

Estudio comparativo de dos técnicas de cromatografía de líquidos para la determinación de anfetamina y derivados en sangre y orina: CLAR-fluorescencia vs. CL-EM

M. Concheiro, A. de Castro, Ó. Quintela, M. López-Rivadulla, A. Cruz

Servicio de Toxicología Forense. Instituto Universitario de Medicina Legal. Universidad de Santiago de Compostela.

c/ San Francisco s/n, 15782. Santiago de Compostela (La Coruña).

Tel.: 981582327; Fax: 981580336; e-mail: macongui@usc.es

Resumen

El consumo de psicoestimulantes, tales como la anfetamina y derivados (éxtasis), ha experimentado un aumento en España en los últimos años. Así, el número de incautaciones de “pastillas” ha aumentado un 62,35% entre 2001 (860.000) y 2002 (1.396.000), según datos del Observatorio Español sobre Drogas (OED), situándose la máxima prevalencia del consumo de éxtasis, entre los 20-24 años en varones (14,3%), y entre los 25-29 años (5,1%) en mujeres. Por este motivo, es muy útil disponer en un laboratorio de toxicología forense, de un método rápido, sencillo y específico para la determinación de estas sustancias. En este trabajo se describen dos técnicas analíticas para la determinación de los derivados anfetamínicos en sangre y orina, concretamente de MDMA, MDA, MDEA y MBDB mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia (CLAR-Fluorescencia), y de anfetamina, metanfetamina, PMA, MDA, MDMA, MDEA y MBDB mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (CL-EM). Ambos métodos, validados y aplicados al análisis de casos reales que llegaron a nuestro Servicio de Toxicología, son comparados indicando sus ventajas e inconvenientes (CLAR-Fluorescencia, técnica más sencilla y económica; CL-EM, técnica más sensible y específica).

Palabras clave: Anfetaminas, CLAR-Fluorescencia, CL-EM, sangre, orina.

Abstract: Comparative study of two liquid chromatographic techniques for the determination of amphetamine and derivatives in blood and urine: HPLC-fluorescence vs. LC-MS

The consumption of amphetamine and its derivatives (ecstasy) has increased in Spain during the last years. The number of “pills” seizures has risen a 62,35% between 2001 (860.000) and 2002 (1.396.000), according to Observatorio Español sobre Drogas (OED), and the top of the prevalence of ecstasy intake is in the case of males between 20-24 years (14,3%) and in the case of females between 25-29 years (5,1%). That is why, a rapid, simple and specific method for the determination of these compounds is very useful in a laboratory of forensic toxicology. In this work, two analytical techniques for the determination of amphetamine derivatives in blood and urine are described, one for the determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB by high performance liquid chromatography with fluorescence detector (HPLC-Fluorescence), and the other one for the determination of amphetamine, methamphetamine, PMA, MDA, MDMA, MDEA and MBDB by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS). These two methods were full-validated, applied to real cases

and compared (HPLC-Fluorescence, simplest and low-cost; LC-MS more sensible and specific).

Keywords: Amphetamines, HPLC-Fluorescence, LC-MS, blood, urine

Introducción

La drogodependencia es un importante problema de salud pública en el mundo. Muchas sustancias son utilizadas como drogas recreacionales, incluyendo entre ellas a los derivados de anfetamina, MDMA (3,4-metilendioximetanfetamina) o “éxtasis”, MDA (3,4-metilendioxianfetamina), MDEA (3,4-metilendioxietilamfetamina), MBDB (N-metil-1-(3,4-metilendioxifenil)-2-butamina) y PMA (paramethoxyamphetamine), como estimulantes o alucinógenos. Estos compuestos pertenecen a un grupo de sustancias (feniletilaminas), que se engloban a su vez en un grupo más amplio, las denominadas drogas de diseño (Fig. 1). Las drogas de diseño se definen como sustancias obtenidas sintéticamente con propiedades farmacológicas y estructura química similar a otras ya existentes, pero que permite evitar su control legal [1].

En España el número de incautaciones de “pastillas de éxtasis” ha aumentado un 62,35% entre 2001 (860.000) y 2002 (1.396.000), así como el número de tratamientos por abuso y dependencia del éxtasis que pasó de 226 en 1996 a 335 en 2001. La máxima prevalencia del consumo de éxtasis se situó, en el caso de los hombres, entre 20-24 años (14,3%) y en el caso de las mujeres, entre 25-29 años (5,1%) [2].

Todo esto hace necesario que un laboratorio de toxicología forense disponga de un método rápido y específico para la determinación de estos compuestos en muestras de sangre, importante matriz biológica debido a que sus concentraciones se correlacionan con el efecto farmacológico, y en muestras de orina, ya que la vía renal constituye la principal vía de eliminación de estos compuestos.

En este trabajo comparamos dos técnicas analíticas distintas para la determinación de anfetamina y derivados, concretamente cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia (CLAR-Fluorescencia) y cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (CL-EM).

CLAR-Fluorescencia es una técnica muy utilizada en el análisis de MDMA y análogos en sangre y orina. En la literatura científica Sadeghipour y Veuthey desarrollaron un método en plasma y pastillas [3], Herráez-Hernández et al. en plasma y orina [4], Clauwert et al. en sangre, plasma, humor vítreo y orina [5], da Costa y da Matta Chasin en orina [6], y Mancinelli et al. [7] aplicaron un procedimiento fluorimétrico para la determinación de anfetaminas en matrices biológicas y pastillas. Así mismo, la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas ha sido aplicada por numerosos autores para la determinación de los derivados anfetamínicos en plasma [8-12] y en orina [9, 12-16].

El objetivo de este trabajo ha sido comparar estas dos técnicas analíticas (CLAR-Fluorescencia vs. CL-EM) para la determinación de anfetaminas y derivados en muestras de sangre y orina, indicando las ventajas e inconvenientes de cada una de ellas. Ambas técnicas han sido validadas y aplicadas a casos reales que llegaron a nuestro Servicio de Toxicología.

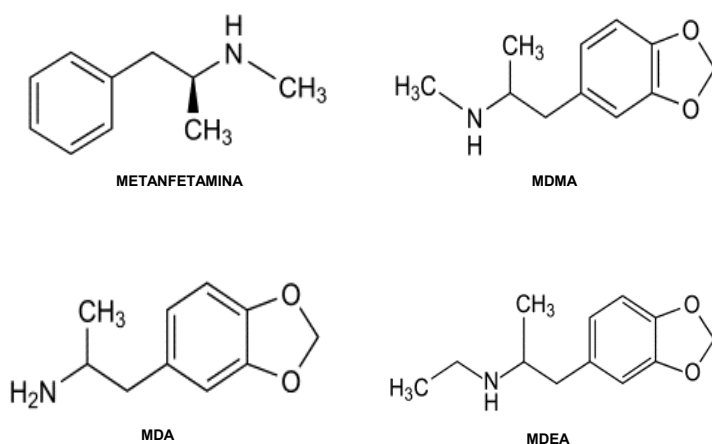


Fig. 1. Estructura química de metanfetamina, MDMA, MDA y MDEA.

Materiales y métodos

Reactivos

d,l-anfetamina, d,l-metanfetamina, d,l-MDA, d,l-MDMA, d,l-MDEA, d,l-MBDB, d,l-PMA, d,l-metanfetamina-d₅ y d,l-MBDB-d₅ fueron adquiridos a Lipomed (Arlesheim, Suiza). Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Acetonitrilo, metanol, dihidrógeno fosfato potásico, hidróxido sódico, ácido clorhídrico (25%) y ácido fórmico (99%) fueron adquiridos a Merck (Darmstadt, Alemania), sulfato sódico anhidro Panreac (Barcelona, España), acetonitrilo grado LC-MS Chromasolv® (99.98% pureza) Riedel de Hæn-Sigma-Aldrich Chemie (Schnelldorf, Alemania), formiato amónico Fluka-Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Suiza), dietiléter de calidad CLAR Scharlau Multisolvent (Sentmenat, España). El agua purificada fue obtenida en el laboratorio mediante un sistema de purificación de agua Milli-Q (Le Mont-sur-Lausanne, Suiza). Los Toxitubes A® de Varian (Middelburg, Holanda) fueron utilizados para la extracción líquido-líquido.

Equipamiento y cromatografía

1. Equipamiento y cromatografía en CLAR-Fluorescencia

El sistema cromatográfico utilizado fue el sistema CLAR-Fluorescencia de Waters (Milford, Massachussets, EE.UU) que consistía en una bomba cuaternaria 616, inyector automático 717, detector de fluorescencia 474 y software Millenium³²®. Las longitudes de onda del detector (λ) fueron fijadas en 285 nm, como λ de excitación y 320 nm, como λ de emisión. La columna cromatográfica utilizada para la separación de los compuestos, fue una columna de fase reversa, Kromasil 100 C8 5 μ m 250 x 4.6 mm de Teknokroma (Barcelona, España), y como precolumna, la precolumna Spherisob® S5 C8 10 x 4.6 mm de Waters (Milford, Massachussets, EE.UU). La separación fue realizada a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una mezcla de dihidrógeno fosfato potásico (KH₂PO₄) 0.03 M pH =5 y acetonitrilo (75:25), en modo isocrático, bombeada a un flujo de 1 mL/min. El tiempo de análisis fue 10 minutos.

2. Equipamiento y cromatografía en CL-EM

El sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución utilizado fue Waters Alliance 2795 Separation Module provisto de un horno de columna Waters (Milford, Massachussets, EE.UU.). La separación de los compuestos fue realizada en una columna de fase reversa, Atlantis dC18 3 μm 100 x 2.1 mm, a una temperatura de 26°C. La fase móvil utilizada fue una mezcla de tampón de formiato de amonio pH 3 y acetonitrilo (85:15), trabajando en modo isocrático a un flujo de 0.2 mL/min. El tiempo de análisis fue de 10 minutos. El espectrómetro de masas utilizado fue Micromass ZMD 2000 (Micromass, Manchester, Reino Unido) provisto de una interfase Z-Spray. La ionización fue realizada utilizando electrospray en modo positivo (ESI+). El gas de nebulización y de desolvatación utilizado fue nitrógeno. Otros parámetros importantes fueron: Temperatura de desolvatación 300°C, temperatura de la fuente 120°C, flujo del gas de desolvatación 500 L/h, flujo del gas de cono 50 L/h y voltaje del capilar 3500 V. El software utilizado fue MassLynx NT 3.5. Las m/z seleccionadas para cada compuesto, así como el voltaje de cono correspondiente, aparecen recogidos en la tabla 1.

Tabla 1. m/z de cada compuesto y su voltaje de cono correspondiente. Aparece subrayada la m/z que fue utilizada para la cuantificación.

Compuesto	Función	m/z	Voltaje de cono (V)
Anfetamina	Función 1: SIR 9 m/z	<u>136,1</u>	15
		118,9	25
<u>166,3</u>		10	
149,1		14	
PMA		<u>180,1</u>	15
		163,1	20
MDA		<u>150,1</u>	15
		118,9	25
Metanfetamina		<u>194,2</u>	15
		163,1	20
MDMA	<u>155,3</u>	15	
	Función 2: SIR 4 m/z	<u>208,2</u>	20
163,1		25	
<u>208,2</u>		20	
177,1		25	
Metanfetamina-d₅	<u>213,3</u>	15	
	MDEA		
MBDB			
	MBDB-d₅		

Preparación de las muestras

La preparación de las muestras para la elaboración de las rectas de calibrado y validación de los métodos analíticos, fue realizada sembrando con las correspondientes disoluciones en metanol de los derivados anfetamínicos, muestras de orina y sangre blanco, es decir, libres de droga. Las muestras de orina blanco procedían de individuos sanos, y las muestras de sangre blanco, de excedentes del Centro de Transfusión de Sangre de Santiago de Compostela.

Extracción de las muestras de sangre y orina

1. Extracción de las muestras de sangre y orina en CLAR-Fluorescencia

La extracción realizada fue una doble extracción líquido-líquido. A 0,5mL de sangre / 1mL orina se le añadió 1mL / 2,5mL de agua destilada y se introdujo la mezcla en el sistema de extracción líquido-líquido Toxitube A ®. Después de agitar durante 15

minutos y centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos, la fase orgánica (1.4mL) fue recogida y transferida a un tubo limpio, dónde se añadieron 5mL de NaOH 0.05M. Se agitó nuevamente durante 10 minutos, y antes de centrifugar 10 minutos a 4000 rpm, se añadieron 8.5g de sulfato sódico anhidro con la finalidad de permitir una adecuada separación de las fases acuosa y orgánica. 1mL de la fase orgánica así obtenida, fue transferido a un tubo cónico y evaporado a seco con nitrógeno a 35°C. Para prevenir la evaporación de las anfetaminas, antes de evaporar se añadió a la fase orgánica 100 µL de HCl 1% en metanol. El residuo fue reconstituido en 200 µL de la fase móvil, y se inyectó una alícuota de 20 µL en el sistema CLAR.

2. Extracción de las muestras de sangre y orina en CL-EM

La extracción realizada fue una extracción líquido-líquido. Adicionamos 50µL de una disolución en metanol de Metanfetamina-d5 y MBDB-d5 a una concentración de 0.5µg/mL, a 0.5mL de sangre o de orina. A continuación fueron añadidos 0,5mL de NaOH 1N, y como disolvente orgánico se utilizaron 3mL de éter dietílico. Después de agitar 15 minutos y centrifugar 10 minutos a 4000 rpm, se recogió la fase orgánica a la que, antes de evaporar a seco con nitrógeno a 35°C, se añadió 100 µL de HCl 1% en metanol. El volumen de reconstitución fueron 50 µL de fase móvil, y se inyectó una alícuota de 10 µL.

Validación de los métodos analíticos

Ambos métodos analíticos fueron validados, estudiando la linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, rendimiento, límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ), selectividad y, en el caso de CL-EM, se estudió además la supresión iónica. La validación de los métodos analíticos fue realizada siguiendo las directrices de la FDA (Food and Drug Administration) [17].

Resultados

En CLAR-Fluorescencia la resolución de los 4 derivados anfetamínicos fue adecuada, con un tiempo de análisis de 10 minutos. El tiempo de retención para cada compuesto fue: MDA 5.2 min., MDMA 5.7 min., MDEA 6.7 min. y MBDB 7.3 min., tanto en muestras de sangre como de orina.

En CL-EM el tiempo de análisis fue también de 10 minutos. En este caso, los tiempos de retención de los compuestos fueron: Anfetamina 3 min., MDA 3.5 min., PMA y Metanfetamina 3.6 min., MDMA 4 min., MDEA 5.2 min. y MBDB 6.4 min., tanto en muestras de sangre como de orina.

Los resultados correspondientes a las validaciones de los métodos analíticos, aparecen recogidos en las tablas 2-5. Las figuras 2 y 3, muestran ejemplos de cromatogramas obtenidos aplicando las técnicas analíticas estudiadas a muestras reales de sangre y orina.

Tabla 2. *Parámetros de la validación de la determinación de MDA, MDMA, MDEA y MBDB en muestras de sangre mediante CLAR-Fluorescencia.*

Compuesto	Linealidad (ng/mL)	Rendimiento (25ng/mL)	Repetibilidad n=6, C.V. (25ng/mL)	Reproducibilidad n=6, C.V. (25ng/mL)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
MDA	10-250ng/mL $r^2 = 0,990$	43,7 %	12,5	11,6	4	10
MDMA	10-250ng/mL $r^2 = 0,991$	50 %	9,4	8,5	4	10
MDEA	10-250ng/mL $r^2 = 0,992$	52,9 %	8,9	9,8	4	10
MBDB	10-250ng/mL $r^2 = 0,991$	48,7 %	17	14,8	4	10

Tabla 3. *Parámetros de la validación de la determinación de MDA, MDMA, MDEA y MBDB en muestras de orina mediante CLAR-Fluorescencia.*

Compuesto	Linealidad	Rendimiento (50ng/mL)	Repetibilidad n=6, C.V. (50ng/mL)	Reproducibilidad n=6, C.V. (50ng/mL)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
MDA	10-250ng/mL $r^2 = 0,991$	49,6 %	7,7	5,1	4	10
MDMA	10-250ng/mL $r^2 = 0,993$	56 %	10,8	2,7	4	10
MDEA	10-250ng/mL $r^2 = 0,991$	60,4 %	8	3,1	4	10
MBDB	10-250ng/mL $r^2 = 0,995$	66,6 %	7,7	3,9	4	10

Tabla 4. *Parámetros de la validación de la determinación de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, PMA, MDEA y MBDB en muestras de sangre mediante CL-EM.*

Comp.	Linealidad	Rendimiento (10ng/mL)	Repetibilidad (25ng/mL)		Reproducibilidad (25ng/mL)		LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Supresión Iónica
			C.V.	E.R.	C.V.	E.R.			
Anf	1-250 ng/mL $r^2=0,997$	102,77 %	4,2	11,5	7,2	14,4	0,5	1	No
Metanf	1-250 ng/mL $r^2=0,998$	99,2 %	4,2	9,3	8,8	6,2	0,5	1	No
MDA	2-250 ng/mL $r^2=0,987$	76,5 %	19,2	-2,2	25,5	11,4	1	2	No
MDMA	1-250 ng/mL $r^2=0,995$	92,5 %	12,8	-3,7	19,6	-10,7	0,5	1	No
PMA	1-250 ng/mL $r^2=0,996$	107,97 %	8,1	-7,5	8,8	4,3	0,5	1	No
MDEA	1-250 ng/mL $r^2=0,996$	88,7 %	4,9	10,1	9,5	4,5	0,5	1	No

Tabla 5. *Parámetros de la validación de la determinación de anfetamina, metanfetamina,MDA, MDMA, PMA, MDEA y MBDB en muestras de orina mediante CL-EM.*

Comp.	Linealidad	Rendimiento (10ng/mL)	Repetibilidad (25ng/mL)		Reproducibilidad (25ng/mL)		LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Supresión Iónica
			C.V.	E.R.	C.V.	E.R.			
Anf	1-250 ng/mL $r^2=0,997$	96,5 %	2,4	15,1	9,1	10,9	0,5	1	No
Metanf	1-250 ng/mL $r^2=0,999$	99,7 %	3,8	7,1	7,6	0,6	0,5	1	No
MDA	2-250 ng/mL $r^2=0,998$	95,9 %	3,9	10,7	9,1	10,1	1	2	No
MDMA	1-250 ng/mL $r^2=0,998$	96,4 %	3,7	9,6	8,9	-1,2	0,5	1	No
PMA	2-250 ng/mL $r^2=0,992$	94,5 %	1,2	20,2	7,5	15,6	1	2	No
MDEA	1-250 ng/mL $r^2=0,997$	95,5 %	1,2	1,1	9,6	-6,3	0,5	1	No

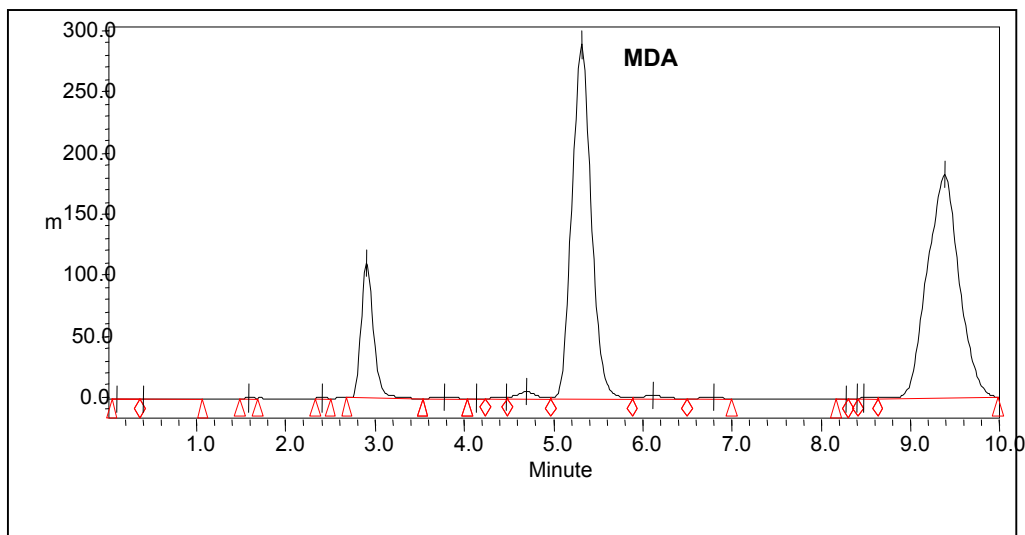


Fig. 2. Cromatograma de una muestra de sangre positiva a MDA (120ng/mL) analizada mediante CLAR-Fluorescencia.

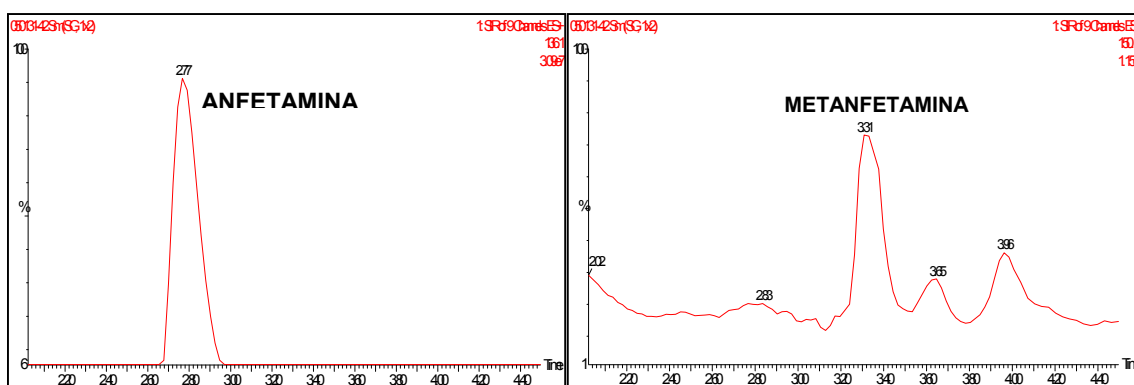


Fig. 3. Cromatograma de una muestra de orina positiva a Anfetamina (2283ng/mL) y a Metanfetamina (2ng/mL) analizada mediante CL-EM.

Discusión

El procedimiento CL-EM fue más sensible que el procedimiento CLAR-Fluorescencia. CL-EM requirió menor cantidad de muestra para hacer el análisis (0.5mL de orina) que CLAR-Fluorescencia (1mL). En el caso de la sangre, ambas técnicas partieron de la misma cantidad de muestra (0.5mL), pero el límite de detección y de cuantificación, fue mucho menor en CL-EM. Tanto en sangre como en orina, los LOD y LOQ de los derivados anfetamínicos fueron del orden de 10 veces más bajos en CL-EM que en CLAR-Fluorescencia.

El procedimiento CL-EM requirió una preparación de las muestras mucho más sencilla que CLAR-Fluorescencia. En el caso de CL-EM, la extracción realizada fue una extracción líquido-líquido simple, mientras que en el caso de CLAR-Fluorescencia, fue necesario realizar una doble extracción líquido-líquido, para eliminar las interferencias existentes. Como consecuencia de esto, la extracción realizada en el procedimiento CL-EM, presentó un rendimiento mayor que 90% para todos los compuestos, mientras que

en CLAR-Fluorescencia fue del orden del 50%; la manipulación de la muestras en CL-EM fue menor y el proceso fue más rápido.

CL-EM ha demostrado ser una técnica más específica que CLAR-Fluorescencia. La identificación de un compuesto en CLAR-Fluorescencia, se basa en su tiempo de retención, en unas determinadas condiciones cromatográficas, y en que sea fluorescente a unas determinadas longitudes de onda (λ excitación y λ emisión). En el caso de CL-EM, además de identificar un compuesto en función de su tiempo de retención bajo unas determinadas condiciones cromatográficas, debe presentar 2 m/z características del compuesto, el ión de cuantificación y el ión de calificación. El ión de cuantificación, es normalmente el ión pseudomolecular ($M+H^+$), y el ión calificador es un fragmento obtenido a partir del pseudomolecular por acción del voltaje de cono (Collision Induce Dissociation). Además, la relación ión cuantificador / ión calificador, debe de estar dentro de un rango determinado. Esta mayor especificidad de CL-EM, se puso de manifiesto al encontrar en orinas de algunos casos, una interferencia con MDA por CLAR-Fluorescencia, que no existía por CL-EM. A pesar de esto, el método desarrollado para la determinación de derivados anfetamínicos mediante CLAR-Fluorescencia, es altamente específico tanto en muestras de orina como en muestras de sangre, al no existir interferencias con componentes endógenos de estas matrices, ni con otras drogas de abuso (cocaína, opiáceos, LSD, etc.), ni otros fármacos (benzodiazepinas, barbitúricos, etc.)[18].

Ambos procedimientos requieren un tiempo de análisis de tan solo 10 minutos, pero en el caso de CL-EM detectamos un mayor número de compuestos (anfetamina, metanfetamina, MDA, PMA, MDMA, MDEA y MBDB), que en el caso de CLAR-Fluorescencia (MDA, MDMA, MDEA y MBDB).

El principal inconveniente de CL-EM es su precio, ya que CLAR-Fluorescencia es indudablemente un procedimiento más económico.

Conclusión

Este estudio describe 2 técnicas analíticas para la determinación de derivados anfetamínicos en sangre y orina, concretamente MDA, MDMA, MDEA y MBDB mediante CLAR-Fluorescencia, y Anfetamina, Metanfetamina, MDA, PMA, MDMA, MDEA y MBDB mediante CL-EM.

Al comparar estas dos técnicas, concluimos que CL-EM es la mejor opción, al demostrar ser más sensible, más específico, detecta mayor número de compuestos en el mismo tiempo de análisis, y el proceso de extracción es mucho más sencillo.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el apoyo del Ministerio de Educación y Ciencia (Becas F.P.U. número AP-2002-2935 y AP-2002-2878).

Bibliografía

[1] Bobes J., Lorenzo P., Sáiz P.A. (1998) Éxtasis (MDMA): Un abordaje comprehensivo. Tomo I, Masson, Barcelona.

- [2] Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, Informe N° 6. Observatorio Español sobre Drogas, Noviembre 2003. Ministerio del Interior, España. <http://www.mir.es/pnd>.
- [3] Sadeghipour F., Veuthey J.-L. (1997) Sensitive and selective determination of methylenedioxyethylated amphetamines by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection, *J. Chromatogr. A* 787:137-143.
- [4] Herráez-Hernández R., Campís-Falcó P., Verdú-Andrés J. (2001) Sensitive determination of methylenedioxyethylated amphetamines by liquid chromatography, *Analyst*, 126:581-586.
- [5] Clauwert K., Van Bocxlaer J., De Setter E., Van Calenbergh S., Lambert W., De Lenheer A. (2000) Determination of the designer drugs 3,4-methylenedioxyamphetamine, methylenedioxyethylamphetamine and methylenedioxyamphetamine with HPLC and fluorescence detection in whole blood, serum, vitreous humor, and urine, *Clin. Chem.*, 46:1968-1977.
- [6] Da Costa J., de Matta Chasin A. (2004) Determination of MDMA, MDEA and MDA in urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. B*, 811:41-45.
- [7] Mancinelli R., Gentili S., Guiducci M., Macchia T. (1999) Simple and reliable high-performance liquid chromatography fluorimetric procedure for the determination of amphetamine-derived designer drugs, *J. Chromatogr. B* 735:243-253.
- [8] Bogusz M.J., Krüger K.D., Maier R.D. (2000) Analysis of underivatized amphetamines and related phenethylamines with high-performance liquid-chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.*, 24(2):77-84.
- [9] Mortier K.A., Dams R., Lambert W.E., De Letter E.A., Calenbergh S.V., De Lennheer A.P. (2002) Determination of paramethoxyamphetamine and other amphetamine-related designer drugs by liquid chromatography/sonic spray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 16(9):865-870.
- [10] Wood M., De Boek G., Samyn N., Morris M., Cooper D.P., Maes R.A., De Bruijn E.A. (2003) Development of a rapid and sensitive method for the quantitation of amphetamines in human plasma and oral fluid by LC-MS/MS, *J. Anal. Toxicol.*, 27:78-87.
- [11] Hendrickson H.P., Milesi-Halle A., Laurenzana E.M., Owens S.M. (2004) Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of methamphetamine and amphetamine using small volumes of rat serum, *J. Chromatogr. B*, 806(2):81-87.
- [12] Bogusz M.J., Kala M., Maier R.D. (1997) Determination of phenylisothiocyanate derivatives of amphetamine and its analogues in biological fluids by HPLC-APCI-MS or DAD, *J. Anal. Toxicol.*, 21, 59-68.
- [13] Kataoka H., Lord H.L., Pawliszyn J. (2000) Simple and rapid determination of amphetamine, methamphetamine, and their methylenedioxy derivatives in urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.*, 24:257-265.
- [14] Nordgren H.K., Beck O. (2003) Direct screening in urine for MDMA and MDA by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.*, 27:1-5.

[15] Jenkins K.M., Young M.S., Mallet C.R., Elian A.A. (2004) Mixed-mode solid-phase extraction procedures for the determination of MDMA and metabolites in urine using LC-MS, LC-UV, or GC-NPD, *J. Anal. Toxicol.*, 28:50-58.

[16] Wu T.Y., Fuh M.R. (2005) Determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in urine by online solid-phase extraction and ion-pairing liquid chromatography with detection by electrospray tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19:775-780.

[17] US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2001) *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, US Department of Health and Human Services, Beltsville, Maryland, EE.UU.

[18] Concheiro M., de Castro A., Quintela O., López-Rivadulla M., Cruz A. (2005) Determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in oral fluid using high performance liquid chromatography with native fluorescence detection, *Forensic Sci. Int.*, 150:221-226.