVO DE MICROEXTRACCIÓN Y  
EMISOR DE ELECTROSPRAY PARA EL ANÁLISIS DIRECTO DE  
DROGAS EN FLUIDO ORAL POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS  
AMBIENTAL**

En este capítulo se presentan los resultados que dieron origen al siguiente trabajo, el cual fue publicado en *Talanta* en Junio del 2022 (doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123693>).

**Polydopamine inner wall-coated hypodermic needle as microextraction device and electrospray emitter for the direct analysis of illicit drugs in oral fluid by ambient mass spectrometry**

Carmina Vejar-Vivar,<sup>a,b</sup> Jaime Millán-Santiago,<sup>a</sup> Claudia Mardones,<sup>b</sup> Rafael Lucena,<sup>a</sup> and Soledad Cárdenas<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Affordable and Sustainable Sample Preparation (AS2P) Research group. Departamento de Química Analítica, Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica IUNAN, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Marie Curie, E-14071 Córdoba, España.

<sup>b</sup> Departamento de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Casilla 237, Correo 3, Concepción, Chile

## Abstract

In this article, polydopamine inner wall-coated hypodermic needles (PDA-HNs) are evaluated as both microextraction devices and electrospray ionization (ESI) emitters for determining selected illicit drugs (methamphetamine, cocaine, and methadone) in oral fluid samples. The PDA film, located in the inner wall of the needle, allows the extraction of the analytes at alkaline pH, where their hydrophobic character is promoted. The extracted analytes are finally eluted in a methanol/formic acid mixture that also acts as ESI solution. For this purpose, a dedicated interface based on the connection of a PEEK tube with the needle hub is proposed. This assembly allows delivering the ESI solution by the infusion syringe pump of the mass spectrometer, providing an efficient ESI on the tip of the needle. The double use of the PDA-HNs as microextraction devices and ESI emitters permits the determination of the target analytes with limits of detection and precision (expressed as relative standard deviation) values better than 2.4  $\mu\text{g/L}$  and 17.6%, respectively. The accuracy was evaluated by analyzing independent spiked oral fluid samples, obtaining good results.

## 5.1. Introduction

Needle trap microextraction (NTME), also known as in-needle microextraction, is an efficient sample preparation technique based on immobilizing the sorptive phase inside a needle [1]. This design allows the flow of the sample, or its headspace [2,3], through the sorptive media, thus increasing the interaction with the analytes. In the classical NTME, the sorptive phase is coated on the inner walls of the needle [2,4,5] and shares the principles of fiber solid-phase microextraction (SPME). The versatility of NTME is high enough to use packed particulate materials [6,7] and polymeric monoliths [8,9] as sorbents. Moreover, the design of the needles allows to process a high amount of sample using little volume of eluent, thus providing an efficient extraction of the analytes. Needle trap devices have been applied in many fields, including environmental [10,11], food [2], and biofluid analysis [5,9,12]. The development of new sorbent materials for NTME has become increasingly important as it defines the application scope of the technique [13].

In the classical analytical workflow, the sample preparation step is followed by the chromatographic separation of the analytes and their final instrumental determination [7,14–16]. This strategy provides high metrological quality at the expense of the sample throughput. The direct combination of the sample preparation with instrumental analysis has been proposed as an alternative approach [17-18]. However, the selectivity of the chromatographic separation



must be compensated by a very selective extraction [17] or instrumental technique, like mass spectrometry [18]. The direct infusion of the eluates on the mass spectrometer is the most straightforward alternative, although the potential sensitivity is not entirely exploited as only a fraction of the eluate is finally analyzed [19,20]. The direct coupling [21,22] or the integration [23] of the extraction device to the mass spectrometer provide more sensitive results.

In ambient mass spectrometry (AMS), the ionization is performed at atmospheric pressure, and the samples can be directly analyzed with minimal or no sample pre-treatment [24]. The AMS technique, its advances, perspectives, and applications have been extensively reviewed over the past years [24–28]. For better analytical performance, the extract, instead of the bulk sample, can be the subject of the AMS analysis [29]. Different ionization sources can be used in these developments, including atmospheric solids analysis probe [29], direct analysis in real-time [30,31], or dielectric barrier discharge ionization [32]. ESI-based sources are an interesting alternative to those mentioned above and usually require simpler manifolds to be developed. Most ESI sources are based on a substrate used both as a microextraction device and ESI element. Paper [33–35], coated blades [36–39], wooden tips [40,41], polymeric tips [42], SPME fibers [43,44], copper surfaces [45], solid metal needles [46,47], and thread [48] have been reported as potential substrates.

PDA-HNs have been previously used as extraction devices to analyze tricyclic antidepressants in oral fluid samples. [5] In this article, the potential of these PDA-HNs as both microextraction devices and ESI emitters [47,49,50] is explored for the quantitative determination of drugs (methamphetamine, cocaine, and methadone) in oral fluid. After the loading and washing steps, the PDA-HNs were directly connected to an infusion syringe pump using a PEEK tube, which enabled the elution/ionization agent to flow through the needle. This solution is electrosprayed in the tip of the needle carrying the ionized analytes into the MS. The variables affecting the ionization source and the extraction of the analytes have been studied in detail.

## **5.2. Experimental section**

### **5.2.1. Reagents and samples**

The analytical standards of the target drugs (methamphetamine, cocaine, and methadone) were acquired from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Stock solutions were prepared in methanol and kept at -18 °C. Working solutions were prepared by diluting the stock in milli-Q water (Millipore Corp., Madrid, Spain) or in oral fluid samples. Deuterated internal standards (cocaine-d3, methadone-d3, and methamphetamine-d5) were used for the method validation. Methanol and formic acid were employed as eluent and carrier for MS analysis.

Dopamine and tris-HCl buffer, both from Sigma, were used to coat the inner wall of the stainless-steel hypodermic needles (Becton Dickinson, Huesca, Spain).

For method optimization and validation, blank saliva was collected by Salivette® samplers (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) consisting of a cellulose sampling pad. This sampler provides a high volume of oral fluid. A pooled saliva was used in the studies. However, the spitting method (non-stimulated saliva collected in an Eppendorf tube) is recommended when real samples are analyzed since the potential interaction of cellulose pads with drugs has been previously reported [51].

#### 5.2.2. Synthesis of polydopamine coated needles

The PDA-HNs were synthesized following the conditions established in our previous article. [5] Stainless-steel hypodermic needles were introduced (approximately 2.5 cm) in an aqueous solution of dopamine (2 g/L) adjusted at pH 8.5 with a 10 mM tris-HCl buffer solution. The solution was stirred for 24 h at room temperature to immobilize the PDA on the needle inner surface. The resulting PDA-HNs were washed with water, dried, and stored until their final use.

#### 5.2.3. Microextraction procedure

The configuration of the microextraction unit consists of attaching a PDA-HN to a 100 µL pipette by a pre-cut segment of a 100 µL pipette tip to carry out the

conditioning and washing steps, or to a 2 mL plastic syringe to carry out the extraction step (Figure 5-S1). The extraction procedure, presented schematically in Figure 5-S2, comprises several steps. First of all, the PDA-HN is conditioned by the subsequent loading and unloading of 100  $\mu$ L of acetonitrile, 100  $\mu$ L of methanol, and 100  $\mu$ L of Milli-Q water at pH 9 (adjusted with a 25 % v/v ammonium hydroxide solution) followed by 5 strokes of air to eliminate the liquid excess. The extraction involves three repetitive loading and unloading steps of 2 mL of 1:4 diluted sample at pH 9 (adjusted with a 25 % v/v ammonium hydroxide solution). Once the extraction step is completed, the PDA-HN needle is cleaned twice with 100  $\mu$ L of Milli-Q water at pH 9, dried with air and stored until its final analysis.

#### 5.2.4. Mass spectrometry analysis

The PDA-HN was used both as a microextraction device and ESI emitter. The manifold designed to couple the needle to the MS is shown in Figure 5-1. The needle was connected to an electric clamp, leaving 25 mm with the needle tip. This position guarantees the firmness of the PDA-HN in the interface. The distance between the needle tip and the MS inlet was fixed at 10 mm. The needle hub was connected to a PEEK tube using a pre-cut segment of a 10  $\mu$ L pipette tip as the adapter. The eluent, methanol containing 0.1% (v/v) formic acid previously loaded into a 500  $\mu$ L Hamilton syringe (Bonaduz, GR, Switzerland, USA), was pumped at 30  $\mu$ L/min by the syringe pump already installed in the spectrometer.

The eluent desorbed the analytes from the PDA coating, and it was finally electrospayed in the tip of the needle. 100  $\mu\text{L}$  of eluent is required to desorb the analytes from the PDA coating.

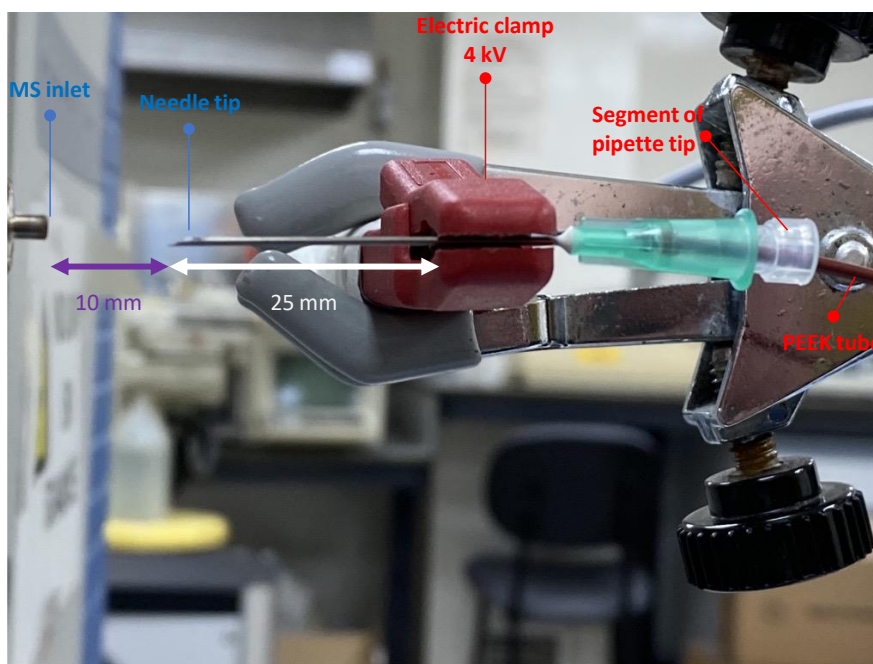


Fig. 5-1. Manifold used for the direct MS analysis of the PDA-HNs after their use as extraction devices. The different elements and distances are specified. The needle is connected to an electric clamp and connected to a PEEK tube through which the eluent is pumped. The eluent desorbs the analytes from the PDA coating, and it is finally electrospayed in the tip of the needle (for further details, read the text).

MS analyses were carried out in a Thermo LTQ Orbitrap XL hybrid mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Francisco, CA, USA) working with the Ion Trap analyzer. The ionization parameters consisted of 4 kV of spray

voltage and 35 V of capillary voltage, the capillary temperature was established at 275 °C, and the tube lens was 130 V. The data-dependent MS/MS events were based on the most intense ions detected in positive mode full scan MS for each compound. The MS/MS isolation width was 1 amu. Tandem mass spectrometry (MS/MS) experiments were carried out by collision-induced dissociation (CID) using He as the collision gas. MRM transitions are established in Table 5-1. Data collection and analysis were performed with Xcalibur 2.1.0 software (Thermo Fisher Scientific).

Table 5-1. Multiple reaction monitoring transitions of the three analytes and their corresponding internal standard compounds.

Analyte	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Normalized collision energy (V)
Cocaine	304.2	182.0	30
Cocaine-d3	307.2	185.1	35
Methamphetamine	150.1	118.9	25
Methamphetamine-d5	155.1	120.9	25
Methadone	310.3	265.2	30
Methadone-d3	313.3	268.2	30

### 5.3. Results and discussion

#### 5.3.1. Optimization of the interface

Unmodified hypodermic needles were used as ESI emitters to study the variables involved in the formation of the ESI, namely: spray voltage, flow rate, and distance between the needle and the MS inlet. For this purpose, methadone was chosen as model analyte regarding its good ionization in ESI under the proposed interface. A 50 µg/L standard solution of methadone was prepared in methanol containing 0.1% (v/v) formic acid and pumped through the needle by the syringe pump. The chromatograms, obtained during 3 min, showed the typical distribution for direct infusion measurements. For quantitative analysis, the peak area obtained for 0.6 min span was used while the stability of the spray was measured considering the variability of the signal in three segments of 0.6 min in the same chromatogram (see Figure 5-S3).

The spray voltage and the flow rate were jointly studied (Figure 5-2). The spray voltage spanned from 3.5 to 4.5 kV. Lower voltages were not considered as they prevented the formation of the ESI, and higher voltages implied the formation of drops that were ejected from the needle tip. The flow rate was evaluated in the interval ranging from 15 to 30 µL/min. Lower flow rates hindered the formation of the spray plume and provoked pulses. In fact, at 4.5 kV and 15 µL/min the spray was not formed. Higher flow rates were not evaluated since the spray was not

stable enough during the elution. Considering the results, 4 kV and 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  were selected as the optimum values.

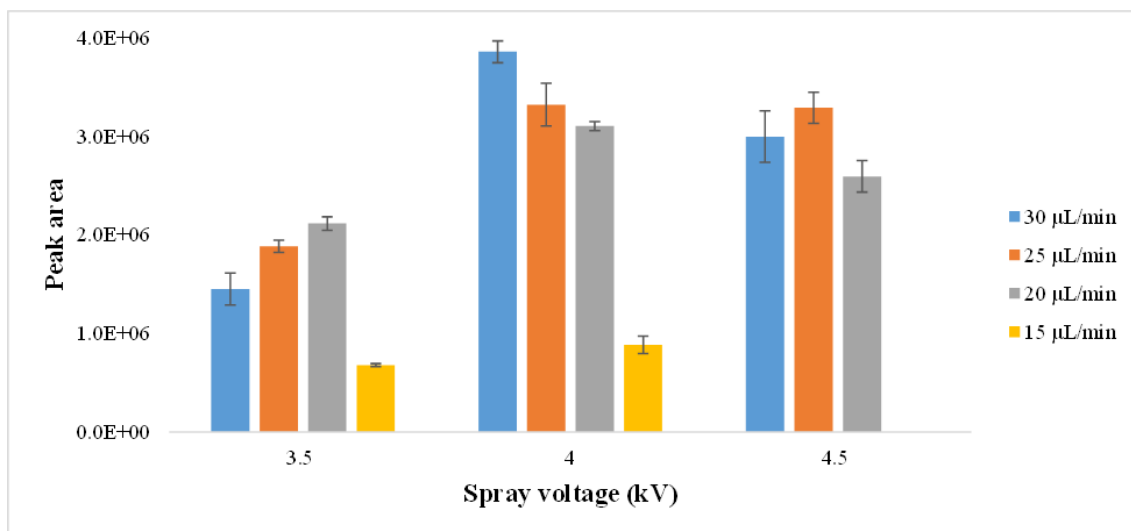


Fig. 5-2. Effect of the spray voltage and flow rate on the analytical signal obtained for the direct infusion of a solution containing methadone at 50  $\mu\text{g}/\text{L}$  and prepared in methanol containing 0.1% (v/v) formic acid. The peak area is obtained by the integration in a 0.6 min span of the chromatogram by triplicate.

The distance between the needle tip and the ESI-inlet was studied between 10 and 20 mm. Shorter distances were not considered to prevent an electric discharge during the sample analyses. The selected distance was 10 mm because longer distances hindered the formation of the ESI.

Working under the optimum conditions, the performance of the interface was evaluated by injecting several standards of methadone at different concentrations.



The results, presented in Figure 5-S4, showed good linearity in the evaluated concentration range considering that the absolute signal for methadone is presented (no internal standard was used in this assay).

### 5.3.2. Optimization of the extraction

The extraction performance depends on the number of sample strokes. As this research is mainly focused on the direct combination of the PDA-HNs with AMS to increase the sample throughput, the number of strokes was fixed at 3 to provide a good sensitivity/extraction speed ratio according to our previous experience [5].

The effect of the sample pH and ionic strength on the extraction was evaluated using aqueous standards. The results are shown in Figure 5-3. The pH of the sample defines the ionization form of the analytes, which are basic substances (pKa in the range from 8.8 to 10.2) with a moderate to an intense lipophilic character (log Kow in the interval 2.2-5) in their neutral form. These data are summarized in Table 5-S1. As shown in Figure 5-3, the extraction of the analytes is favored at alkaline pH as expected. However, the signal for cocaine decreases at pH 11, which can be ascribed to a non-enzymatic hydrolysis of the analyte [52]. The ionic strength may have a double and contradictory effect on the extraction of the analytes. The salting-out effect can positively affect the thermodynamics, but it can negatively influence the extraction kinetics as the viscosity of the medium increases. The results (Figure 5-3) showed a negative effect on the

extraction of the analytes from 0 to 0.5%, (using NaCl as model electrolyte) and an almost negligible effect for methadone and cocaine at higher ionic strength. However, internal standards can minimize this effect, as demonstrated in the method validation.

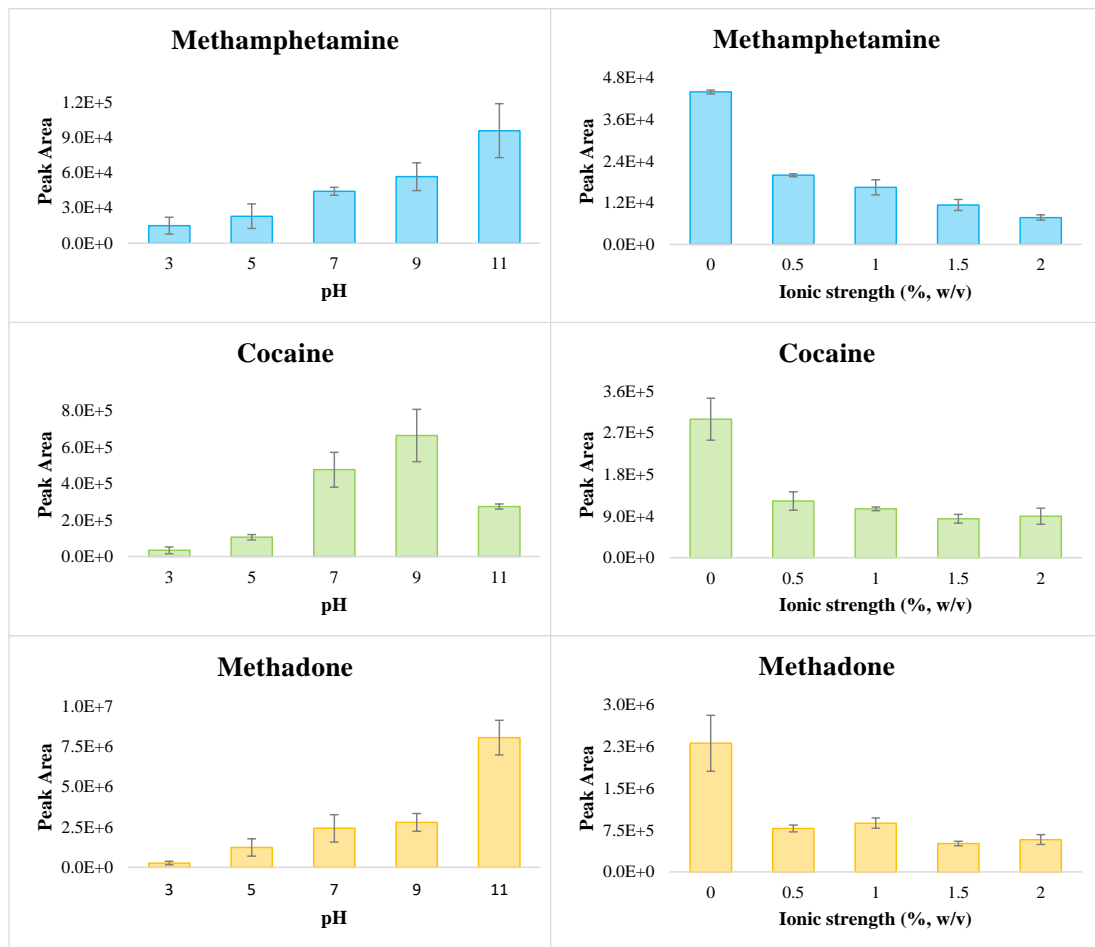


Fig. 5-3. Effect of the pH and the ionic strength (expressed in percentage of NaCl) on the extraction of the target analytes.

### 5.3.3. Method validation

The analytical method was validated in terms of limits of detection (LODs), limits of quantification (LOQs), and linearity under the optimized conditions previously reported, using matrix-matched calibration curves for methamphetamine, cocaine, and methadone. Accuracy and precision (expressed as relative recovery and relative standard deviation, respectively), were validated using spiked saliva samples from an independent pool of samples. Sample dilution in water was fixed at 1:4 dilution factor according to previous studies of the research group [5]. Internal standard compounds were spiked at 20 µg/L. The LODs and LOQs, calculated for a S/N of 3 and 10, were lower than 2.4 and 8 µg/L, respectively. The linearity was calculated at six concentration levels (three replicates by level), presenting correlation models with  $R^2 > 0.9953$  for all the analytes with linear ranges spanning from the LOQ to 400 µg/L. The calibration graphs are shown in Figure 5-S5. Accuracy and precision were calculated at two different concentration levels (40 and 200 µg/L) showed good results for all the analytes (see Table 5-2). In this sense, the relative recoveries vary in the interval 88-123 %. The precision, expressed as relative standard deviation, was better than 17.6 %. Each extraction is performed with a different needle, so the precision values take into account the synthesis reproducibility.

Table 5-2. Validation results for the three selected analytes in the direct combination of NTME and AMS.

Analyte	Linear range (µg/L)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	R <sup>2</sup>	Precision (% , n=3)		Relative recovery (% , n=3)	
					40 µg/L	200 µg/L	40 µg/L	200 µg/L
Methamphetamine	8 - 400	2.4	8	0.9979	8.5	17.6	88 ± 8	97 ± 18
Cocaine	4 - 400	1.2	4	0.9969	11.2	16.8	101 ± 10	111 ± 17
Methadone	4 - 400	1.2	4	0.9953	6.0	13.6	99 ± 5	123 ± 13

#### 5.3.4. Comparison with other methods

The proposed method has been compared with other counterparts described in the literature to resolve the same analytical problem [19, 53-61]. Table 5-2 summarizes the main analytical characteristics (sensitivity, precision, and accuracy), indicating the sample pretreatment.

The dilute and shot technique, the simpler preparation approach, provides better [53-54] or comparable [61] sensitivity levels. These analytical methods are based on a previous separation of the analytes by LC that reduces the matrix effect at the expense of a longer analysis time and a higher solvent (mobile phase) consumption. However, LC equipment uses autosamplers, and the injection of the extract, in contrast with our method, is entirely automated. The same discussion can be applied to other LC-based methods [56-57, 60] even when a

preconcentration step is developed [57]. The proposed method provides comparable [58] or better [59] sensitivity than those based on gas chromatography. Finally, if the method is compared with other approaches based on direct infusion [19] or ESI emitters [55], the sensitivity levels of our method are comparable [19] or better [55]. As can be seen in Table 5-3, almost all the methods fulfill the validation guidelines.

#### **5.4. Conclusions**

This article evaluates the potential of PDA-HNs as microextraction devices and ESI emitters in bioanalysis. The PDA-HNs are easily synthesized and require cheap precursors to prepare disposable units (a relevant tool for bioanalysis).

The PDA-HNs allow the extraction of three illicit drugs (methamphetamine, cocaine, and methadone) from saliva samples. The extraction is affected by the pH and the ionic strength. The extraction is promoted at alkaline pH, which leads to the conclusion that hydrophobic interactions are responsible for the retention of the analytes. The ionic strength affects the extraction, although using deuterated analogues reduces its negative effect on the analytical performance.

The PDA-HNs are online eluted in a dedicated interface connected to AMS by a methanol/formic acid solution. Methanol breaks the PDA-analyte interaction, while

the formic acid acts as the ionizing agent. The interface provides a stable enough ESI, thus allowing the ionization and transference of the analytes to the MS.

The method provides good validation results for determining methamphetamine, cocaine, and methadone in saliva samples. Compared to LC-based methods, the sensitivity is lower, although the approach reduces the consumption of solvents and the analysis time. The lack of automation, since the PDA-HNs are changed manually, can be considered a limitation of the approach. Considering further developments, the use of PDA-HNs for in-vivo sampling (exploiting the biocompatibility of PDA) or in-situ extraction (increasing the chemical stability of the analytes during the storage) appears as the more exciting ones.

Table 5-3. Comparison of the proposed method with other methods reported for the determination of drugs in oral fluid.

Sample preparation	Instrumental technique	Analytes	LOD (ng mL <sup>-1</sup> )	LOQ (ng mL <sup>-1</sup> )	Precision (RSD%)	Accuracy (RR%)	Ref
PDA-HNs	HN-ESI-MS/MS	Methamphetamine Cocaine Methadone	2.4 1.2 1.2	8 4 4	17.6 16.8 13.6	88 101 99	This paper
Nylon 6-WT	DI-MS	Methadone Cocaine Methamphetamine	1.5 1.5 1.5	5 5 5	9.1 12.6 18.2	93 86 89	[19]
Dilute-and-shot	LC-MS/MS	Methadone Methamphetamine	0.1 0.1	0.25 0.25	3.9 3.3	96.0 94.4	[53]
Dilute-and-shot	LC-MS/MS	Cocaine Methadone Methamphetamine	n.a.	0.5 1 1	9.37 4.31 6.67	85.71 92.99 90.29	[54]
WT	WT-ESI-MS	Methamphetamine Cocaine	12.5 12.5	50 50	12.6 12.8	97.2 97.8	[55]
DOFS	LC-MS/MS	Methamphetamine	n.a.	0.2	10.7	82.6	[56]
MIP-PS	PS-MS/MS	Cocaine	0.27	1.0	5.3	100.5	[57]
DSS	GC-MS/MS	Methadone	5	10	9.84	89.06	[58]
LLE followed by derivatization	GC-MS	Cocaine Methamphetamine Methadone	5 10 5	15 30 15	6.8 5.3 60.1	100 97 98	[59]

Protein precipitation	UPLC-MS/MS	Methamphetamine	n.a.	0.5	13	95	[60]
		Cocaine		0.5	8.6	87	
		Methadone		0.5	7.3	73	
Dilute-and-shot	LC-MS/MS	Methamphetamine	5	5	1.71	89.30	[61]
		Methadone	5	5	2.34	96.68	

PDA-HNs, Polydopamine inner wall-coated hypodermic needle; WT, Wooden Tips; DOFS, Dried Oral Fluid Spots; MIP-PS, Molecularly Imprinted Polymer-Paper Spray; DSS, Dried Saliva Spot; LLE, liquid-liquid extraction; ESI, electrospray; MS, mass spectrometry, DI, Direct Infusion; LC, liquid chromatography; GC, gas chromatography; UPLC, ultrahigh pressure liquid chromatography; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; RSD: Relative standard deviation; RR: Relative recovery; n.a.: not available.



## **5.5. Acknowledgements**

The project PID2020-112862RB-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 (Feder “Una manera de hacer Europa) is gratefully acknowledged. C. Vejar-Vivar expresses her gratitude to the Gobierno de Chile for the grant “Beca ANID Doctorado Nacional Folio N° 2117044”. J. Millán-Santiago expresses his gratitude for the predoctoral grant (FPU19/01488) from the Spanish Ministry of Science, Innovation, and Universities.

## 5.6. Supplementary information

### 5.6.1. Extraction device

Figure 5-S1 shows the devices used during the extraction procedure. A micropipette (Figure 5-S1-A) was used for the needle conditioning and elution. A pre-cut segment of a 100  $\mu$ L pipette tip is used as adapter to connect the needle to the micropipette. Sample loading was performed using a plastic syringe as indicated in Figure 5-S1-B. In this case, the connection is easier, and no adapter is needed.

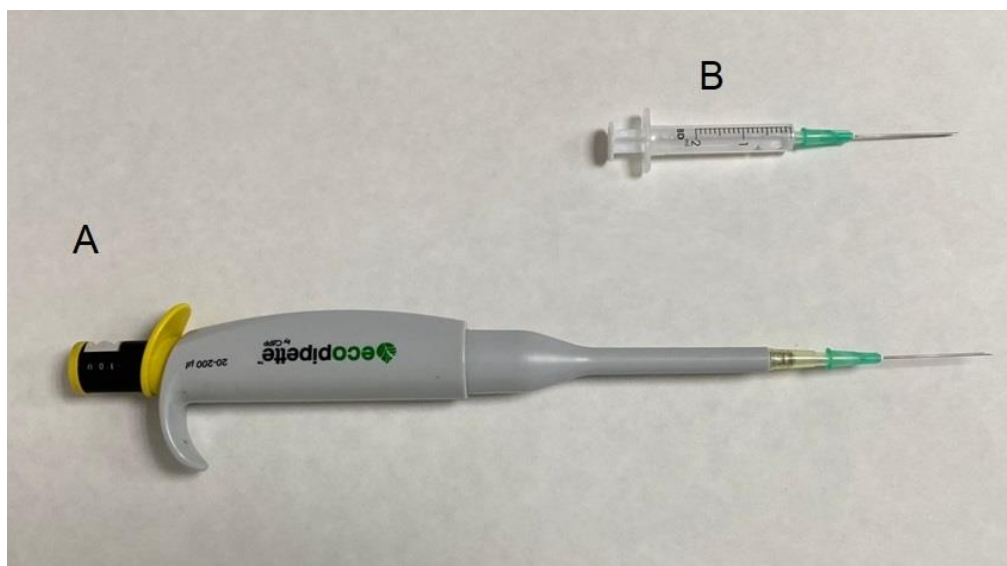


Fig. 5-S1. Devices used for the microextraction procedure. A) Micropipette used for the needle conditioning and elution. B) Plastic syringe used for sample loading.

### 5.6.2. Microextraction procedure.

Figure 5-S2 presents a scheme of the extraction procedure. The full description of the process can be read in the main text (Section 5.2.3 Microextraction procedure).

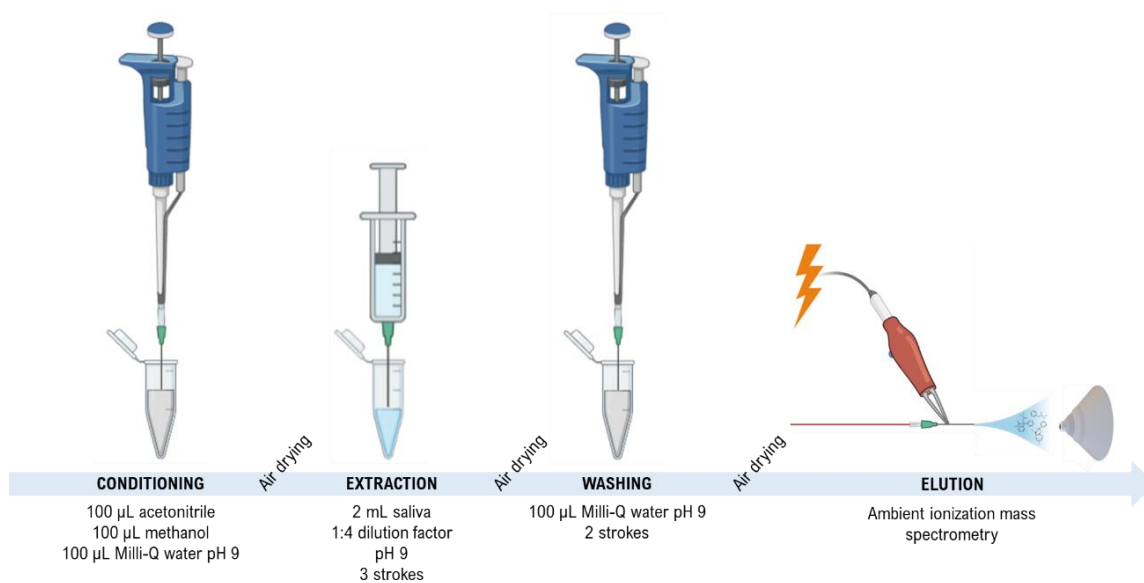


Fig. 5-S2. Microextraction procedure used for the isolation of illicit drugs from oral fluid and their subsequent analysis by mass spectrometry.

### 5.6.3. Calibration of the proposed interface by direct infusion of methadone standards

Working under the optimum conditions, the performance of the interface was evaluated by injecting several standards of methadone at different concentrations. The chromatograms, obtained during 3 min, showed the typical distribution for direct infusion measurements. For quantitative analysis, the peak area obtained for 0.6 min span was used while the stability of the spray was measured considering the variability of the signal in three segments of 0.6 min in the same chromatogram (see Figure 5-S3).

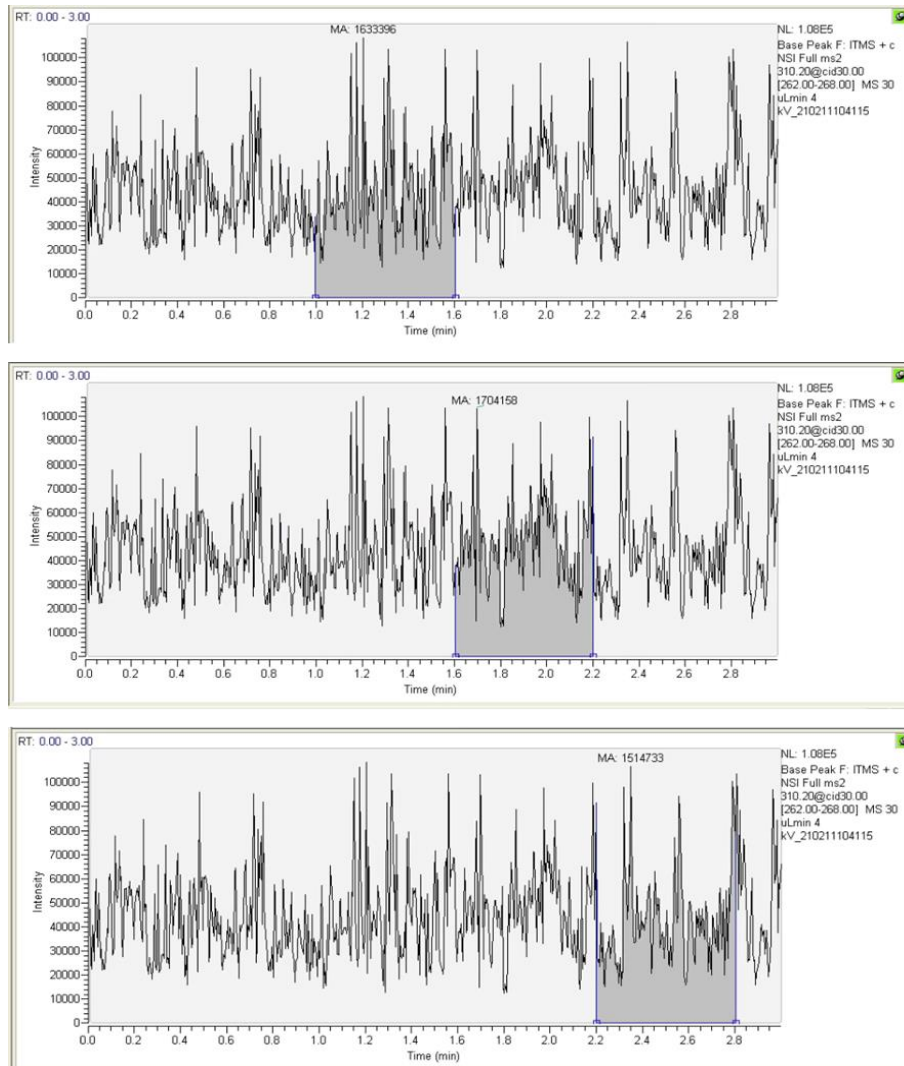


Fig. 5-S3. The panels represent three 0.6 min segments on the same chromatogram.

The results, presented in Figure 5-S4, showed a good linearity in the concentration range evaluated considering that the absolute signal for methadone (no internal standard was used in this assay) is presented. For the MS acquisition only the transition for methadone 310.3 → 265.2 was measured.

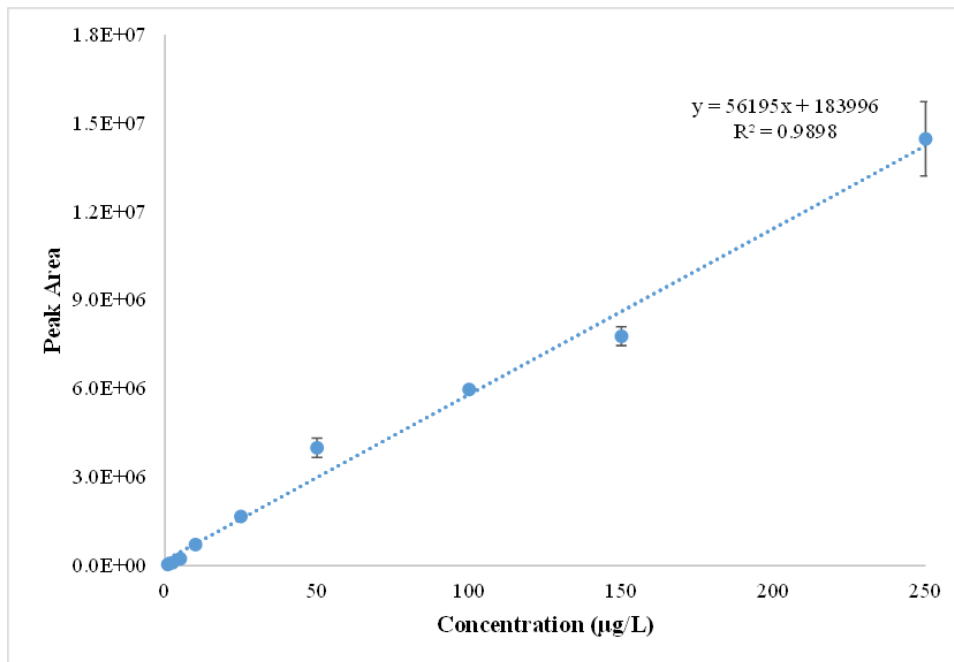


Fig. 5-S4. Calibration graph obtained for the direct infusion of methadone standards (using methanol containing formic acid) in the range from 1 to 250 µg/L.

#### 5.6.4. Chemical characteristics of the target analytes

Table 5-S1. Chemical characteristics of the three target drugs

Analyte	pKa	log P
Methamphetamine	10.0	2.1
Cocaine	8.7	2.3
Methadone	9.2	3.9

Source: Chempider

### 5.6.5. Method validation

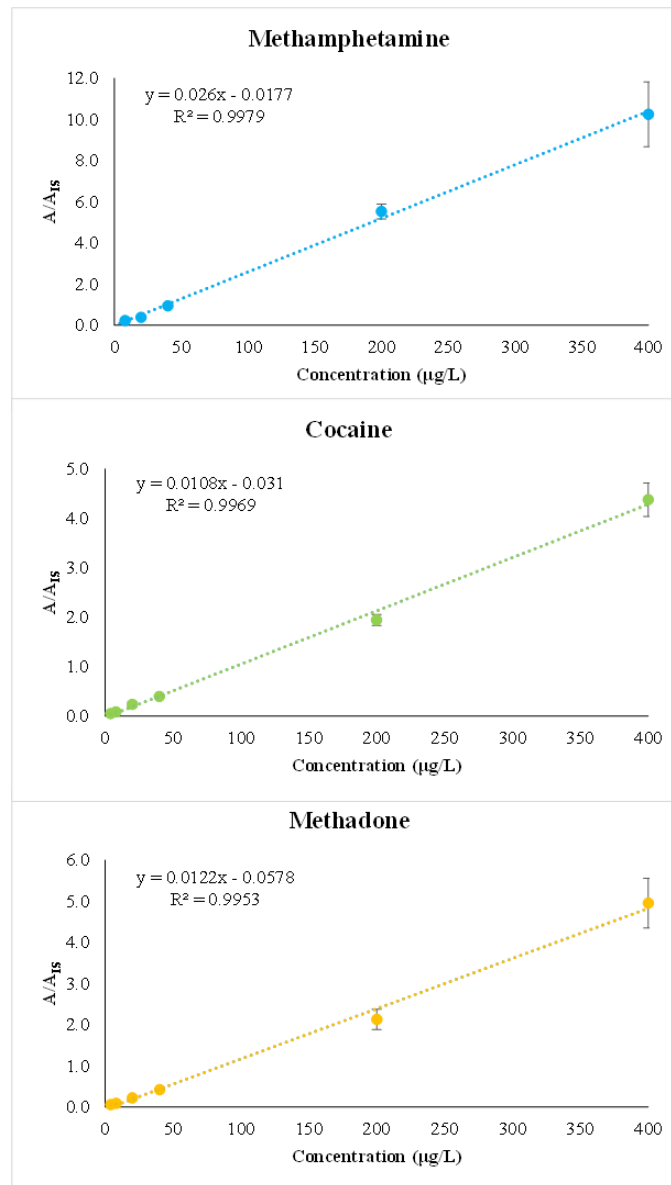


Fig. 5-S5. Matrix-match calibration curves were obtained by extracting blank samples spiked with the target analytes.

## 5.7. References

- [1] H.L. Lord, W. Zhan, J. Pawliszyn. *Anal. Chim. Acta.*, 2010, 677, 3–18. (<https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.06.020>).
- [2] Y. Bang, Y. Hwang, S. Lee, S. Park, S. Bae. *J. Sep. Sci.*, 2017, 40, 3839–3847. (<https://doi.org/10.1002/jssc.201601373>).
- [3] J. Ghafari, M. Vahabi, S.F. Dehghan, R. Zendehtdel. *Biomed. Chromatogr.*, 2020, 34. (<https://doi.org/10.1002/bmc.4924>).
- [4] D. Djozan, M.A. Farajzadeh, S.M. Sorouraddin, T. Baheri, J. Norouzi. *Chromatographia*, 2012, 75, 139–148. (<https://doi.org/10.1007/s10337-011-2173-5>).
- [5] C. Vejar-Vivar, M.T. García-Valverde, C. Mardones, R. Lucena, S. Cárdenas. *RSC Adv.*, 2021, 11, 22683–22690. (<https://doi.org/10.1039/D1RA02721B>).
- [6] M. Heidari, S.G. Attari, M. Rafieiemam. *Anal. Chim. Acta.*, 2016., 918 43–49. (<https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.03.009>).
- [7] V. Jalili, R. Zendehtdel, A. Bahramian, A. Barkhordari. *Chromatographia*, 2019, 82, 1515–1521. (<https://doi.org/10.1007/s10337-019-03779-w>).
- [8] M. Pietrzyńska, R. Tomczak, K. Jezierska, A. Voelkel, J. Jampílek. *Mater. Sci. Eng. C*, 2016, 68, 70–77. (<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.097>).
- [9] W. Fang, B. Zhang, F.-Y. Han, Z.-N. Qin, Y.-Q. Feng, J.-M. Hu, A.-G. Shen. *Anal. Chem.*, 2020, 92, 13539–13549. (<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03041>).
- [10] Y. Yang, W. Mai, J. Gao, Z. Hu, J. Xu, S. Zou. *J. Sep. Sci.*, 2019, 42, 1750–1756. (<https://doi.org/10.1002/jssc.201801112>).
- [11] M. Heidari, A. Bahrami, A.R. Ghiasvand, F.G. Shahna, A.R. Soltanian. *Anal. Chim. Acta.*, 2013, 785, 67–74. (<https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.04.057>).
- [12] M.M. Moein, D. Jabbar, A. Colmsjö, M. Abdel-Rehim. *J. Chromatogr. A*, 2014, 1366, 15–23. (<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.012>).



- [13] K. Kędziora, W. Wasiak. *J. Chromatogr. A*, 2017, 1505, 1–17. (<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.05.030>).
- [14] I.-Y. Eom, A.-M. Tugulea, J. Pawliszyn. *J. Chromatogr. A*, 2008, 1196–1197, 3–9. (<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.090>).
- [15] H. Piri-Moghadam, S. Lendor, J. Pawliszyn. *Anal. Chem.*, 2016, 88, 12188–12195. (<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03160>).
- [16] C. Ye, Y. Wu, Z. Wang. *RSC Adv.*, 2016, 6, 9066–9071. (<https://doi.org/10.1039/C5RA23232E>).
- [17] M.C. Díaz-Liñán, A.I. López-Lorente, S. Cárdenas, R. Lucena. *Sens. Actuators B Chem.*, 2019, 287, 138–146. (<https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.02.048>).
- [18] G.A. Gómez-Ríos, C. Liu, M. Tascon, N. Reyes-Garcés, D.W. Arnold, T.R. Covey, J. Pawliszyn. *Anal. Chem.*, 2017, 89, 3805–3809. (<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04737>).
- [19] J. Millán-Santiago, M.T. García-Valverde, R. Lucena, S. Cárdenas. *Microchem. J.*, 2021, 162, 105843. (<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105843>).
- [20] M.C. Díaz-Liñán, R. Lucena, S. Cárdenas, A.I. López-Lorente. *J. Chromatogr. A*, 2021, 1651, 462297. (<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462297>).
- [21] C. Vejar-Vivar, L. Bustamante, R. Lucena, C. Ortega, M. Valenzuela, C. Mardones. *Microchem. J.*, 2021, 171, 106797. (<https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106797>).
- [22] A.M. Casas Ferreira, B. Moreno Cordero, J.L. Pérez Pavón. *J. Chromatogr. B*, 2017, 1043, 74–80. (<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.07.052>).
- [23] G.A. Gómez-Ríos, M.F. Mirabelli. *Trends Anal. Chem.*, 2019, 112, 201–211. (<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.030>).
- [24] J.T. Shelley, S.P. Badal, C. Engelhard, H. Hayen. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, 410, 4061–4076. (<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1023-9>).
- [25] C.L. Feider, A. Krieger, R.J. DeHoog, L.S. Eberlin. *Anal. Chem.*, 2019, 91, 4266–4290. (<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00807>).

- [26] Molina-Díaz, M. Beneito-Cambra, D. Moreno-González, B. Gilbert-López. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, 2019, 19, 50–60. (<https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.05.005>).
- [27] T.-H. Kuo, E.P. Dutkiewicz, J. Pei, C.-C. Hsu. *Anal. Chem.*, 2020, 92, 2353–2363. (<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05454>).
- [28] F. Bianchi, M. Mattarozzi, M. Careri. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, 412, 3967–3973. (<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02671-z>).
- [29] M.J. Dueñas-Mas, A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio. *Chemosphere*, 2022, 294, 133719. (<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133719>).
- [30] T. Vasiljevic, J. Pawliszyn. *Anal. Methods*, 2019, 11, 3882–3889. (<https://doi.org/10.1039/C9AY00797K>).
- [31] Khaled, J.R. Belinato, J. Pawliszyn. *Talanta*, 2020, 217, 121095. (<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121095>).
- [32] M.F. Mirabelli, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, R. Zenobi. *Analyst*, 2019, 144, 2788–2796. (<https://doi.org/10.1039/C8AN02448K>).
- [33] M. Dai, G. Huang. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2020, 34. (<https://doi.org/10.1002/rcm.8759>).
- [34] T. de Brito, D. de Aguiar, I. Pereira, B. Vaz. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2021, 32, 269-276. (<https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200177>).
- [35] M.C. Díaz-Liñán, M.T. García-Valverde, A.I. López-Lorente, S. Cárdenas, R. Lucena. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, 412, 3547–3557. (<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02603-x>).
- [36] G.A. Gómez-Ríos, M. Tascon, J. Pawliszyn. *Bioanalysis*, 2018, 10, 257–271. (<https://doi.org/10.4155/bio-2017-0153>).
- [37] Kasperkiewicz, G.A. Gómez-Ríos, D. Hein, J. Pawliszyn. *Anal. Chem.*, 2019, 91, 13039–13046. (<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03225>).
- [38] Khaled, G.A. Gómez-Ríos, J. Pawliszyn. *Anal. Chem.*, 2020, 92, 5937–5943. (<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00093>).
- [39] D.A. Rickert, G.A. Gómez-Ríos, E. Nazdrajić, M. Tascon, V. Kulasingam, J.B. Pawliszyn. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, 412, 5067–5076. (<https://doi.org/10.1007/s00216-019-02367-z>).

- [40] Hu, P.-K. So, Y. Yang, J. Deng, Y.-C. Choi, T. Luan, Z.-P. Yao. *Anal. Chem.*, 2018, 90, 1759–1766. (<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03675>).
- [41] H. v. Pereira, F.G. Pinto, M.R. dos Reis, T.J. Garrett, R. Augusti, M.M. Sena, E. Piccin. *Talanta*, 2021, 230, 122304. (<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122304>).
- [42] X. Yang, H. Huang, Q. Lu, S. Chen, F. Wang, O. Huang, B. Hu, B. Yang. *J. Mass Spectrom.*, 2019, 54, 189–194. (<https://doi.org/10.1002/jms.4322>).
- [43] Hu, B. Zheng, D. Rickert, G.A. Gómez-Ríos, B. Bojko, J. Pawliszyn, Z.-P. Yao. *Anal. Chim. Acta*, 2019, 1075, 112–119. (<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.044>).
- [44] G.A. Gómez-Ríos, N. Reyes-Garcés, B. Bojko, J. Pawliszyn. *Anal. Chem.*, 2016, 88, 1259–1265. (<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03668>).
- [45] M.C. Godwin, W.D. Hoffmann. *Int. J. Mass Spectrom.*, 2020, 452, 116339. (<https://doi.org/10.1016/j.ijms.2020.116339>).
- [46] K. Usui, H. Kobayashi, Y. Fujita, E. Kubota, T. Hanazawa, T. Yoshizawa, Y. Kamijo, M. Funayama. *J. Food Drug Anal.*, 2019, 27, 786–792. (<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.02.001>).
- [47] G.L. de Araújo, D.V.A. de Aguiar, I. Pereira, L.C. da Silva, A.R. Chaves, B.G. Vaz. *Anal. Methods*, 2020, 12, 3235–3241. (<https://doi.org/10.1039/D0AY00652A>).
- [48] S. Jackson, D.J. Swiner, P.C. Capone, A.K. Badu-Tawiah. *Anal. Chim. Acta*, 2018, 1023, 81–88. (<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.008>).
- [49] G.T.T. Gibson, S.M. Mugo, R.D. Oleschuk. *Mass Spectrom. Rev.*, 2009, 28, 918–936. (<https://doi.org/10.1002/mas.20248>).
- [50] B.R. Reschke, A.T. Timperman. *J Am Soc Mass Spectrom.*, 2011, 22, 2115–2124. (<https://doi.org/10.1007/s13361-011-0251-4>).
- [51] Ł. Sobczak, K. Goryński. *Analyst*, 2020, 145, 7279–7288. (<https://doi.org/10.1039/D0AN01379J>).
- [52] Warner, A. B Norman. *Ther. Drug Monit.*, 2000, 22, 266-270. (<https://doi.org/10.1097/00007691-200006000-00006>).

- [53] H-C. Liu, H-T. Lee, Y-C. Hsu, M-H. Huang, R. H. Liu, T-J. Chen, D.-L. Lin. *J. Anal. Toxicol.* 2015, 39, 472–480. (<https://doi.org/10.1093/jat/bkv041>).
- [54] Bassotti, G. M. Merone, A. D'Urso, F. Savini, M. Locatelli, A. Tartaglia, P. Dossetto, C. D'Ovidio, U. de Grazia. *Forensic Sci. Int.*, 2020, 312, 110330. (<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110330>).
- [55] T. T. Ng, P. K. So, B. Hu, Z. P. Yao. *J. Food Drug Anal.* 2019, 27, 428–438. (<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.09.002>).
- [56] R. Gorziza, J. Cox, R. Pereira Limberger, L. E. Arroyo-Mora. *Forensic Chem.* 2020, 19, 100254. (<https://doi.org/10.1016/j.forc.2020.100254>).
- [57] L. S. Tavares, T. C. Carvalho, W. Romão, B. G. Vaz, A. R. Chaves. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2018, 29, 566–572. (<https://doi.org/10.1007/s13361-017-1853-2>)
- [58] Ribeiro, M. Prata, C. Vaz, T. Rosado, J. Restolho, M. Barroso, A. R. T. S. Araújo, E. Gallardo. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2019, 411, 2177–2187. (<https://doi.org/10.1007/s00216-019-01654-z>).
- [59] Cohier, B. Mégarbane, O. Roussel. *J. Anal. Toxicol.*, 2017, 41, 71–76. (<https://doi.org/10.1093/jat/bkw100>).
- [60] Y. Zheng, E. Sparve, M. Bergström. *Drug Test. Anal.*, 2018, 10, 1001–1008. (<https://doi.org/10.1002/dta.2325>).
- [61] J. Reisinger, A. C. Miller, L. A. Shaw, J. L. Champion, M. A. Neiswonger. *J. Anal. Toxicol.* 2019, 43, 444–451. (<https://doi.org/10.1093/jat/bkz032>).

**CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA BASADA EN  
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE  
MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA EL SCREENING TOXICOLÓGICO  
DE MUESTRAS DE SANGRE *POSTMORTEM***

En el siguiente capítulo se presentan los resultados preliminares obtenidos para el *screening* toxicológico de muestras forenses. Este trabajo se realizó en el Departamento de Análisis Instrumental de la Facultad de Farmacia, con la colaboración del Servicio Médico Legal de Concepción, y se desarrolló en el marco del cuarto y último objetivo de esta tesis doctoral.

**Metodología para el *screening* no dirigido de fármacos, drogas y sus metabolitos en muestras de sangre *postmortem* mediante UHPLC-QqTOF-MS/MS**

Carmina Vejar-Vivar, Claudia Mardones.

Departamento de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.  
Concepción, Chile

## Resumen

Debido al constante incremento de los compuestos de relevancia toxicológica y la necesidad de resultados altamente confiables, ha sido necesario aumentar la capacidad analítica de los métodos de análisis forense. Con este objetivo, se desarrolló un método de análisis no dirigido mediante cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución, para la identificación de drogas y fármacos que pueden estar presentes en muestras de sangre *postmortem*. Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo el análisis de soluciones estándares de los analitos, con lo que fue posible crear una base de datos interna del laboratorio. Esta librería contiene la información de tiempo de retención, relación masa/carga del ión pseudomolecular y los patrones de fragmentación de más de 70 compuestos de relevancia toxicológica. Posteriormente, se realizó el análisis no dirigido de 17 muestras reales de sangre *postmortem*. La aplicación del método, y la identificación mediante la base de datos creada, permitió la identificación de 13 analitos diferentes con excelentes resultados de exactitud de masa (error < 10 ppm) y resultados adecuados de ajuste del patrón isotópico ( $m\text{Sigma} < 100$ ), al compararlos con el trabajo de otros autores. Finalmente, gracias a la naturaleza no dirigida del método, fue posible el análisis retrospectivo de la data obtenida para confirmar la identidad de algunos compuestos que no se encontraban presentes en la base de datos, incluso sin contar con estándares de referencia para ellos.

## 6.1. Introducción

Los métodos de screening mediante el uso de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-HR-MS), se han convertido en una parte integral del análisis toxicológico forense moderno [1]. La capacidad de LC-HR-MS para el análisis de compuestos de interés toxicológico, como fármacos, drogas y metabolitos, en muestras biológicas ha sido ampliamente investigada [2]. Esto se debe, principalmente, a que el gran poder de identificación de HR-MS permite, no sólo la identificación de los compuestos más comunes o relevantes para toxicología forense, sino también la inclusión de nuevos compuestos de interés, los cuales se encuentran apareciendo constantemente [3]. Por otro lado, el desarrollo de métodos basados en la adquisición no dirigida permite el análisis retroactivo de los datos, lo que es extremadamente útil para el análisis de compuestos desconocidos [2].

Si bien los espectrómetros de masas de tipo Orbitrap ofrecen una gran capacidad de identificación [4], son muy costosos y no suelen estar disponibles en los laboratorios de análisis. En los últimos años, la atención ha estado puesta en el desarrollo de diversos métodos para el screening, confirmación e incluso la cuantificación de los analitos utilizando instrumentos de UHPLC-QqTOF-MS [5]. En la mayoría de los métodos de screening mediante LC-HR-MS, los criterios para la identificación se basan en la obtención de la masa exacta, el tiempo de retención y el patrón isotópico de los analitos, así como también, en la

información de la fragmentación de los compuestos. De esta manera, es posible la identificación inequívoca de un compuesto utilizando uno o más iones fragmento con su masa exacta, o por comparación con bibliotecas de espectros, incluso disponibles en internet [6].

En el año 2018, Partridge et al. publicaron un trabajo en el cual se llevó a cabo el desarrollo de un método para el screening simultáneo de 320 compuestos de relevancia forense y la cuantificación simultánea de 39 de ellos. El análisis se realizó en muestras de sangre, mediante la adquisición de datos en modalidad no dirigida, y su procesamiento de modo dirigido. Esta aproximación resulta en métodos altamente versátiles y eficientes para el análisis de drogas y fármacos [7]. Otro ejemplo de análisis toxicológico corresponde a un método de screening para sangre que incluyó 185 compuestos, incluyendo la cuantificación de 90 de ellos. Esto se llevó a cabo utilizando un instrumento UPLC-QTOF mediante el análisis no dirigido de las muestras en modo independiente de información (DIA) [8]. Si bien, DIA tiene la ventaja de que no se realiza una selección de los compuestos a fragmentar según la intensidad de la señal, presenta la desventaja de producir espectros de fragmentación mucho más complejos y difíciles de interpretar. Por otro lado, al utilizarse la adquisición en modo dependiente de información (DDA), es posible obtener espectros más sencillos, los que igualmente permiten el análisis no dirigido de compuestos desconocidos [9].



La simplicidad es una característica deseable y relevante en el análisis toxicológico, sobre todo si se desea aplicar de forma rutinaria [1]. En este trabajo, hemos querido aprovechar las ventajas de la técnica de UHPLC-QqTOF-MS para el screening de drogas, fármacos y metabolitos de interés toxicológico en muestras de sangre postmortem, manteniendo un enfoque basado en la simplicidad de los procesos involucrados. La preparación de las muestras se realizó mediante una simple precipitación de proteínas, para mantener al mínimo la selectividad de la extracción y permitir un análisis de amplio espectro. Para ello, se desarrolló una metodología mediante la adquisición no dirigida de la data y la identificación mediante el procesamiento de datos dirigido, utilizando una base de datos creada en el laboratorio a partir del análisis de soluciones estándares de los analitos. Con el objetivo de mantener la estrategia analítica lo más sencilla posible, se utilizó el modo de adquisición dependiente de información. Esta aproximación se utilizó en el análisis de muestras de sangre reales obtenidas de autopsias médico-legales.

## **6.2. Materiales y métodos**

### 6.2.1. Reactivos y materiales

Todos los reactivos fueron grado analítico o superior y se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania), a menos que se especifique lo contrario. Se utilizó

acetonitrilo (grado HPLC) para la preparación de muestras por precipitación de proteínas. Para la calibración de los instrumentos se utilizó formiato sódico, agua e isopropanol (grado LC-MS). Para el análisis instrumental se utilizaron como disolventes acetonitrilo, agua y ácido fórmico ( $\geq 98\%$ ) de grado LC-MS. Los estándares de drogas fueron proporcionados amablemente por el Servicio Médico Legal (SML) de Concepción, Chile. Para su análisis, se prepararon diluciones de concentración 1000 ng/mL de cada uno. Se utilizó prazepam (500 ng/mL) como estándar interno (IS), considerando nuestra experiencia previa [10].

#### 6.2.2. Muestras de sangre *postmortem*

Todas las muestras de sangre fueron proporcionadas por el SML, donde fueron analizadas previamente por GC-MS. La sangre *postmortem* blanco fue obtenida de autopsias médico-legales y analizada en busca de distintos compuestos por los servicios forenses y nuestro laboratorio antes de su uso. En este trabajo se analizaron un total de 17 muestras de sangre *postmortem* (8 de sangre cardiaca y 9 de sangre periférica). Como preparación de las muestras se utilizó precipitación de proteínas, siguiendo el protocolo utilizado en un trabajo anterior, con modificaciones mínimas [10]. En un tubo de centrífuga que contenía 200  $\mu$ L de sangre, se añadió un volumen de 1 mL de acetonitrilo a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  con 100 ng/mL de IS, seguido de agitación durante 1 min en Thermomixer C (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 2000 rpm. A continuación, la muestra se centrifugó a

15700 g durante 20 min a 4 °C. Se transfirió un volumen de 800 µL de sobrenadante a otro tubo y se evaporó hasta sequedad en un concentrador CentriVap refrigerado de LABCONCO (Kansas City, MO, EE.UU.). El extracto seco se resuspendió en 200 µL de una solución de acetonitrilo/agua (50/50 % v/v) con ácido fórmico al 0,1%. La solución resultante se transfirió a un vial de HPLC y se inyectó en el sistema UHPLC-MS.

### 6.2.3. Análisis instrumental

Para el análisis de todos los estándares y muestras de sangre se utilizó un instrumento UHPLC Elute acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (HRMS) Compact QqTOF (Bruker, Bremen, Alemania). Se utilizó el software Compass Hystar (Bruker) para el control del sistema de LC, y la adquisición de masas se logró utilizando el software Bruker otof Control 4.1. El análisis de datos se realizó utilizando los software Compass DataAnalysis 4.4 y TargetAnalysis 1.3 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania).

Para la separación cromatográfica, se utilizó una columna Acquity BEH C-18 (1,7 µm, 100 x 2,1 mm) con una pre-columna Acquity BEH C18 VanGuard (1,7 µm, 2,1 mm x 5 mm) a una temperatura de 40 °C. La fase móvil consistió en ácido fórmico al 0,1% en agua como disolvente A, y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1% como disolvente B. El flujo de trabajo se estableció en 0,3 mL/min y el volumen de inyección fue de 10 µL. El gradiente fue el siguiente: 0% de solvente

B se mantuvo durante 2 min, luego se aumentó linealmente hasta el 60% en 13 min y después hasta el 95% en 1 min, esto se mantuvo durante 2 min y finalmente el disolvente B se redujo de nuevo hasta el 0%, con 3 minutos de estabilización hasta la siguiente inyección. La detección por MS se realizó en modo de ionización positiva, las condiciones de la fuente ESI fueron: voltaje del capilar: +4500 V; presión del nebulizador: 1,5 bar; flujo del gas de secado: 9 L/min; T° de secado: 200 °C. La energía de colisión se fijó en 10-25 eV en modo stepping, se utilizó el modo Auto MS/MS (3 precursores/ciclo), el intervalo de barrido se situó entre 50-1000 m/z (modo centroide de 0,2 s). Para la calibración interna MS se utilizó una solución de formiato sódico 10 mM en agua/isopropanol (50/50 % v/v).

#### 6.2.4. Tratamiento de datos

Para la identificación dirigida de los compuestos de interés mediante el uso de los softwares TargetAnalysis 1.3 y DataAnalysis 4.4 de Bruker, se siguió el procedimiento utilizado previamente por Telving et al., con algunas modificaciones menores [11]. En primer lugar, se realizó la recalibración de cada cromatograma, considerando los valores de masas de la solución de calibración. Posteriormente, se generó un cromatograma de ion extraído (EIC), considerando el valor de m/z del ion precursor con una tolerancia de  $\pm 0.01$  Da, de donde fue posible observar los picos cromatográficos de cada analito. A partir de ellos, se obtuvieron sus respectivos espectros de masas y los espectros de fragmentación.

La comparación de las masas medidas para el ion precursor con la masa teórica, permite al software el cálculo del error de masas en ppm. Inicialmente, se estableció una tolerancia de  $\pm 12$  ppm de error. El software también permite comparar el patrón isotópico medido con los valores teóricos, al calcular los errores de masas de los picos de los isótopos y su abundancia relativa, lo que se expresa como valor mSigma. Se consideró un valor de mSigma máximo de 200, considerando que mientras menor sea el valor obtenido, mejor será la identificación. Este límite se estableció arbitrariamente basándose en la publicación de Telving *et al.*, quienes utilizaron el mismo software en su trabajo para screening toxicológico[11].

#### 6.2.5. Librerías utilizadas para la identificación

Utilizando los cromatogramas y la información espectral obtenida, se creó una biblioteca interna para 73 analitos (drogas, fármacos, metabolitos y estándar interno), utilizando los softwares TargetAnalysis 1.3 y DataAnalysis 4.4, de Bruker. La información contenida en esta base de datos consistió en el nombre del compuesto, fórmula molecular, tiempo de retención y relación masa/carga (m/z) del ion precursor (generalmente [M+H]<sup>+</sup>) y dos fragmentos característicos. Esta información se puede observar en la Tabla 6-1. Para la identificación tentativa de los analitos que no se encontraban incluidos en la base de datos

creada en el laboratorio, se revisó la información disponible en la librería de la Human Metabolome Database (HMDB) [12].

Tabla 6-1. Información utilizada para la creación de la biblioteca interna para identificación de compuestos de relevancia toxicológica en muestras de sangre postmortem.

Analito	Fórmula	Ion precursor [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Iones producto (m/z)		t <sub>R</sub> (min)
Morfina	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	286.1443	165.0699	181.0640	1.3
Morfina-3-glucurónido	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>9</sub>	462.1764	286.1438	268.1332	4.7
Morfina-6-glucurónido	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>9</sub>	462.1764	286.1438	268.1332	5.1
Codeína	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	300.1599	165.0675	215.1048	6.3
Oxicodona	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	316.1548	298.1411	241.1084	6.6
6-Acetylmorphine	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	328.1548	268.1330	211.0754	6.7
Escopolamina	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	304.1548	156.1019	138.0913	6.7
Hidrocodona	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	300.1599	199.0740	171.0804	6.8
MDMA	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>	194.1181	163.0708	105.0699	7.0
Etilmorfina	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	314.1756	257.1199	239.1067	7.3
MDEA	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	208.1337	163.0754	135.0441	7.4
Atropina	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	290.1732	124.1121	142.1226	7.5
Ketamina	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> CINO	238.0973	220.0888	207.0571	7.6
Benzoilecgonina	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	290.1394	168.1019	272.1281	7.9
Tramadol	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>2</sub>	264.1961	246.1852	121.0648	8.2
6-Acetylcodeine	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>	342.1706	282.1489	266.1185	8.4
7-aminoflunitrazepam	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> FN <sub>3</sub> O	284.1209	256.1245	135.0928	8.5
Heroína	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	370.1656	328.1243	211.0754	8.7
Meperidina	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>	248.1627	220.1332	174.1277	8.8
Zolpidem	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O	308.1735	235.1230	263.1179	8.8
Cocaína	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	304.1539	182.1176	105.0335	8.9
Clorfenamina	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> CIN <sub>2</sub>	275.1324	230.0731	167.0730	9.0
Clordiazepóxido	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> CIN <sub>3</sub> O	300.0902	283.0871	227.0496	9.2
LSD	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O	324.2048	223.123	281.1648	9.3

2C-I	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> INO <sub>2</sub>	308.0121	290.9877	275.9642	9.4
O-desmetilvenlafaxina	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>2</sub>	264.1981	246.1852	201.1274	9.4
PCP	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> N	244.2036	91.0542	117.0699	9.7
Propranolol	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>	260.1638	183.0804	218.1176	9.9
Quetiapina	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	384.1713	253.0794	247.1230	10.0
Midazolam	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> ClFN <sub>3</sub>	326.0826	291.1166	249.0823	10.1
Fentanilo	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O	337.2265	188.1434	132.0802	10.1
Bromazepam	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> BrN <sub>3</sub> O	316.0077	182.0838	209.0947	10.3
1-Hydroximidazolam	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> ClFN <sub>3</sub> O	342.0814	324.0698	297.0589	10.3
Difenhidramina	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO	256.1688	167.0855	152.0621	10.3
Flurazepam	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> ClFN <sub>3</sub> O	388.1563	315.0671	271.0433	10.4
Citalopram	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> FN <sub>2</sub> O	325.1696	262.1027	234.0714	10.6
Haloperidol	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> ClFNO <sub>2</sub>	376.1459	165.0710	358.1368	10.7
Doxepina	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO	280.1678	235.1117	202.0777	10.8
EDDP	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> N	278.1876	234.1277	219.1043	10.9
Digoxina	C <sub>41</sub> H <sub>64</sub> O <sub>14</sub>	781.4375	391.2479	651.3739	11.4
Desipramina	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub>	267.1838	236.1434	208.1121	11.4
Carbamazepina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	237.1009	194.0964	220.0757	11.5
Ciclobenzaprina	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> N	276.174	231.1168	215.0855	11.5
Propoxifeno	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>2</sub>	340.2265	266.1903	221.1317	11.6
Imipramina	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub>	281.1988	236.1434	208.1121	11.6
Nitrazepam	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	282.0858	268.0842	207.0917	11.7
Metadona	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> NO	310.214	265.1587	223.1117	11.7
Amitriptilina	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N	278.1880	233.1325	191.0855	11.8
Oxazepam	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	287.0574	241.0527	269.0476	12.0
Clorpromazina	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> S	319.1018	246.0139	214.0418	12.0
Sertralina	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N	306.0798	275.0389	158.9763	12.1
25I-NBOMe	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> INO <sub>3</sub>	428.0697	121.0648	93.0699	12.1
Clonazepam	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	316.0461	302.0428	214.0418	12.2
Sibutramina	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> ClN	280.1822	139.0309	179.0622	12.2
Lorazepam	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	321.0175	275.0137	303.0086	12.3
Alprazolam	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>4</sub>	309.0887	281.0726	205.0772	12.3
Metacualona	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O	251.1155	132.0812	117.0573	12.3
Sildenafil	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	475.2108	377.1357	312.1581	12.3
Nordiazepam	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O	271.0617	243.0684	208.0961	12.4
Loratadina	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	383.1495	337.1102	267.0809	12.4
Clomipramina	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub>	315.1595	242.0731	270.1044	12.5
Triazolam	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	343.0496	239.0371	308.0823	12.6

Flunitrazepam	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	314.0918	300.0905	239.0979	12.8
Temazepam	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> CIN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	301.0722	283.0626	255.0675	13.0
Clobazam	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> CIN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	301.0729	259.0633	224.0944	13.3
Lormetazepam	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	335.0339	317.0243	279.045	13.4
Flunarizina	C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	405.2100	203.0667	183.0605	13.5
Diazepam	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> CIN <sub>2</sub> O	285.0778	193.0886	257.0840	13.7
Warfarina	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	309.1105	251.0703	223.0754	14.3
Misoprostol (fragmento)	C <sub>22</sub> H <sub>37</sub> O <sub>4</sub>	365.2682	333.2424	347.2581	15.2
11-nor-9-carboxi-Δ9-THC	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	345.2026	327.1928	299.1979	17.3
Cannabidiol	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	315.2283	259.1693	273.1849	17.7
Δ9-THC	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	315.2283	247.1693	221.1536	18.0

#### 6.2.6. Validación del método y evaluación del efecto matriz

La validación del método cualitativo se realizó considerando 14 analitos representativos de diferente naturaleza química y características cromatográficas, los cuales corresponden al 20% del total de los compuestos incluidos en el método. Cuando se trabaja en LC-MS, es necesario hacer una evaluación del efecto matriz para establecer qué tan afectada se ve la ionización de un analito en presencia de la matriz. Este efecto puede generar una variación positiva o negativa de la señal, también conocida como supresión iónica [7]. Para evaluar este parámetro, se procedió en concordancia con lo establecido en diferentes normativas en cuanto a la validación de metodologías bioanalíticas, según una revisión publicada por González *et al* [121]. Se prepararon 3 grupos de muestras añadidas: un grupo correspondió a una solución de los analitos libre de matriz (A), otro correspondió a muestras añadidas después del proceso de



extracción de una matriz blanco (B) y el último correspondió a matriz añadida antes del proceso de extracción (C). Los grupos de muestras se prepararon en triplicado a 3 niveles de concentración (50, 250 y 500 ng/L). El efecto matriz se puede definir como el coeficiente entre la respuesta de B sobre A. Para expresarlo porcentualmente como la diferencia entre el resultado obtenido y el esperado, puede multiplicarse el factor (B/A) por 100 y restarle 100 al valor obtenido. Un número negativo indica la presencia de supresión iónica, mientras que un número positivo indica el porcentaje en que aumenta la señal por efecto de la matriz. Utilizando este procedimiento, también es posible calcular la recuperación (R) como  $R(\%) = (C/B) \times 100$  y la eficiencia del proceso PE como  $PE(\%) = (C/A) \times 100$ .

### **6.3. Resultados y discusión**

#### **6.3.1. Validación del método**

El método fue desarrollado para la detección de 73 compuestos de relevancia toxicológica, mediante el uso de la biblioteca interna creada en el laboratorio. La selectividad se consideró adecuada, debido a que la extracción de los EIC no fue afectada por interferentes. En el caso de existir señales que no correspondan al analito, se debe considerar el tiempo de retención y la exactitud de masas (error < 12 ppm), los que permiten la identificación adecuada de la señal del analito y

su diferenciación con respecto de sus isóbaros e isómeros. En la Figura 6-1, se pueden apreciar los cromatogramas obtenidos para los distintos analitos incluidos en el método, con una tolerancia de  $\pm 0.01$  Da.

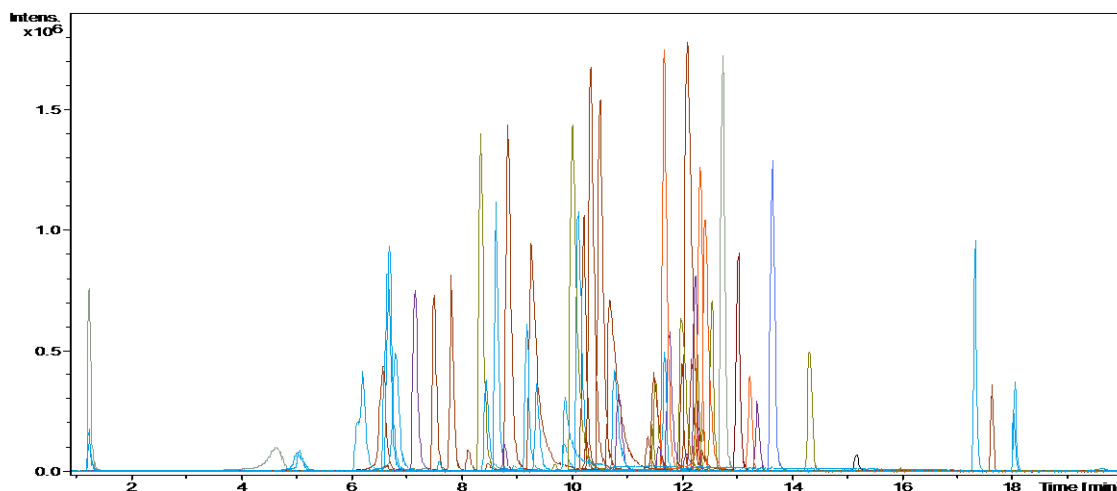


Fig. 6-1. Cromatogramas de iones extraídos (EIC) para los 73 analitos incluidos en la biblioteca interna, considerando  $m/z$  de  $[M+H]^+ \pm 0.01$  Da y una concentración de  $1 \mu\text{g/mL}$  para cada solución estándar.

Para la validación de los parámetros de sensibilidad, recuperación y efecto matriz, se consideró un total de 14 analitos. Con respecto a la sensibilidad, en la Tabla 6-2, se pueden observar los valores de límites de identificación (LOI) obtenidos para los analitos evaluados. El cálculo se realizó considerando el límite de identificación como la concentración a la cual la relación señal/ruido del pico cromatográfico alcance un valor mayor o igual a 5. Evidentemente, es necesario evaluar que la señal alcanzada permita obtener la suficiente información para la

identificación de los distintos compuestos, entre ellas, un error de masas menor a 12 ppm, un valor de mSigma menor que 200 y, de ser necesario, que sea posible observar el patrón de fragmentación de la molécula de interés, para compararlo con la base de datos interna, u otras disponibles en línea, como HMDB.

Tabla 6-2. Datos de límite de identificación obtenidos para los analitos considerados en la validación del método.

Analito	LOI (ng/mL)
Escopolamina	2
Heroína	2
Cocaína	1
LSD	2
2C-I	12
Quetiapina	4
Fentanilo	1
Citalopram	2
Haloperidol	2
Imipramina	9
25I-NBOMe	1
Sertralina	10
Clonazepam	8
Tramadol	4

Como aproximación para la evaluación de la precisión del método, se estudió la repetibilidad del análisis de los 14 analitos por triplicado a 3 niveles de

concentración, en términos de desviación estándar relativa (%RSD). El nivel más bajo analizado correspondió a 50 ng/mL, el nivel medio a 250 ng/mL y el nivel alto, correspondió a una concentración de 500 ng/mL. Generalmente, para metodologías bioanalíticas se puede considerar como aceptable un valor de RSD de hasta un 15% [121]. Los resultados presentados en la Tabla 6-3, demuestran que el método desarrollado cumple satisfactoriamente con este parámetro en todos los niveles de concentración evaluados, ya que para todos los analitos fue posible alcanzar valores de %RSD menores al 10%.

Tabla 6-3. Resultados para la repetibilidad del método a 3 niveles de concentración.

Nivel	RSD (%)		
	50 ng/mL	250 ng/mL	500 ng/mL
Escopolamina	9.2	3.2	7.2
Heroína	8.5	6.2	6.9
Cocaína	4.7	7.9	7.8
LSD	8.1	4.9	5.1
2C-I	6.6	2.6	7.5
Quetiapina	7.8	5.0	5.7
Fentanilo	7.0	5.4	6.3
Citalopram	8.6	6.1	7.1
Haloperidol	7.0	7.3	7.1
Imipramina	9.1	6.4	7.9
25I-NBOMe	5.9	4.4	3.2
Sertralina	8.7	6.4	8.4
Clonazepam	8.9	7.1	5.9
Tramadol	4.3	6.3	5.3

RSD: Desviación estándar relativa.

### 6.3.2. Efecto matriz

La preparación de la muestra mediante el uso de precipitación de proteínas es muy sencilla y rápida. Además, permite una extracción no selectiva, por lo que resulta muy útil cuando el objetivo del análisis es abarcar la mayor cantidad de compuestos de diferente naturaleza química a la vez. Sin embargo, cuenta con la desventaja de no ser suficiente para eliminar el efecto matriz producido por la presencia de interferentes en las muestras de sangre [122]. Estos antecedentes implican la necesidad de evaluar el efecto que tiene la matriz sobre la señal de los analitos. Los resultados obtenidos para la evaluación del efecto matriz se encuentran en la Tabla 6-4. Así mismo, también se encuentran los resultados para la recuperación y la eficiencia del proceso.

Como se puede observar, existe una gran influencia de la matriz sobre varios analitos. En general, no se observa una supresión iónica demasiado relevante. El compuesto que mayor sufre supresión es clonazepam en el nivel de concentración más alto, sin embargo, la reproducibilidad y sensibilidad del análisis no se ven afectadas por ello, por lo que podría no ser relevante para la correcta identificación del analito en una muestra. Por otro lado, se observa un efecto positivo sobre la señal de varios analitos debido a la presencia de la matriz, sobre todo el en nivel de concentración más bajo. Esto se observa principalmente para tramadol, donde la señal al nivel de concentración más bajo crece en más de un 100% con respecto a la señal obtenida para las soluciones sin matriz. Esto

también se observa, aunque en menor proporción, para sertralina y LSD, los que presentan un aumento de la señal mayos a un 80% por efecto de la matriz. Sin embargo, esto disminuye drásticamente a niveles de concentración más altos.

Tabla 6-4. Resultados obtenidos para el efecto matriz, la recuperación y la eficiencia del proceso para el método desarrollado

Nivel*	Efecto matriz (%)			Recuperación (%)			Eficiencia del proceso (%)		
	50 ng/mL	250 ng/mL	500 ng/mL	50 ng/mL	250 ng/mL	500 ng/mL	50 ng/mL	250 ng/mL	500 ng/mL
Escopolamina	-13	-11	-13	62	74	76	54	66	66
Heroína	13	7	-5	71	72	73	81	77	70
Cocaína	2	-5	-13	62	62	71	63	59	62
LSD	84	27	4	63	65	69	115	83	72
2C-I	22	3	-10	63	69	73	76	71	66
Quetiapina	5	15	10	66	69	75	69	79	82
Fentanilo	-1	-4	-12	63	65	71	63	63	62
Citalopram	-4	-6	-15	66	70	75	63	66	64
Haloperidol	-13	-3	-13	63	67	74	54	64	65
Imipramina	4	-5	-15	62	63	74	64	60	63
25I-NBOMe	7	-9	-15	64	67	71	68	61	60
Sertralina	93	25	6	48	61	65	93	76	69
Clonazepam	-15	-13	-17	67	64	70	57	56	58
Tramadol	110	18	6	83	71	74	174	84	79

Si bien la repetibilidad y sensibilidad de los análisis no parece verse afectada, si se quisiera validar el método para el análisis cuantitativo de estos compuestos, lo más correcto sería realizar un estudio más elaborado para establecer que se cumple la linealidad del método, aún cuando la señal del analito se vea afectada por el efecto matriz.

Con respecto a la recuperación, se puede observar que la mayoría de los analitos presentan recuperaciones mayores al 60%, excepto sertralina, la que, a niveles bajos de concentración, presenta una recuperación de un 48%. A pesar de ello, los análisis son reproducibles, como se muestra en la Tabla 6-3, por lo que, si la detección se realiza con suficiente sensibilidad, esto no debiese tener un efecto negativo sobre la identificación de los analitos.

### 6.3.3. Aplicación del método

Utilizando el método desarrollado, se realizó el análisis de un total de 17 muestras reales de sangre *postmortem*, facilitadas por el SML. Estas muestras habían sido previamente analizadas mediante el método de rutina utilizado en su laboratorio, el cual comprende una preparación de las muestras por SPE con columnas de fase mixta (C8/SCX) y el análisis por GC-NPD/ $\mu$ ECD para benzodiazepinas, o por GC-MS para los otros analitos, previa derivatización por sililación con BSTFA + 10% TMCS.

Tabla 6-5. Compuestos identificados en muestras de sangre de casos forenses auténticos.

<b>Caso</b>	<b>Matriz*</b>	<b>Analito</b>	<b>error (ppm)</b>	<b>mSigma</b>
1	SC	Propanolol	4.6	5.1
		Quetiapina	3.4	10.5
		Trihexifenidilo	0.9	9
2	SC	Tramadol	6.8	9
3	SF	Tramadol	1.9	9.1
4	SC	Carbamazepina	0.9	10.6
		Venlafaxina	5.3	1.7
		Topiramato	1.4	5.1
		O-desmetilvenlafaxina	1.7	0.4
5	SC	Clozapina	7.2	9.4
6	SF	Sertralina	4.4	60.3
7	SC	Venlafaxina	2.5	5.6
		Tramadol	4.7	5.4
		O-desmetilvenlafaxina	5.8	20.1
		1-Hidroximidazolam	4.1	63.2
		Midazolam	4.3	18
8	SF	Quetiapina	7.9	6.1
		Sertralina	8.4	6.7
9	SC	Midazolam	6.8	13.6
		1-Hidroximidazolam	5.4	8.1
10	SF	Amitriptilina	4.5	14.8
11	SF	Ciclobenzaprina	0.4	1.4
12	SF	Ciclobenzaprina	1.6	20.9
		Alprazolam	5.3	44.3
13	SF	Amitriptilina	3	0.6
14	SC	Nordiazepam	4.2	96.7
15	SF	Nordiazepam	3.6	84.8
16	SC	Clobazam	0.3	12.4
17	SF	Diazepam	0.6	3.8
		Nordiazepam	1	21.7

\*Matriz SC: Sangre cardíaca; SF: Sangre femoral.



En la Tabla 6-5 se pueden observar los resultados obtenidos para la identificación de 14 analitos que se encontraban incluidos en la biblioteca interna creada en nuestro laboratorio. A partir de estos datos se puede observar que ningún analito supera los 10 ppm de error de masas, ni un valor de mSigma de 100. Estos parámetros nos permiten realizar la identificación inequívoca de todos los compuestos que se encontraban considerados dentro de la biblioteca interna, la que además incluye el tiempo de retención e información de fragmentación. La identificación de todos los analitos encontrados por nuestro método coincide con la realizada por el SML.

Tabla 6-6. Información utilizada para la identificación de fármacos en muestras de sangre *postmortem*.

Analito	Fórmula	Ion precursor [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Iones producto (m/z)		t <sub>R</sub> (min)
Trihexifenidilo	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> NO	302.2471	98.1000	82.0600	12.2
Venlafaxina	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>2</sub>	278.2107	121.0600	78.0500	9.9
Topiramato	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>8</sub> S	340.1069	81.0333	121.0633	11.2
Clozapina	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>4</sub>	327.1354	270.0800	192.0700	10.0

Por otro lado, debido a que la adquisición de los datos se realizó en modo no dirigido, también ha sido posible, hasta ahora, realizar la identificación tentativa de 4 compuestos de relevancia toxicológica que no habían sido incluidos en la

librería: trihexifenidilo, venlafaxina, topiramato y clozapina. La información de fragmentación para estos compuestos se puede observar en la tabla 6-6.

#### **6.4. Conclusión**

El método UHPLC-QqTOF-MS/MS desarrollado, permite el screening de muestras de sangre *postmortem* para la identificación de drogas, fármacos y metabolitos, con altos niveles de confianza. Esto se realizó tanto utilizando la biblioteca creada en el laboratorio, como mediante la confirmación de la identidad de compuestos sospechosos por comparación de sus características con los valores teóricos entregados por bases de datos disponibles en línea, por ejemplo, HMDB. La extracción miniaturizada mediante precipitación de proteínas fue rápida y sencilla, no incluyó ningún tipo de material o dispositivo especial y permitió alcanzar una buena sensibilidad utilizando sólo 200 µL de muestra de sangre. El uso de técnicas de LC-HR-MS, permite aumentar la capacidad analítica con respecto a los métodos convencionales por GC-MS o LC-MS, ya que su versatilidad y sensibilidad permiten la aplicación de flujos de trabajo más sencillos y rápidos, previo al análisis instrumental. Finalmente, la obtención de la data mediante adquisición no dirigida permite el estudio retrospectivo de los resultados para la identificación de compuestos desconocidos, sin la necesidad de repetir el análisis.

## **6.5. Agradecimientos**

Los autores quisieran agradecer al Servicio Médico Legal de Concepción, Chile, por el apoyo prestado para el desarrollo de este trabajo. También agradecemos a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) del Ministerio de Ciencia y Tecnología del Gobierno de Chile, por el apoyo económico entregado mediante la Beca ANID de Doctorado Nacional 21170443, y los proyectos FONDEQUIP 170023 y FONDECYT 1191276.

## 6.6. Referencias

- [1] M. Mardal, O.M. Fuskevåg, P.W. Dalsgaard, Comprehensive UHPLC-HR-MSE screening workflow optimized for use in routine laboratory medicine: Four workflows in one analytical method, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 196 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.113936>.
- [2] J.B. Stephenson, M.L. Flater, J. Austin, L.T. Bain, L.A. Holt, J.M. Mehan, Comprehensive Drug Screening of Whole Blood by LC-HRMS-MS in a Forensic Laboratory, *J. Anal. Toxicol.* 45 (2021) 243–251. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa073>.
- [3] J. Gevorkyan, M. Wong, S. Pearring, L.N. Rodda, Method consolidation to improve scope and efficiency in postmortem toxicology, *J. Anal. Toxicol.* 44 (2021) 422–439. <https://doi.org/10.1093/JAT/BKAA003>.
- [4] A.G. Helfer, J.A. Michely, A.A. Weber, M.R. Meyer, H.H. Maurer, Liquid chromatography-high resolution-tandem mass spectrometry using Orbitrap technology for comprehensive screening to detect drugs and their metabolites in blood plasma, *Anal. Chim. Acta.* 965 (2017) 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.002>.
- [5] D. Remane, D.K. Wissenbach, F.T. Peters, Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology — An update, *Clin. Biochem.* 49 (2016) 1051–1071. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.07.010>.
- [6] M. Grapp, C. Kaufmann, F. Streit, L. Binder, Systematic forensic toxicological analysis by liquid-chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry in serum and comparison to gas chromatography-mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 287 (2018) 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.03.039>.
- [7] E. Partridge, S. Trobbiani, P. Stockham, T. Scott, C. Kostakis, A Validated Method for the Screening of 320 Forensically Significant Compounds in Blood by LC/QTOF, with Simultaneous Quantification of Selected Compounds, *J. Anal. Toxicol.* 42 (2018) 220–231. <https://doi.org/10.1093/jat/bkx108>.
- [8] S. Bidny, K. Gago, P. Chung, D. Albertyn, D. Pasin, Simultaneous screening and quantification of basic, neutral and acidic drugs in blood using UPLC-QTOF-MS, *J. Anal. Toxicol.* 41 (2017) 181–195. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw118>.

- [9] M. Sundström, A. Pelander, I. Ojanperä, Comparison of post-targeted and pre-targeted urine drug screening by UHPLC-HR-QTOFMS, *J. Anal. Toxicol.* 41 (2017) 623–630. <https://doi.org/10.1093/JAT/BKX044>.
- [10] C. Vejar-Vivar, L. Bustamante, R. Lucena, C. Ortega, M. Valenzuela, C. Mardones, Direct coupling of MEPS to ESI-QqTOF-MS for the simultaneous analysis of tricyclic antidepressants and benzodiazepines in postmortem blood, *Microchem. J.* 171 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106797>.
- [11] R. Telving, J.B. Hasselstrøm, M.F. Andreasen, Targeted toxicological screening for acidic, neutral and basic substances in postmortem and antemortem whole blood using simple protein precipitation and UPLC-HR-TOF-MS, *Forensic Sci. Int.* 266 (2016) 453–461. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.07.004>.
- [12] D.S. Wishart, A.C. Guo, E. Oler, F. Wang, A. Anjum, H. Peters, R. Dizon, Z. Sayeeda, S. Tian, B.L. Lee, M. Berjanskii, R. Mah, M. Yamamoto, J. Jovel, C. Torres-Calzada, M. Hiebert-Giesbrecht, V.W. Lui, D. Varshavi, D. Varshavi, D. Allen, D. Arndt, N. Khetarpal, A. Sivakumaran, K. Harford, S. Sanford, K. Yee, X. Cao, Z. Budinski, J. Liigand, L. Zhang, J. Zheng, R. Mandal, N. Karu, M. Dambrova, H.B. Schiöth, R. Greiner, V. Gautam, HMDB 5.0: The Human Metabolome Database for 2022, *Nucleic Acids Res.* 50 (2022) D622–D631. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1062>.
- [13] L.C. de C. Abrão, A.T. Silveira, H.D. de Faria, S.C. Machado, T.V. Mendes, R.V. Plácido, L.P. de A. Marciano, I. Martins, Toxicological analyses: analytical method validation for prevention or diagnosis, *Toxicol. Mech. Methods.* 31 (2021) 18–32. <https://doi.org/10.1080/15376516.2020.1839612>.
- [14] O. González, M.E. Blanco, G. Iriarte, L. Bartolomé, M.I. Maguregui, R.M. Alonso, Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect, *J. Chromatogr. A.* 1353 (2014) 10–27. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.077>.
- [15] A.T. Roemmelt, A.E. Steuer, T. Kraemer, Liquid Chromatography, in Combination with a Quadrupole Time-of-Flight Instrument, with Sequential Window Acquisition of All Theoretical Fragment-Ion Spectra Acquisition: Validated Quantification of 39 Antidepressants in Whole Blood As Part of a Simultane, *Anal. Chem.* 87 (2015) 9294–9301. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02031>.

## CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES

A partir del presente trabajo de tesis se puede concluir que la innovación en estrategias analíticas y el desarrollo de nuevos materiales de extracción permite alcanzar resultados adecuados en términos de sensibilidad, selectividad y eficiencia, para la determinación de drogas y fármacos en muestras biológicas, contribuyendo al análisis toxicológico sostenible.

El acoplamiento directo de un dispositivo comercial de microextracción (MEPS) al instrumento ESI-QqTOF-MS, permitió la detección no selectiva de benzodiazepinas y antidepresivos con adecuados niveles de sensibilidad, exactitud y precisión. Esta estrategia analítica implicó un menor gasto de solventes orgánicos que los métodos cromatográficos convencionales, y en un tiempo de análisis reducido, lo que se encuentra en concordancia con los principios de la química analítica sostenible.

La polidopamina demostró tener una alta capacidad de retención de drogas y fármacos al utilizarse como recubrimiento en dispositivos de extracción basados en agujas hipodérmicas, los cuales pudieron obtenerse mediante un sencillo procedimiento de síntesis de bajo costo. Fue posible utilizar estos dispositivos para la extracción de antidepresivos tricíclicos desde muestras de saliva y su posterior análisis por espectrometría de masas de manera *offline* con suficiente

sensibilidad. La simplicidad del método de extracción, así como el análisis no separativo por espectrometría de masas, permitió el uso de bajos volúmenes de solvente, lo que contribuye al análisis sostenible.

Las agujas recubiertas con polidopamina, utilizadas como dispositivos de microextracción en muestras de fluido oral, también pudieron acoplarse directamente a un espectrómetro de masas como emisores de electrospray para la elución/ionización simultánea de drogas de abuso. Esto permitió reducir el tiempo de análisis y el gasto de reactivos, lo que resultó en un método eficiente y sostenible.

Finalmente, fue posible la extracción compuestos de relevancia toxicológica y sus metabolitos en muestras de sangre gracias a un sencillo método de preparación de muestra basado en una precipitación de proteínas miniaturizada, la cual permitió alcanzar una sensibilidad adecuada sin la necesidad de materiales o dispositivos especiales ni tratamientos químicos complejos, de acuerdo con lo planteado en los principios de la química analítica sostenible. El acoplamiento de este método a UHPLC-QqTOF-MS/MS permitió el análisis de compuestos de diferentes familias farmacológicas, incluso de forma retrospectiva, gracias al gran poder de identificación de la espectrometría de masas de alta resolución. El análisis no dirigido presenta grandes ventajas para el screening toxicológico, sobre todo considerando la gran cantidad y variedad de compuestos que pueden encontrarse presentes en una muestra biológica forense.

## PRODUCTIVIDAD Y BECAS

Del presente trabajo de tesis derivaron las siguientes publicaciones científicas:

- C. Vejar-Vivar, J. Millán-Santiago, C. Mardones, R. Lucena, S. Cárdenas, “Polydopamine inner wall-coated hypodermic needle as microextraction device and electrospray emitter for the direct analysis of illicit drugs in oral fluid by ambient mass spectrometry,” *Talanta*, vol. 249, p. 123693, 2022, doi: 10.1016/j.talanta.2022.123693.
- C. Vejar-Vivar, M. T. García-Valverde, C. Mardones, R. Lucena, and S. Cárdenas, “Polydopamine coated hypodermic needles as a microextraction device for the determination of tricyclic antidepressants in oral fluid by direct infusion MS/MS,” *RSC Adv.*, vol. 11, no. 37, pp. 22683–22690, Jun. 2021, doi: 10.1039/d1ra02721b.
- C. Vejar-Vivar, L. Bustamante, R. Lucena, C. Ortega, M. Valenzuela, and C. Mardones, “Direct coupling of MEPS to ESI-QqTOF-MS for the simultaneous analysis of tricyclic antidepressants and benzodiazepines in postmortem blood,” *Microchem. J.*, vol. 171, 2021, doi: 10.1016/j.microc.2021.106797.



Los resultados de esta tesis doctoral han sido presentados en los siguientes eventos científicos:

- “Analytical developments in miniaturized extraction systems for the determination of drugs and pharmaceuticals in biological samples”. Modalidad oral. XLIII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Diciembre, 2022. Punta Arenas, Chile.
- “Polydopamine coated hypodermic needles as a microextraction device for the determination of tricyclic antidepressants in oral fluid by direct infusion MS/MS”. Modalidad poster. XV Encuentro de Química Analítica y Ambiental, XXIV International Symposium on Advances in Extraction Technologies. Octubre, 2022. Iquique, Chile.
- “Direct coupling of MEPS to ESI-QqTOF-MS for the simultaneous analysis of tricyclic antidepressants and benzodiazepines in postmortem blood”. Modalidad oral (online). 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020, XVIII COLACRO, X COCOCRO, II SPAE y IV C2B2. Octubre, 2021. Cartagena, Colombia.
- “Desarrollo de una metodología basada en GC-MS/MS para determinación de benzodiazepinas en sangre”. Modalidad poster. XIII Simposio Latinoamericano de Química Analítica y Ambiental, XIV Encuentro de Química Analítica y Ambiental. Noviembre, 2018. La Serena, Chile.

Para el desarrollo de este trabajo se contó con los siguientes beneficios:

- Beca ANID de Doctorado Nacional 2017. Folio N° 2117044. Beca para realizar estudios de doctorado en Chile.
- Gastos de operación para la tesis doctoral, Beca ANID de Doctorado Nacional 2017. Folio N° 2117044.
- Pasantía Beca ANID de Doctorado Nacional 2017. Folio N° 2117044. Esta estancia de investigación se llevó a cabo durante 10 meses, entre los años 2020 y 2021, en el Grupo de Investigación: “Affordable and Sustainable Sample Preparation (AS2P)” del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba, España.

**ANEXO: BASES PARA EL DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA  
BASADA EN GC-MS/MS PARA LA DETERMINACIÓN DE  
BENZODIAZEPINAS EN SANGRE**

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para el trabajo desarrollado en el marco de la segunda Unidad de Investigación como requisito del programa de Doctorado en Ciencias y Tecnología Analítica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción. La investigación se realizó en el Departamento de Análisis Instrumental con apoyo del Servicio Médico Legal de Concepción, y sirvió como una primera aproximación al análisis toxicológico y el bioanálisis.

**Búsqueda de soluciones para problemáticas analíticas del Servicio Médico Legal de Concepción: Desarrollo de una metodología basada en GC-MS/MS para la determinación de benzodiazepinas en sangre.**

Carmina Vejar Vivar

Profesora Guía: Dra. Claudia Mardones Peña

Profesor Co-guía: Dr. Luis Bustamante Salazar

## Resumen

Las benzodiazepinas son fármacos que se utilizan como ansiolíticos, hipnóticos, sedantes y anticonvulsivantes. Sin embargo, se ha descrito su uso no terapéutico como sustancias recreativas, en intentos de suicidio o como facilitadores de delitos, lo que se considera un problema grave a nivel mundial.

En Concepción, el Servicio Médico Legal realiza la determinación de benzodiazepinas en matrices biológicas (sangre, orina y vísceras) utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de nitrógeno-fósforo y a un detector de microcaptura de electrones. Sin embargo, la detección de ciertas benzodiazepinas es muy compleja en estas matrices debido a una baja sensibilidad del método y/o una baja eficiencia cromatográfica.

En este trabajo se desarrolló una metodología para la determinación de benzodiazepinas en sangre *postmortem*, con el objetivo de mejorar la sensibilidad y eficiencia del análisis mediante la derivatización por sililación de los analitos y su posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem en modo de monitoreo de reacciones múltiples (MRM). El método permitió el análisis de seis benzodiazepinas, obteniéndose una sensibilidad de hasta 20 veces mayor para clonazepam y lorazepam con respecto al método utilizado por el SML para análisis de rutina.

## **1. Introducción**

Las benzodiazepinas (BZD) son fármacos depresores del sistema nervioso central (SNC) que se utilizan en el tratamiento de distintos desórdenes como ansiedad, insomnio, epilepsia y abstinencia alcohólica, entre otros [1]. Debido a sus efectos terapéuticos, las BZD son uno de los grupos farmacéuticos más prescritos y utilizados. Existen más de 50 derivados de BZD en el mundo, y la mayoría se encuentran bajo control internacional de sustancias psicotrópicas [2].

Las BZD son fármacos económicos, efectivos y mayormente seguros, sin embargo, pueden causar tolerancia, adicción, síntomas de abstinencia y efectos adversos de tipo cognitivo [3]. Dependiendo la dosis y la tolerancia del usuario, el uso de BZD puede causar desde somnolencia y fatiga hasta mareos, cambios de humor, euforia y problemas de coordinación. Las sobredosis se caracterizan por la presencia de ansiedad, agitación, amnesia y alteración cognitiva [1]. Debido a estos efectos, el uso de BZD puede tener un impacto sobre el desempeño de una persona en actividades como la conducción de un vehículo o la concentración en su trabajo [4]. Por otro lado, su uso asociado a otros depresores, como alcohol, puede llevar a la hospitalización o incluso a la muerte [5] por depresión respiratoria [1].

Los crímenes facilitados por drogas (DFC) corresponden a delitos en los cuales la víctima pierde control sobre sus acciones o su capacidad de resistirse debido

al efecto de drogas o fármacos. Si bien existen distintos DFC, por lejos lo más común es la agresión sexual facilitada por drogas, donde la víctima es sometida a un acto sexual no consentido por encontrarse inconsciente o incapacitada por efecto del alcohol y/o otras drogas o fármacos [6]. Los efectos adversos de las BZD las convierten en uno de los grupos farmacológicos preferidos para llevar a cabo este tipo de delitos [7].

En los últimos años, el uso no terapéutico de BZD se ha extendido en la población mundial, por lo que están comúnmente involucradas en casos médico-legales como accidentes de tránsito, sobredosis y suicidios [3]. Así mismo, su uso no terapéutico como drogas recreacionales o como facilitadoras de delitos, representan un problema grave en muchos países [8]. Debido a ello, el análisis toxicológico de estos fármacos es esencial para establecer su relación con el abuso de fármacos o la causa de muerte en un individuo [9].

El análisis de BZD ha sido reportado tanto por HPLC [1,5,10,11] como por GC [3,8,9,12]. Sin embargo, los analitos más polares suelen presentar problemas para ser analizados por GC, por lo que muchos métodos incluyen un paso de derivatización para mejorar la sensibilidad y eficiencia de la determinación [13], el cual usualmente implica una reacción de sililación [9,14], acetilación [15] o alquilación [2,16,17].

Las matrices más comúnmente utilizadas son plasma y orina, debido a que presentan una mayor concentración del fármaco [2], sin embargo, también pueden utilizarse otras muestras como sangre, bilis, humor vítreo, médula ósea, vísceras [18], pelo y uñas [2,16]. En muestras biológicas complejas, la presencia de BZD generalmente se encuentra a niveles traza ( $\mu\text{g/mL}$  o  $\text{ng/mL}$ ), por lo que es necesario remover interferentes previo a su análisis [2]. Las técnicas clásicas como LLE y SPE son los procedimientos más utilizados para aislar las BZD de la matriz, además, muchas veces es necesario un ajuste previo del pH o precipitación de proteínas [16]. También se ha descrito el uso de la técnica QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) modificada para la extracción de algunas BZD en sangre [19,20], vísceras [18] y bebidas alcohólicas [8], la cual, según su nombre en inglés lo indica, promete ser rápida, fácil, económica, efectiva, robusta y segura.

En Chile, el Servicio Médico Legal (SML) realiza el análisis de BZD en sangre postmortem mediante el análisis por GC acoplado a detectores de nitrógeno-fósforo y micro-captura de electrones (NPD/ $\mu\text{ECD}$ ), previo tratamiento de la muestra por SPE con columnas de fase mixta C8/SCX [10]. La tabla1 incluye características y propiedades fisicoquímicas obtenidas de bases de datos disponibles en línea para algunas de las BZD que suelen ser analizadas en el SML.

Tabla 1. Características fisicoquímicas y farmacológicas para benzodiazepinas a estudiar [21-23].

Fármaco	Peso molecular (g/mol)	pKa	logP	Conc. terapéutica (µg/mL)	Toxicidad (µg/mL)
Alprazolam	308.769	5.01	2.12	0.2 – 0.4	0.1 - 0.4
Clonazepam	315.713	1.65; 1.89	2.41	0.02 – 0.07	> 0.1
Diazepam	284.743	2.92	2.82	0.1 – 1.0	> 1.5
Lorazepam	321.157	10.61	2.39	0.08 – 0.25	> 0.3
Midazolam	325.771	6.19	3.33	0.04 – 0.1	> 1.0
Nordiazepam	270.716	2.85; 12.3	2.93	0.17	> 0.6
Prazepam	324.808	3.06	3.86	0.2 – 0.7	> 1.0

En este trabajo, se desarrolló un método por GC-MS/MS para la determinación de BZD en sangre postmortem. Como preparación de muestras se compararon dos técnicas. La primera fue SPE tal como se realiza actualmente en el SML de Concepción, utilizando 2 mL de sangre. Por otro lado, se estudió un tratamiento de muestra alternativo mediante QuEChERS, con el objetivo de reducir el volumen de muestra necesario. Las BZD se analizaron previa derivatización con BSTFA (10%TMCS), con el objetivo de mejorar la eficiencia cromatográfica y la



sensibilidad de la detección. La reacción de derivatización se encuentra representada en la Figura 1.

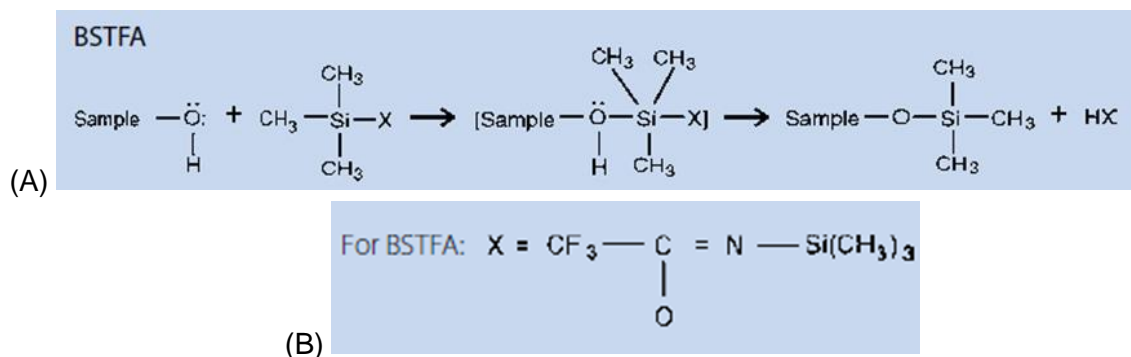


Fig. 1. (A) Reacción para siliación de una muestra utilizando BSTFA (10% TMCS). (B) Estructura del agente derivatizante BSTFA [24].

Como se observa en la figura anterior, los grupos funcionales susceptibles de ser derivatizados son grupos electronegativos que contengan un hidrógeno activo, como hidroxilos o aminas. Debido a sus características estructurales (Figura 2), las BZD susceptibles de derivatización serían nordiazepam, clonazepam y lorazepam, de las cuales las últimas dos se encuentran entre los analitos más polares incluidos en el método, por lo que se propone que el proceso de derivatización podría reducir los potenciales problemas de eficiencia cromatográfica y sensibilidad del análisis.

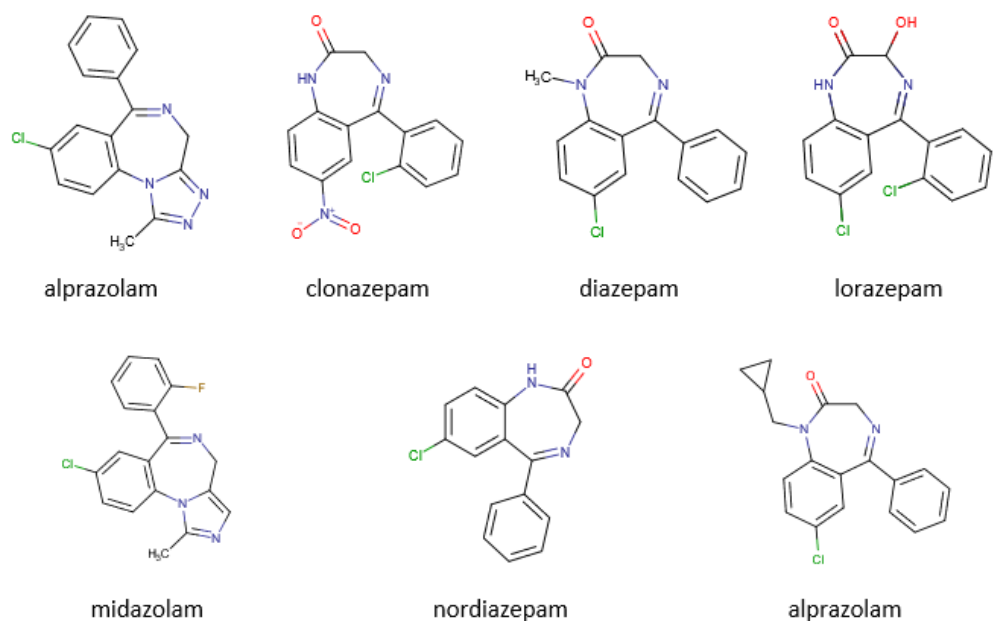


Fig. 2. Estructura de las benzodiazepinas incluidas en el método desarrollado [22].

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Reactivos y materiales

Todos los reactivos fueron grado analítico o superior y se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania), a menos que se especifique lo contrario. Los estándares de BZD fueron proporcionados amablemente por el Servicio Médico Legal (SML) de Concepción, Chile. Para su análisis, se prepararon diluciones de concentración 10 mg/mL de cada uno en acetato de etilo, para evaluar el tiempo

de retención ( $t_R$ ) y iones característicos de los analitos. Se utilizó prazepam (500 ng/mL) como estándar interno (IS), según la experiencia previa del SML [10].

## 2.2. Análisis por GC-MS/MS

El análisis se realizó en un instrumento GC Agilent 7890A (Agilent, Palo Alto, CA) acoplado a un detector MS triple cuadrupolo Agilent 7000, el cual fue controlado con el software de adquisición Agilent MassHunter GC/MS (Version B.05.00/Build 5.0.291.0). Todas las inyecciones se realizaron manualmente; el volumen de inyección fue de 5  $\mu$ L y se inyectó en modo de vaporización con temperatura programada (PTV) con venteo de solvente y un programa de temperatura con un inicio en 50 °C por 0.5 min y aumento a 700 °C/min hasta 300 °C. La separación se realizó en una columna de (5%-fenil)-metilpolisiloxano HP-5MS (30m x 0.25mm, 0.25 $\mu$ m) y el programa de temperatura del horno utilizado consistió en una temperatura inicial de 50 °C durante 0.5 minutos, la cual aumentó a 20 °C por minuto hasta llegar a los 300 °C en un tiempo total de corrida cromatográfica de 25 minutos. Como gas de arrastre se utilizó helio a un flujo de 1 mL/min y se estableció un tiempo de *solvent-delay* de 4.5 minutos. El espectrómetro de masas se operó en modo ionización por impacto electrónico (EI, 70 eV) y el rango de masas para el *scan* fue de entre 50 y 450 uma.

Luego de haber realizado la determinación de los iones más característicos en modo *full-scan*, se seleccionaron tres para cada analito para usarlos como iones

precursores en un estudio de iones producto. En este estudio se inyectaron 5  $\mu\text{L}$  de la mezcla de estándares derivatizada y se utilizaron dos valores de energía de colisión (5 y 15 V) con el objetivo de seleccionar la que nos permita obtener mayor abundancia de fragmentos para crear un método MRM, el cual nos permite conocer transiciones específicas de fragmentación para cada compuesto estudiado, aumentando la selectividad y sensibilidad de los análisis y disminuyendo el efecto de interferencias de la matriz sobre la detección.

### 2.3. Evaluación del proceso de derivatización

Para el estudio de la derivatización por sililación de los analitos utilizando BSTFA (10% TCMS), primero se evaporó a sequedad una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de una mezcla de los estándares de BZD de concentración 10 mg/L bajo flujo de nitrógeno. Posteriormente, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de tolueno, el que se evaporó para luego añadir 50  $\mu\text{L}$  del agente derivatizante. Luego de cerrar el vial de reacción con una tapa rosca con septa, éste se llevó a la estufa a 90 °C por 30 minutos y se dejó enfriar en desecador antes de inyectarse en el instrumento.

### 2.4. Preparación de las muestras de sangre postmortem

Se decidió trabajar con sangre total, debido a que es la muestra más comúnmente utilizada y con mayor disponibilidad para realizar los análisis. La sangre utilizada se obtuvo de voluntarios no usuarios de benzodiazepinas. Se probaron dos metodologías para la extracción de la muestra. La primera fue la

metodología actualmente utilizada en el SML que consiste en SPE utilizando columnas pre-empacadas con fase mixta C8/SCX. La segunda fue una extracción utilizando la metodología QuEChERS modificada con ajuste de pH. Ambos procedimientos se realizaron por triplicado. Extracción en fase sólida

Para el estudio de la preparación de la muestra de sangre total primero se siguió el procedimiento utilizado en el SML, con algunas modificaciones. Para ello, se prepararon muestras de 2 mL de sangre añadida a una concentración de 0,5 mg/L de cada BZD por triplicado en tubos de centrífuga de plástico de 15 mL. A cada tubo se agregó 6 mL de acetonitrilo al 10% en buffer fosfato 0,1 M (pH 6), se agitó en vórtex durante 30 segundos, se llevó a baño de ultrasonido por 30 minutos y se centrifugó a 4200 rpm durante 20 minutos.

Previo a la extracción, la columna de SPE se acondicionó con 4 mL de metanol, posteriormente se agregó 4 mL de agua ultrapura y luego 2 mL de buffer fosfato 0,1 M de pH 6,0, siempre preocupándose de no secar la columna. Se tomaron 6 mL del sobrenadante obtenido del proceso de pretratamiento de la muestra de sangre y se cargaron en la columna de extracción. Para el lavado se utilizó primero 4 mL de agua ultrapura y luego 4 mL de acetonitrilo al 10% en buffer fosfato, para luego dejar secar al vacío (3 mmHg) por 10 minutos. A la columna seca se agregó 4 mL de hexano y se secó al vacío nuevamente por 1 minuto. Finalmente, se eluyeron los analitos con 4,5 mL de acetato de etilo 2 veces, obteniéndose 9 mL de eluato, el cual se llevó a sequedad bajo flujo de nitrógeno

para finalmente reconstituirse en 100  $\mu$ L de acetato de etilo. Finalmente, se tomó una alícuota de 50  $\mu$ L de la muestra resultante y se derivatizó como se explicó anteriormente, para luego inyectarse en el GC-MS/MS utilizando el método MRM. Extracción por método QuEChERS

Para la extracción mediante QuEChERS se siguió el procedimiento descrito en Anzillotti *et al.* [19], con algunas modificaciones. En primer lugar, se preparó una muestra sintética de concentración 1 mg/L de cada analito utilizando 1 mL de sangre. A la muestra se agregó 100  $\mu$ L de un buffer carbonato concentrado (1 M) para llegar a un pH 8, aproximadamente. Luego, se trasladó la muestra a un tubo de QuEChERS de 15 mL para realizar un *clean-up* con 150 mg de PSA y 900 mg  $MgSO_4$ , se agitó durante 10 minutos y se llevó a centrifuga durante 8 minutos a 4000 rpm. Una alícuota de 2,5 mL del sobrenadante obtenido se traspasó a otro tubo y se llevó a sequedad, para luego resuspenderse en 100  $\mu$ L de etilacetato. Finalmente, se tomó una alícuota de 50  $\mu$ L de la muestra resultante y se derivatizó como se explicó anteriormente, para luego inyectarse en el GC-MS/MS utilizando el método MRM.

## 2.5. Validación preliminar de la metodología analítica

Se preparó una curva de calibrado para los estándares en el solvente etilacetato y se realizó su derivatización, para tener una idea de la linealidad y los LOD y LOQ del método. La curva se preparó considerando las concentraciones

plasmáticas que se encuentran comúnmente en este tipo de muestras y la capacidad de las metodologías de extracción para preconcentrar los analitos. Así, se llegó a las concentraciones que se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: Concentración de los analitos para preparación de la curva de calibración.

Analito	Nivel 1 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Nivel 2 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Nivel 3 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Nivel 4 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Nivel 5 ( $\mu\text{g/mL}$ )
Alprazolam	1	3	5	8	10
Clonazepam	0.3	0.9	1.5	2.4	3
Diazepam	1	3	5	8	10
Lorazepam	1	3	5	8	10
Midazolam	0.5	1.5	2.5	4	5
Nordiazepam	1	3	5	8	10
Prazepam	10	10	10	10	10

Se realizó una aproximación a la evaluación de la exactitud y precisión al nivel de concentración más alto de la curva de calibrado mediante el cálculo de la eficiencia del proceso (%PE) para ambos métodos. Se prepararon muestras añadidas de sangre *postmortem* con todos lo analitos considerando los factores de preconcentración de ambas técnicas de preparación de muestra. Para SPE el factor de concentración fue de 20 veces, mientras que para QuEChERS fue 10,

por lo que las muestras se prepararon a 0,5 y 1 µg/mL para cada método, respectivamente.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Separación cromatográfica y derivatización

En primer lugar, se determinaron los tiempos de retención de cada analito y se seleccionó un ion característico de cada uno para obtener el cromatograma de iones extraídos (EIC). Al observar el segmento de cromatograma presentado en la Figura 5, es posible notar una menor sensibilidad para clonazepam y lorazepam, probablemente debido a su mayor polaridad, constituyendo un problema para el análisis de muestras a bajas concentraciones.

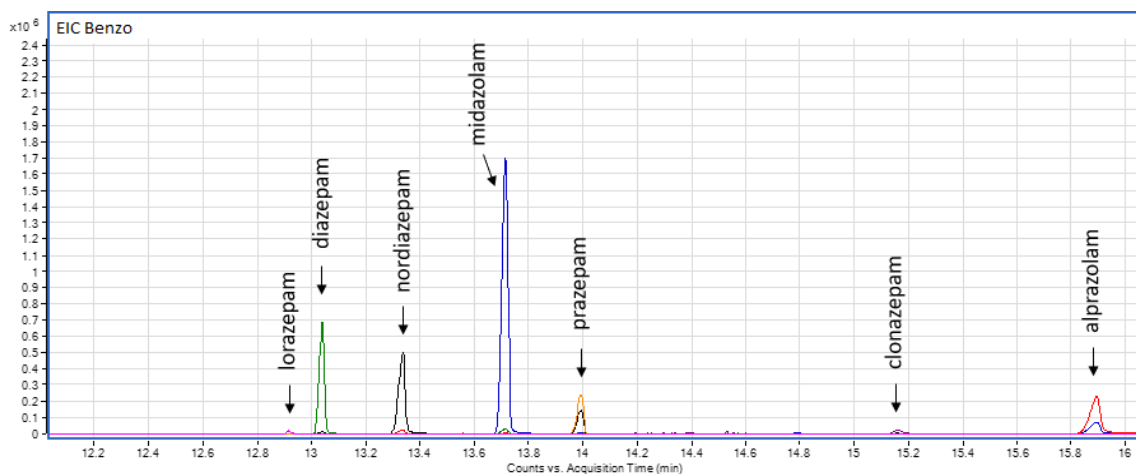


Fig. 5. Cromatograma EIC obtenido para la mezcla de estándares de los analitos a 10 µg/mL.



La presencia de hidrógenos activos en moléculas más polares les entrega un mayor punto de ebullición, por lo que el reemplazo de estos grupos con un agente derivatizante permite mejorar la volatilidad de estos compuestos y, en muchos casos, esto se traduce en un aumento de la sensibilidad cromatográfica [ref]. Debido a esto, se planteó la posibilidad de derivatizar los analitos por medio de una reacción de sililación utilizando BSTFA (10% TMCS), como se ha descrito en la literatura [3]. Debido a que esta reacción ocurre en los hidrógenos activos de la molécula, los analitos derivatizados corresponden a nordiazepam, clonazepam y lorazepam, éste último en dos sitios.

Tabla 3. Tiempo de retención para los analitos antes y después del proceso de derivatización.

Analito	$t_R$ antes de derivatización (min)	$t_R$ después de derivatización (min)
Lorazepam	12,912	13,115 <sup>a</sup>
Diazepam	13,038	13,045
Nordiazepam	13,331	12,258 <sup>b</sup>
Midazolam	13,710	13,724
Prazepam	13,988	14,013
Clonazepam	15,155	13,976 <sup>b</sup>
Alprazolam	15,890	15,922

<sup>a</sup>Tiempo de retención para derivado 2-TMS. <sup>b</sup>Tiempo de retención para derivado TMS.

En la Tabla 3 se observan los tiempos de retención para los analitos antes y después de la derivatización. Como se puede ver, los restantes analitos no presentan diferencia significativa de los  $t_R$ .

Luego de realizar la derivatización, fue posible observar un aumento en la intensidad de la señal para los derivados TMS de nordiazepam, lorazepam y clonazepam, sin un aumento considerable del ruido, lo que implica un aumento en la sensibilidad del análisis. Las señales de prazepam y clonazepam se solapan, como se observa en la Figura 6, sin embargo, es posible identificar cada una de ellas por sus espectros de masas.

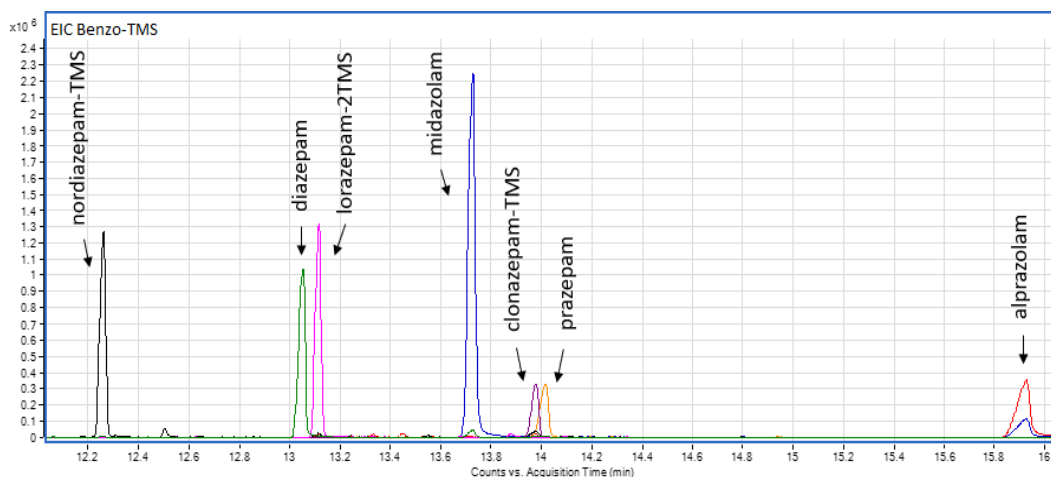


Fig. 6. Cromatograma EIC obtenido para la mezcla de estándares de los analitos luego de la derivatización con BSTFA (10% TMCS) analizadas a 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Se calculó la relación señal/ruido (SNR) para los *peak* de los iones mayoritarios y más característicos para cada compuesto, además se calculó la eficiencia de cada *peak* como número de platos teóricos (N). Los resultados se presentan en la Tabla 4, donde se puede observar un aumento considerable de SNR y la eficiencia cromatográfica para los analitos luego de la derivatización.

Tabla 4. Estimación de la relación señal/ruido y la eficiencia de las señales antes y después del proceso de derivatización a partir del cromatograma EIC.

Analito	Ion mayoritario (m/z)	SNR	Eficiencia (N)
Lorazepam	303	14.6	96288
Lorazepam-2TMS	429	316.5	156765
Clonazepam	314	5.4	46791
Clonazepam-TMS	387	100.3	125228

Para determinar la reproducibilidad del proceso de derivatización se realizó el procedimiento por triplicado para una solución de 10 µg/mL de todos los analitos y se calculó el %RSD para cada uno. Debido a que se realizó inyección manual, los valores obtenidos para los analitos se corrigieron con prazepam 10 µg/mL como patrón interno. Se consideró como aceptable un valor máximo de RSD de 15%, que corresponde al mínimo valor de precisión aceptable para la validación

de métodos bioanalíticos según distintas guías internacionales [23]. Esto, considerando también la posibilidad de optimizar el proceso de derivatización más adelante para mejorar la reproducibilidad. Todos los analitos derivatizados cumplieron con este requisito.

### 3.2. Desarrollo del método de detección en modo MRM

Para la construcción del método cuantitativo mediante MRM, en la mayoría de los casos se seleccionaron los iones precursores como los fragmentos con mayor abundancia para cada analito. En ocasiones se prefirieron fragmentos de menor abundancia pero que entregaran mayor selectividad para la detección. Los fragmentos seleccionados para cada analito se observan en la Figura 7.

Con los fragmentos seleccionados se realizó un estudio de iones producto con energías de colisión de 5 y 15 V. Para aumentar la sensibilidad, la adquisición del MS se dividió en cinco ventanas de adquisición con diferentes tiempos de permanencia (*dwel time*) dependiendo del número de iones monitoreados, para acercarse a un valor de 15 puntos de adquisición por *peak* cromatográfico. A partir de este análisis se seleccionaron las transiciones a utilizar para el método MRM, resultados que se pueden observar en la Tabla 5, en negrita se encuentran las transiciones cuantitativas, elegidas según abundancia relativa y selectividad de la transición.

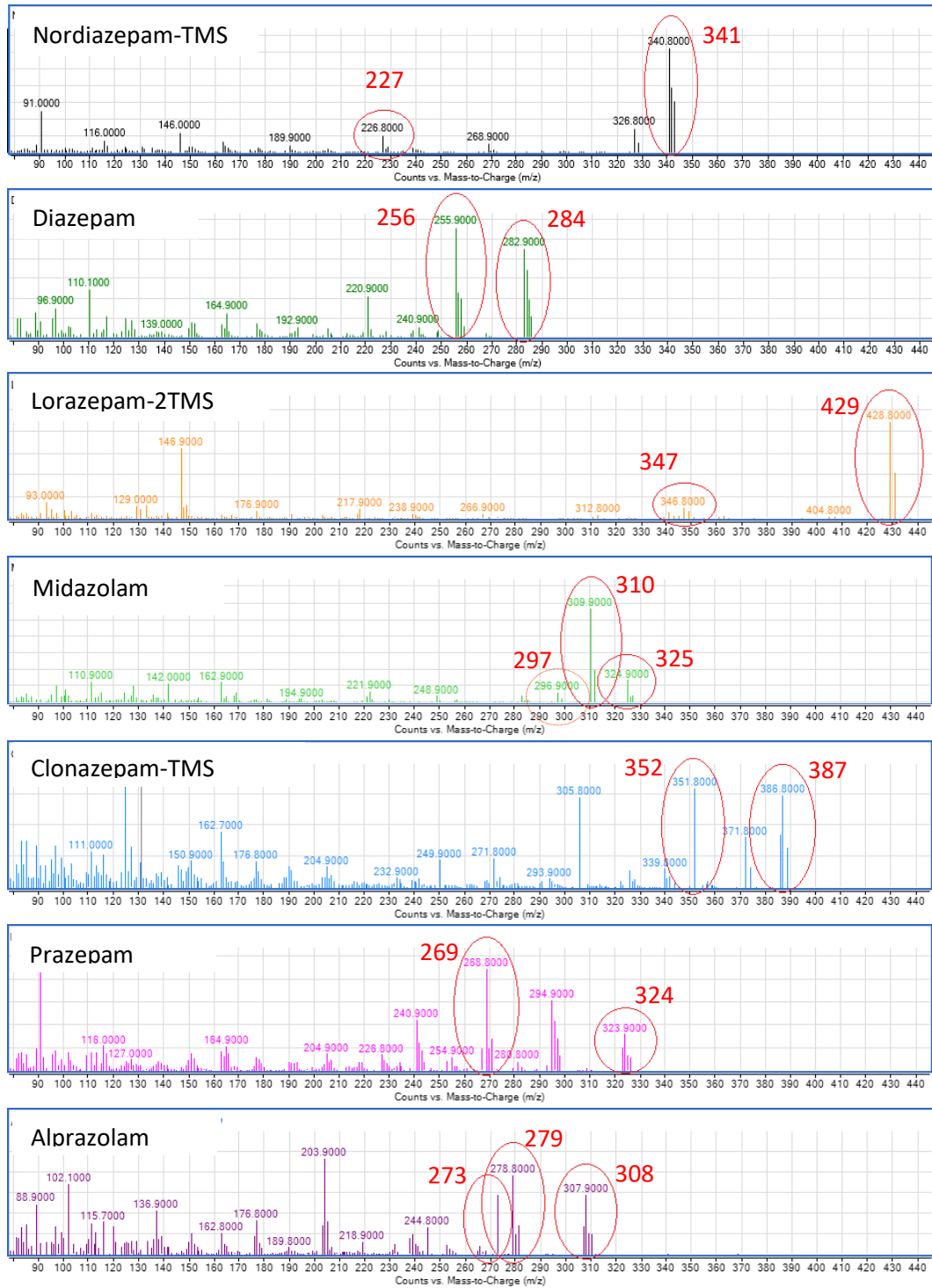


Fig. 7. Espectros de masas de benzodiazepinas y sus iones precursoros.

Tabla 5. Resultados obtenidos por el método MRM para la mezcla de estándares.

Analito	tr (min)	Transiciones	Abundancia relativa	EC (V)
Nordiazepam-TMS	12,56	<b>342</b> → <b>227</b>	100	15
		342 → 269	47,19 ± 0,20	15
		227 → 192	18,34 ± 0,08	15
Diazepam	13,04	<b>256</b> → <b>221</b>	100	15
		284 → 256	30,68 ± 0,18	15
		256 → 228	11,49 ± 0,05	5
Lorazepam-2TMS	13,11	<b>429</b> → <b>341</b>	100	15
		429 → 73	73,37 ± 1,12	15
		429 → 267	26,64 ± 0,38	5
Midazolam	13,71	<b>325</b> → <b>310</b>	100	15
		310 → 257	25,07 ± 0,07	15
		310 → 290	20,84 ± 0,16	15
Clonazepam-TMS	13,96	387 → 73	100	15
		<b>387</b> → <b>272</b>	65,97 ± 0,32	15
		352 → 306	34,50 ± 0,30	15
Prazepam	14,00	<b>269</b> → <b>241</b>	100	15
		324 → 269	70,13 ± 0,33	15
		324 → 241	56,73 ± 0,35	5
Alprazolam	15,89	<b>308</b> → <b>279</b>	100	15
		273 → 245	99,66 ± 0,33	5
		308 → 273	32,95 ± 0,37	15

En la Figura 8 se puede observar el cromatograma obtenido con el método MRM para la mezcla de estándares a una concentración de 10 µg/mL de cada analito. Se calculó la resolución y el factor de separación ( $\alpha$ ) entre clonazepam-TMS y prazepam, que es el par más complejo de separar. Los resultados fueron 0,735

y 1,002, respectivamente, los que son valores bajos en comparación con el ideal que sería 1,5 para resolución y entre 1,1 y 1,5 para  $\alpha$ , sin embargo, esto no representa un problema, dada la alta selectividad del detector de MS.

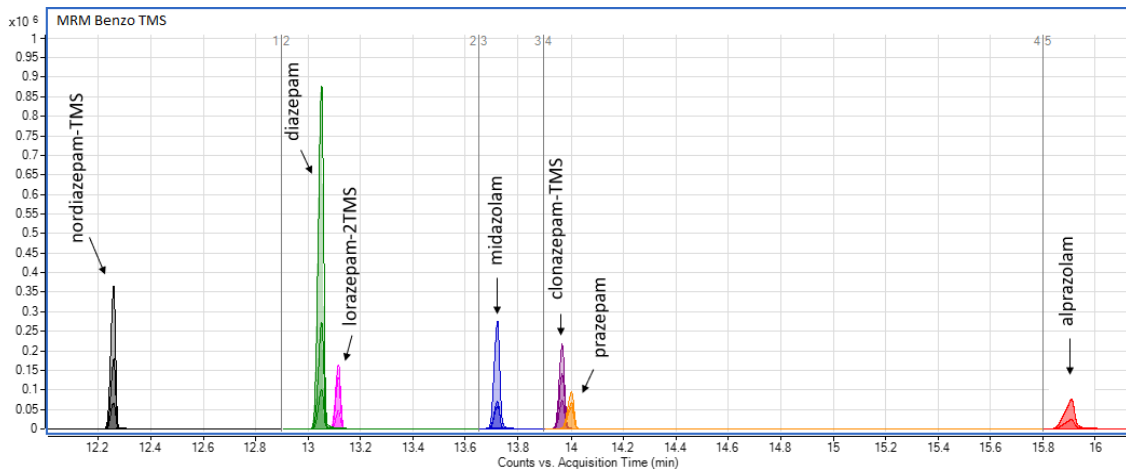


Fig. 8. Cromatograma MRM de benzodiazepinas luego de la derivatización con BSTFA (10% TMCS) analizadas a 10 µg/mL.

### 3.3. Preparación y extracción de muestras de sangre

En las Figuras 9 y 10 se pueden comparar los cromatogramas correspondientes a las extracciones basadas en SPE y en QuEChERS, respectivamente. Se puede notar que la señal de diazepam es muy ancha y presenta más de un máximo, descartándose que sea degradación del analito, ya que las abundancias relativas para las transiciones se mantienen constantes, por lo que toda la señal corresponde a diazepam sin que haya sufrido cambios que afecten su patrón de

fragmentación. El problema podría deberse a una saturación del detector al ser un analito que genera una respuesta de gran intensidad y se inyecta en una concentración bastante alta (10  $\mu\text{g/mL}$ ), sin embargo, esto no sucede al inyectar el estándar libre de matriz a la misma concentración. Debido a que las benzodiazepinas se presentan como diferentes especies dependiendo el pH del medio, podría ser que durante la extracción se hayan obtenido ambas especies de diazepam, sin embargo, para obtener diazepam asociado a un protón sería necesario un pH menor a 3 según su pKa [9], el que no se utiliza durante ninguna de las extracciones. Es necesario realizar más estudios con respecto al efecto de la matriz y los métodos de preparación de muestras sobre la detección de este analito.

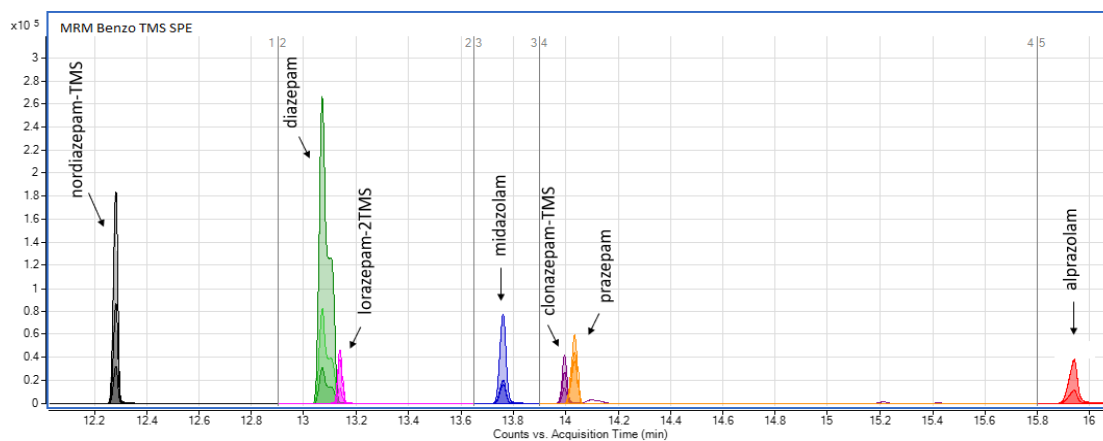


Fig. 9. Cromatograma MRM de benzodiazepinas luego de extracción por SPE y derivatización.



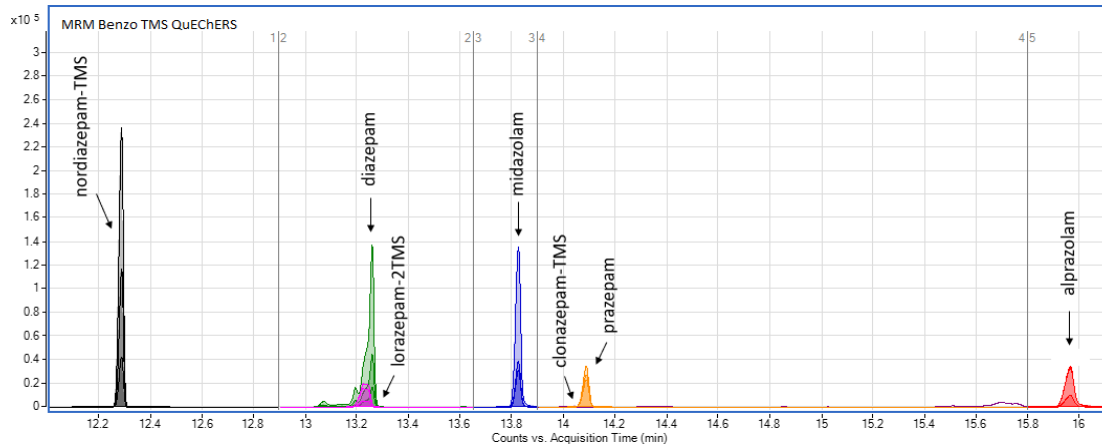


Fig. 10. Cromatograma MRM de benzodiazepinas luego de extracción por QuEChERS y derivatización.

En ambos casos, se evaluó la eficiencia del proceso de extracción y la repetibilidad del método. Estos resultados se discuten en la siguiente sección para la validación de la metodología.

### 3.4. Validación preliminar de la metodología analítica

Para realizar una validación preliminar del método, se preparó una curva de calibrado para todos los analitos a 5 niveles de concentración en solvente, utilizando prazepam a 10  $\mu\text{g/mL}$  como estándar interno para la corrección del AUC de los analitos. Las gráficas obtenidas para cada curva se pueden observar en la Figura 11.

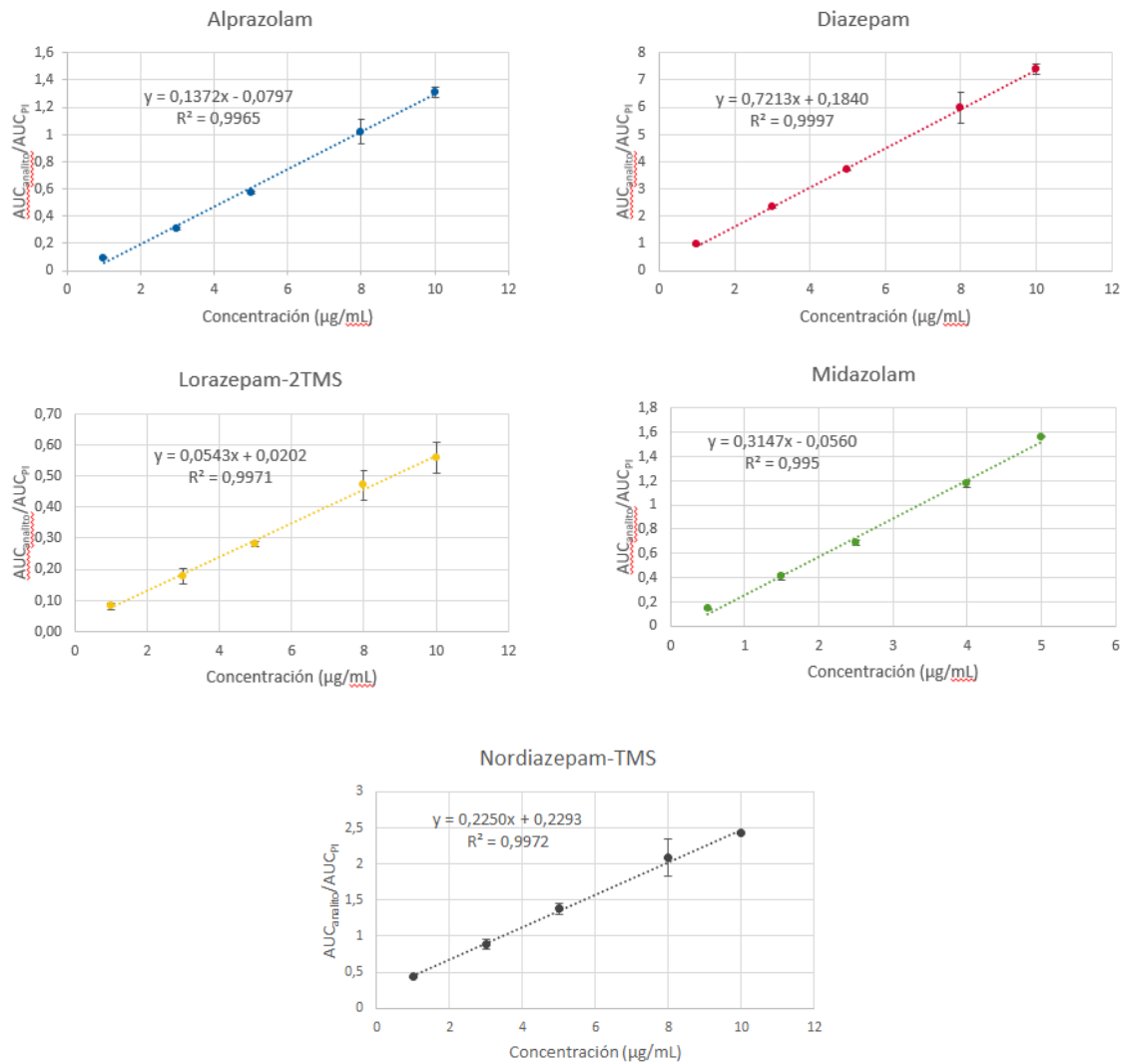


Fig. 11. Gráficas obtenidas para las curvas de calibrado de benzodiazepinas.

A partir de estas curvas fue posible evaluar la linealidad y determinar la sensibilidad del método, la cual se relaciona con la pendiente del análisis, LOD y LOQ, los que fueron calculados a partir de la SNR obtenida. No fue posible establecer la linealidad para clonazepam, ya que el método no alcanzó la

sensibilidad suficiente para determinarlo en los valores de concentración adecuados. En todos los otros casos se observa linealidad con un coeficiente de correlación  $R^2$  mayor que 0,99. En la Tabla 6 se pueden observar los resultados principales obtenidos para la calibración.

Tabla 6. Resultados para regresión lineal de los analitos y derivados TMS.

Analito	m	n	R2	LOD* ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ* ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rango ( $\mu\text{g/mL}$ )
Alprazolam	0,1372	-0,0797	0,9965	0,01	0,03	1,0 – 10,0
Diazepam	0,7213	0,1840	0,9997	0,02	0,05	1,0 – 10,0
Lorazepam-2TMS	0,0543	0,0202	0,9971	0,03	0,10	1,0 – 10,0
Midazolam	0,3147	-0,0560	0,9950	0,01	0,03	0,5 – 5,0
Nordiazepam-TMS	0,2250	0,2293	0,9972	0,04	0,12	1,0 – 10,0

m: pendiente; n: intercepto; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación.

\*LOD y LOQ calculados utilizando SNR de cromatogramas y sin considerar factores de preconcentración de los métodos de extracción.

LOD y LOQ se calcularon para la curva en solvente. Considerando que la extracción por SPE tiene un factor de preconcentración de 20 y la extracción por QuEChERS de 10, el método debería permitir el análisis de todas las benzodiazepinas a concentraciones terapéuticas y tóxicas. Sin embargo, sería necesario hacer un estudio del efecto de la matriz sobre la detección de los

analitos y tener en cuenta la exactitud del método antes de considerar el uso de la curva en solvente para la cuantificación en sangre. Se considera que lo más correcto sería una curva en matriz para poder hacer una validación más exhaustiva del método.

Como aproximación de la medida de la exactitud de los métodos se evaluó %PE para el análisis de los extractos obtenidos por SPE y por QuEChERS, cada uno a un nivel de concentración y por triplicado. En todos los casos la señal de los analitos fue corregida por la del patrón interno. Para la confirmación de la identidad se comprobó que las abundancias relativas de las transiciones MRM se mantuviesen constantes para todos los analitos, con diferencias menores al 6% con respecto a la mezcla de estándares. La reproducibilidad se evaluó calculando %RSD.

Según recomendaciones de guías internacionales, lo más adecuado para establecer la exactitud del método sería calcular la recuperación y el error relativos (%RR y %RE). Para ello sería necesario preparar muestras añadidas sobre matriz después de la extracción y comparar su señal con la obtenida para las muestras añadidas antes de la extracción [23]. De esta manera el efecto de la matriz se encuentra presente en ambos casos y la recuperación calculada sólo depende del proceso analítico. Sin embargo, durante el desarrollo de este trabajo no se prepararon muestras añadidas en matriz después de la extracción, por lo que para estimar y comparar la exactitud del método se calculó la recuperación

absoluta, también llamada eficiencia del proceso (%PE), para ambos casos, considerando las muestras añadidas previo al proceso de extracción y su cuantificación mediante la curva de calibración en solvente. Por lo tanto, se debe considerar que la exactitud evaluada mediante %PE considera tanto los errores derivados de la metodología analítica como del efecto matriz. De hecho, por definición %PE corresponde al producto entre la recuperación y el efecto matriz [23]. En la Tabla 7 es posible observar los resultados obtenidos para ambos procedimientos de extracción.

Tabla 7. Resultados Datos de eficiencia del proceso para ambos métodos evaluados.

Analito	SPE		QuEChERS	
	%PE	%RSD	%PE	%RSD
Alprazolam	94,5 ± 5.7	6,0	93,1 ± 20,4	21,9
Diazepam	125,7 ± 5.3	4,2	63,8 ± 10,0	15,6
Lorazepam-2TMS	147,2 ± 14.2	9,6	184,7 ± 44,2	23,9
Midazolam	57,0 ± 4.1	7,2	96,3 ± 17,7	18,4
Nordiazepam-TMS	136,6 ± 14,7	10,8	173,7 ± 45,6	26,3
Clonazepam-TMS*	43,4 ± 2,5	5,8	1,3 ± 0,5	41,5

\* %PE y %RSD calculados sin curva de calibrado para clonazepam.

Se puede observar que para SPE, excepto en el caso de midazolam y clonazepam, los valores de %PE son bastante elevados, sobre todo para los derivados de lorazepam y nordiazepam donde alcanza valores mayores que 100%, lo que también ocurre en QuEChERS. Debido a que en este parámetro están considerados tanto la recuperación como el efecto matriz, esto podría deberse a que algunos componentes de ésta potencian la ionización de algunos analitos, sin embargo, esto es poco probable debido a la alta energía de la fuente de ionización en GC-MS. Otra explicación puede deberse a que todos los resultados de AUC han sido corregidos por patrón interno, el cual fue añadido previo al proceso de extracción, por lo cual puede sufrir de baja recuperación. Para evaluar esta posibilidad, se calculó la eficiencia del proceso sin considerar corrección por patrón interno para la curva de calibrado ni las muestras. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 8.

A partir de estos datos es posible comparar ambas técnicas de extracción sin considerar las diferencias para la recuperación del estándar interno en cada una. En primer lugar, se puede notar que la reproducibilidad para la extracción mediante SPE es mucho mejor que para QuEChERS en la mayoría de los casos, con o sin corrección por patrón interno. Por lo tanto, aunque la eficiencia del proceso parezca comparable en el caso de algunos analitos como nordiazepam-TMS, se debe tener en cuenta que la reproducibilidad del método debiese ser mayor al 15% en términos de %RSD, por lo que el método QuEChERS no cumple

con este parámetro cuando se corrige con patrón interno y cuando éste no se utiliza, sólo se cumple para diazepam y lorazepam-2TMS, pero con menor eficiencia que para SPE. También es posible notar una nula extracción de clonazepam al utilizar QuEChERS como método de preparación de muestra, lo que hace aún más recomendable el uso de SPE, donde tiene baja recuperación absoluta, pero buena reproducibilidad.

Tabla 3-8. Datos de eficiencia del proceso para ambos métodos evaluados.

Analito	SPE		QuEChERS	
	%PE	%RSD	%PE	%RSD
Alprazolam	33,2 ± 2,0	6,2	24,6 ± 6,1	24,7
Diazepam	38,6 ± 2,0	5,2	10,5 ± 0,7	6,6
Lorazepam-2TMS	45,3 ± 5,0	11,0	38,8 ± 4,0	10,2
Midazolam	18,2 ± 1,4	7,7	22,6 ± 6,6	29,2
Nordiazepam-TMS	35,3 ± 4,8	13,6	30,5 ± 11,2	36,7

En el caso de la extracción por SPE, si bien los valores de recuperación no son muy altos, la reproducibilidad del método se considera adecuada para todos los analitos por lo que el método sería adecuado para la cuantificación de

benzodiazepinas en sangre *postmortem*, excepto en el caso de clonazepam para el cual no fue posible establecer linealidad por baja sensibilidad. Como %RSD es similar para la recuperación con y sin patrón interno, se puede comprobar que la extracción de prazepam es reproducible, por lo que se considera apropiado su uso como patrón interno, sobre todo en inyección manual. Es importante considerar que las metodologías de extracción no han sido optimizadas, por lo que estos resultados podrían mejorar al cambiar algunas condiciones, además, es necesario incluir la evaluación de al menos dos niveles más de concentración y el uso de una curva de calibración realizada en matriz para la correcta cuantificación de los compuestos.

La baja recuperación absoluta de los analitos, observada en la Tabla 7, puede deberse a que el tratamiento de la muestra de sangre antes de realizarse la extracción en fase sólida incluye el uso del solvente orgánico acetonitrilo para precipitación de proteínas. Podría ser que parte de los analitos se pierdan por elución al cargarse la columna con la muestra tratada sin eliminación del solvente. Por otro lado, se utilizó un sorbente de fase mixta C8 e intercambio catiónico, sin embargo, al pH utilizado los analitos se encuentran mayormente en su forma no ionizada, por lo que quizás se podría utilizar otra fase estacionaria sin resina de intercambio catiónico, como una C18.

Otra estrategia que podría resultar útil es la utilizada por Karlunas *et al.*, quienes acidificaron las muestras hasta pH 1 para que los analitos se encontraran



cargados positivamente, para luego realizar la extracción en columnas MCX (C18 con intercambio catiónico fuerte) [26]. Una desventaja de la extracción en fase sólida al trabajar con sangre total es que la columna tiende a taparse, lo que podría generar problemas importantes en la recuperación y reproducibilidad de los analitos, además, al ser la sangre una matriz tan compleja, es posible que algunos interferentes disminuyan la capacidad de adsorción de los analitos a la fase estacionaria de la columna. Una ventaja importante de este procedimiento es que permite preconcentrar 20 veces los analitos en la muestra, en este caso llegando de una concentración en sangre de 0,5 µg/mL hasta 10 µg/mL antes de su cuantificación.

En el caso de QuEChERS, también es necesario optimizar la metodología utilizada. Generalmente se realizan dos pasos (extracción y purificación), para los cuales es posible modificar el pH con diferentes buffer, usar otros solventes orgánicos y agregar otras resinas en la etapa de purificación, como C18 o carbón activado. En este trabajo se utilizó un método publicado por Anzillotti *et al.* en sólo un paso para la extracción y purificación a pH 8 utilizando sulfato de magnesio y PSA, con etilacetato como solvente orgánico [19]. Se escogió este método porque es rápido, y sencillo y debido a que todas las benzodiazepinas se encontrarían en su forma no ionizada, lo que permitiría una mejor extracción. Ya que existe una gran cantidad de formas de llevar a cabo una extracción por QuEChERS, sería ideal poder evaluar más de una, modificando algunas

condiciones para mejorar la recuperación. Por ejemplo, Poncelet *et al.* [27] el 2016 publicaron una metodología QuEChERS para la extracción de BZD en la cual se utilizan sólo 100 µL de matriz y acetonitrilo como solvente, para la extracción se utiliza un buffer citrato, cloruro de sodio y sulfato de magnesio y sin etapa de purificación. Una ventaja del método QuEChERS evaluado es que permite concentrar los analitos en la muestra 10 veces, es decir, se llegó a 10 µg/mL a partir de una muestra añadida a una concentración de 1 µg/mL.

Se considera que, junto con optimizar las metodologías de extracción evaluadas en este trabajo, se podrían probar otros métodos como, por ejemplo, extracción líquido-líquido, para la cual se han descrito buenos resultados de recuperación [1, 17], aunque no cuenta con la ventaja de preconcentrar los analitos en la misma medida que SPE o QuEChERS. También, con el objetivo de reducir el volumen de solventes y de muestra necesarios, podrían considerarse técnicas de microextracción como microextracción por sorbente empacado (MEPS) u otras basadas en microextracción en fase sólida (SPME) [2].

Es importante tener en consideración que las concentraciones de los analitos en sangre que fueron analizadas son, para algunos analitos, bastante mayores que lo que sería posible encontrar en una muestra real. El uso de estas concentraciones fue para poder desarrollar y evaluar el método y los patrones de fragmentación de los analitos sin problemas de sensibilidad, realizando una determinación adecuada de las benzodiazepinas, la cual debiese ser optimizada.

Para una validación completa y efectiva de la metodología sería necesario evaluar los parámetros de exactitud, precisión y sensibilidad en matriz y al menos a 3 niveles de concentración, considerando la totalidad del rango lineal, además de la evaluación del efecto matriz.

#### **4. Conclusiones**

El proceso de derivatización permitió el aumento de la sensibilidad del análisis para los analitos susceptibles, principalmente para clonazepam y lorazepam, sin embargo, es necesario optimizar las condiciones de derivatización para alcanzar una mayor reproducibilidad.

El método GC-MS/MS desarrollado permite la identificación altamente selectiva y sensible de las benzodiazepinas nordiazepam, diazepam, lorazepam, midazolam y alprazolam. Sin embargo, aunque fue posible aumentar la sensibilidad de la detección de clonazepam, esta no fue suficiente para lograr su análisis cuantitativo en las condiciones establecidas. Si se desea acoplar el método cromatográfico a otros detectores como NPD o  $\mu$ ECD, es necesario optimizar la separación para lograr una adecuada resolución entre las señales de prazepam y clonazepam.

La extracción por SPE alcanzó una mayor recuperación y reproducibilidad para todos los analitos, en comparación al método QuEChERS evaluado. Sin embargo, es necesaria una mayor optimización de ambas metodologías o la evaluación de otras estrategias que permitan obtener mejores resultados para el análisis cuantitativo de benzodiazepinas. Para una validación más exhaustiva del método, es necesario realizar la evaluación del efecto matriz y de su exactitud, precisión y sensibilidad en todo el rango de trabajo.

## Referencias

- [1] M. Degreef, L. Vits, E.M. Berry, K.E.K. Maudens, A.L.N. van Nuijs, Quantification of 54 Benzodiazepines and Z-Drugs, Including 20 Designer Ones, in Plasma, *J. Anal. Toxicol.* 45 (2021) 141–153. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa059>.
- [2] K. Persona, K. Madej, P. Knihnicki, W. Piekoszewski, Analytical methodologies for the determination of benzodiazepines in biological samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 239–264. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.017>.
- [3] R. Mancini, L. Fernandez-Lopez, M. Falcon, M. Pellegrini, A. Luna, M. Rotolo, Postmortem Analysis of Benzodiazepines in Human Bone by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 44 (2020) 985–992. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa020>.
- [4] A.V. de Bairros, R.M. de Almeida, L. Pantaleão, T. Barcellos, S.M. e. Silva, M. Yonamine, Determination of low levels of benzodiazepines and their metabolites in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction (LPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 975 (2015) 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.10.040>.
- [5] L. Vårdal, G. Wong, Å.M.L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, E.L. Øiestad, Rapid determination of designer benzodiazepines, benzodiazepines, and Z-hypnotics in whole blood using parallel artificial liquid membrane extraction and UHPLC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 4967–4978. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1147-y>.
- [6] D. Remane, D. Wetzel, F.T. Peters, Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for screening of urine specimens for 100 analytes relevant in drug-facilitated crime (DFC), *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 4411–4424. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7841-5>.
- [7] M. Piergiovanni, A. Cappiello, G. Famiglini, V. Termopoli, P. Palma, Determination of benzodiazepines in beverages using green extraction

- methods and capillary HPLC-UV detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 154 (2018) 492–500. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.030>.
- [8] G. Famigliani, F. Capriotti, P. Palma, V. Termopoli, A. Cappiello, The rapid measurement of benzodiazepines in a milk-based alcoholic beverage using QuEChERS extraction and GC-MS analysis, *J. Anal. Toxicol.* 39 (2015) 306–312. <https://doi.org/10.1093/jat/bkv014>.
- [9] I. Álvarez-Freire, P. Brunetti, P. Cabarcos-Fernández, A. Fernández-Liste, M.J. Tabernero-Duque, A.M. Bermejo-Barrera, Determination of benzodiazepines in pericardial fluid by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 159 (2018) 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.06.039>.
- [10] F. Bravo, C. Lobos, K. Venegas, J. Benites, DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A GC-NPD/micro-ECD METHOD USING DUAL COLUMN FOR THE DETERMINATION OF BENZODIAZEPINE IN HUMAN WHOLE BLOOD AND PLASMA, 2010.
- [11] E.R. Perez, J.A. Knapp, C.K. Horn, S.L. Stillman, J.E. Evans, D.P. Arfsten, Comparison of LC-MS-MS and GC-MS analysis of benzodiazepine compounds included in the drug demand reduction urinalysis program, *J. Anal. Toxicol.* 40 (2016) 201–207. <https://doi.org/10.1093/jat/bkv140>.
- [12] F. Plössl, M. Giera, F. Bracher, Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood, *J. Chromatogr. A.* 1135 (2006) 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.033>.
- [13] M.A. Farajzadeh, N. Nouri, P. Khorram, Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 55 (2014) 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.11.006>.
- [14] N. Karlonas, A. Padarauskas, A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene, Mixed-mode SPE for a multi-residue analysis of benzodiazepines in

- whole blood using rapid GC with negative-ion chemical ionization MS, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 1437–1445. <https://doi.org/10.1002/jssc.201201069>.
- [15] D. Borrey, E. Meyer, W. Lambert, S. Van Calenbergh, C. Van Peteghem, A.P. De Leenheer, Sensitive gas chromatographic-mass spectrometric screening of acetylated benzodiazepines, *J. Chromatogr. A.* 910 (2001) 105–118. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01177-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01177-8).
- [16] M.N. Uddin, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, Bio-sample preparation and gas chromatographic determination of benzodiazepines-a review, *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 587–598. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms263>.
- [17] I.I. Papoutsis, S.A. Athanaselis, P.D. Nikolaou, C.M. Pistos, C.A. Spiliopoulou, C.P. Maravelias, Development and validation of an EI-GC-MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood: Applications in clinical and forensic toxicology, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (2010) 609–614. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.01.027>.
- [18] K. Usui, M. Hashiyada, Y. Hayashizaki, Y. Igari, T. Hosoya, J. Sakai, M. Funayama, Application of modified QuEChERS method to liver samples for forensic toxicological analysis, *Forensic Toxicol.* 32 (2014) 139–147. <https://doi.org/10.1007/s11419-013-0199-0>.
- [19] L. Anzillotti, S. Odoardi, S. Strano-Rossi, Cleaning up blood samples using a modified “QuEChERS” procedure for the determination of drugs of abuse and benzodiazepines by UPLC-MSMS{star, open}, *Forensic Sci. Int.* 243 (2014) 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.05.005>.
- [20] K. Usui, Y. Hayashizaki, M. Hashiyada, M. Funayama, Rapid drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method, *Leg. Med.* 14 (2012) 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2012.04.008>.
- [21] M. Schulz, S. Iwersen-Bergmann, H. Andresen, A. Schmoldt, Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics, *Crit. Care.* 16 (2012).

- [22] ChemAxon. Chemicalize. Available at: <https://chemicalize.com/>. (Consultada en abril de 2018).
- [23] Canadian Institutes of Health Research, Alberta Innovates - Health Solutions & The Metabolomics Innovation Centre (TMIC). DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/>. (Consultada en abril de 2018)
- [24] Karlonas, N., Padarauskas, A., Ramanavicius, A. & Ramanaviciene, A. Mixed-mode SPE for a multi-residue analysis of benzodiazepines in whole blood using rapid GC with negative-ion chemical ionization MS. *J. Sep. Sci.* 36, 1437–1445 (2013).
- [25] Poncelet, L., El Bakhi, S., Dulaurent, S. & Saint-Marcoux, F. Les sels QuEChERS pour l'identification et la quantification de benzodiazépines et métabolites dans les prélèvements biologiques par LC–MS/MS. *Toxicol. Anal. Clin.* 28, 201–210 (2016).



