ESPECTROMETRÍA DE MASAS: UNA HERRAMIENTA CLAVE FRENTE AL FENÓMENO DE LAS NUEVAS SUSTANCIAS PSICOACTIVAS

María Mata-Pesquera[1], María Ibáñez[1], David Fabregat-Safont[2,1], Juan V. Sancho[1*]

[1]Química Analítica en Salud Pública y Medioambiente, Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA), Universitat Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n, 12071 Castelló de la Plana, España.
[2]Grupo de Investigación en Metabolómica Aplicada, Instituto de Investigación Médica IMIM-Hospital del Mar, Doctor Aiguader 88, 08003 Barcelona, España.
*sanchoj@uji.es

Abstract

Las nuevas sustancias psicoactivas (NPS, por sus siglas en inglés), popularmente conocidas como "drogas de diseño", se han convertido en una seria amenaza para la salud pública debido al gran número de sustancias existentes, su continua evolución estructural, su elevada potencia y la escasa información sobre su toxicidad. Ante esta realidad, mantener una vigilancia continua sobre estas sustancias es fundamental para poder detectarlas a tiempo y actuar rápidamente tanto en entornos clínicos como forenses.

En este contexto, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) se ha consolidado como una herramienta clave. Mientras que el análisis dirigido basado en MS de baja resolución permite confirmar y cuantificar con precisión compuestos conocidos, el análisis no dirigido, generalmente mediante MS de alta resolución (HRMS), abre la puerta a identificar nuevas sustancias y elucidar la estructura de sus metabolitos. Esto hace que la LC-MS sea indispensable en toxicología forense, en estudios metabólicos y, en definitiva, en la generación de información necesaria para abordar esta amenaza en constante evolución.

1. Situación actual de las Nuevas Sustancias Psicoactivas (NPS)

Las NPS representan una de las evoluciones más inquietantes del mercado mundial de las drogas ilícitas. Estos compuestos, diseñados para imitar los efectos de las drogas clásicas sin ser detectadas en los controles rutinarios, presentan a menudo una potencia mucho mayor y un perfil de toxicidad completamente desconocido [1, 2]. Su gran peligro radica en que, a diferencia de las drogas clásicas, la mayoría de estas sustancias no están aún fiscalizadas, lo que facilita su rápida comercialización y consumo antes de que las autoridades puedan regularlas.

La principal preocupación de salud pública asociada a las NPS no radica únicamente en su fácil y amplia disponibilidad, sino en la absoluta incertidumbre sobre su composición, pureza y dosificación [1]. Esta falta de control se traduce en un aumento alarmante de intoxicaciones graves y, lamentablemente, en un incremento de muertes por sobredosis [2].

Las NPS se clasifican en diferentes familias químicas, cada una con un perfil toxicológico y un nivel de riesgo particular [1]. Aunque el mercado de estas sustancias incluye también triptaminas o feniletilaminas, son tres las familias que concentran actualmente la mayor preocupación y volumen de consumo a escala global: los cannabinoides sintéticos, las catinonas sintéticas y los opioides sintéticos [2].

Los cannabinoides sintéticos (SCRAs por sus siglas en inglés, *Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists*), comercializados frecuentemente bajo nombres como *Spice* o K2, actúan como agonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 [3]. A diferencia del THC (delta-9-tetrahidrocannabinol), que es el principal compuesto psicoactivo del cannabis y que actúa como agonista parcial, los SCRAs suelen presentar una afinidad mucho mayor por estos receptores [4]. Esto se traduce en efectos mucho más intensos e impredecibles que pueden ir desde episodios de psicosis y paranoia, hasta convulsiones e insuficiencia renal [5]. Además, su rápida metabolización en el organismo complica aún más su detección y control.

Las catinonas sintéticas, conocidas popularmente como "sales de baño," son análogos de la catinona natural, el principio activo presente en la planta *khat*. Estos compuestos actúan como potentes estimulantes del sistema nervioso, al aumentar la segregación de dopamina a la vez que bloquean la reabsorción de epinefrina, norepinefrina y serotonina [6]. En consecuencia, estas sustancias pueden generar episodios de euforia, aumento de energía, taquicardia e hipertermia severa [7, 8].

Finalmente, los opioides sintéticos, que incluyen análogos del fentanilo y los más recientes "nitazenos," constituyen actualmente la familia más letal de NPS [2]. Se caracterizan por su extrema potencia, que puede superar en cientos de veces la de la morfina o la heroína [9]. Al actuar como potentes depresores del sistema nervioso central, una dosis mínima puede resultar mortal, lo que explica que sean la principal causa del aumento de muertes por sobredosis a nivel mundial [2].

2. El desafío analítico de las NPS

El fenómeno de las NPS se caracteriza por el constante y acelerado "juego del gato y el ratón". Cada vez que los laboratorios forenses identifican una de estas sustancias y las autoridades la fiscalizan (es decir, se añade a la lista de sustancias controladas), los laboratorios clandestinos modifican ligeramente la estructura molecular de dicho compuesto [10]. Esta mínima alteración química da lugar a una "nueva" sustancia que, legalmente, no está incluida en la lista de drogas prohibidas y por lo tanto puede distribuirse libremente, a menudo a través de internet o *smart shops* (**Figura 1**), hasta que la ciencia y la legislación logran detectarla y regularla.

Fig. 1. Ejemplos de algunas NPS comercializadas a través de internet y *smart shops*.

Ante esta situación, la monitorización continua del mercado de las NPS se ha convertido en un auténtico imperativo de salud pública. Por un lado, permite que las autoridades sanitarias emitan alertas tempranas (informando a hospitales y servicios de emergencia sobre los síntomas clínicos específicos asociados a cada sustancia y el tratamiento más adecuado). Por otro lado, proporciona a los organismos reguladores la evidencia científica necesaria para acelerar su fiscalización y retirar estas sustancias del circuito legal con la mayor rapidez posible [1].

El volumen de NPS que llega cada año al mercado es verdaderamente abrumador. Para que la sociedad pueda responder a esta amenaza en constante evolución, se requieren herramientas analíticas que no solo sean sensibles y selectivas, sino también capaces de identificar compuestos completamente desconocidos. Así pues, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) se erige como una de las técnicas fundamentales de la toxicología moderna y un pilar fundamental de la ciencia forense de vanguardia.

3. Fundamentos de la LC-MS

La elección de la LC-MS como herramienta central para el control de NPS no es casual, sino que es la combinación de dos de las técnicas analíticas más potentes y que además se complementan entre sí.

La LC es una técnica de separación que permite fraccionar los miles de compuestos presentes en una muestra compleja. La muestra se inyecta en un sistema que la impulsa a través de una columna (fase estacionaria) mediante una fase móvil líquida [11]. A lo largo del recorrido, los compuestos interactúan de manera diferente con ambas fases: aquellos que presentan mayor afinidad por la fase estacionaria quedan retenidos en la columna, mientras que los menos afines avanzan más rápido y eluyen antes. La principal ventaja de la LC reside en su capacidad para analizar compuestos polares y moderadamente apolares en matrices acuosas. Esto la convierte en una técnica ideal para la determinación de NPS en una amplia variedad de muestras (desde incautaciones hasta matrices biológicas complejas) con un mínimo tratamiento previo.

La MS, por su parte, se encarga de identificar y caracterizar los compuestos, hayan sido o no previamente separados por la LC. Este proceso se desarrolla en tres etapas: la generación de especies iónicas en la fuente de ionización, la separación de estos iones en el analizador de masas en función de su relación masa/carga (m/z) y la detección del número total de iones que llegan al detector [12].

El analizador de masas es el componente central de este sistema y se clasifica según su capacidad de resolución. Los analizadores de baja resolución permiten distinguir iones que difieren en una unidad de m/z, mientras que los analizadores de alta resolución pueden separar iones con diferencias de apenas unas pocas miliunidades de m/z [12].

En conjunto, el acoplamiento LC-MS ofrece la combinación perfecta: la LC separa los distintos compuestos presentes en la muestra, mientras que la MS permite identificarlos con gran seguridad. Esta sinergia convierte a la LC-MS en una herramienta indispensable para el análisis de NPS.

4. De la detección dirigida a la identificación no dirigida

La versatilidad de la LC-MS se refleja en las dos estrategias analíticas principales que utiliza la toxicología para abordar el estudio y control de las NPS: el análisis dirigido y el análisis no dirigido. Esta flexibilidad también se manifiesta en los dos tipos de analizadores de masas más comúnmente utilizados en estas estrategias: los analizadores en tándem (MS/MS) y los analizadores de alta resolución (HRMS). A modo de

resumen, la **Tabla 1** muestra las características principales de cada uno de estos analizadores, junto a su adecuación, versatilidad y facilidad operacional según las diferentes aplicaciones en el campo de las NPS.

Tabla 1. Comparativa de la capacidad analítica, versatilidad y adecuación operacional de los analizadores de masas más utilizados para el control de NPS.

Criterio de Aplicación	MS/MS	HRMS
Característica analítica principal	Alta sensibilidad en análisis dirigido	Adquisición de espectro completo
Disponibilidad en laboratorios analíticos	✓✓	✓
Facilidad de uso	✓	✓
Facilidad para analizar los datos	✓✓	✓
Identificación de sustancias conocidas	✓✓	✓✓
Identificación de sustancias desconocidas	✓	✓✓
Cuantificación de sustancias conocidas	✓✓	✓
Análisis retrospectivo	✗	✓✓
Elucidación de metabolitos	✓	✓✓
Estudios de farmacocinética	✓✓	✓✓
Estudios de metabolómica dirigida	✓✓	✓
Estudios de metabolómica no dirigida	✓	✓✓

✗ No adecuado ✓ Adecuado ✓✓ Óptimo

4.1 Análisis dirigido (*Targeted*)

Cuando el objetivo es identificar y cuantificar con precisión una o varias sustancias conocidas, la técnica utilizada es la LC-MS de baja resolución en tándem (LC-MS/MS), generalmente con un analizador de triple cuadrupolo (QqQ) [13]. En este sistema, el primer cuadrupolo (Q1) selecciona un ion precursor específico, que se fragmenta en el segundo cuadrupolo, el cual actúa como celda de colisión (q). Finalmente, los iones producto resultantes se analizan en el tercer cuadrupolo (Q2). Entre sus seis modos diferentes de operación [10], el más utilizado es el SRM (*Selected Reaction Monitoring*).ya que ofrece una gran sensibilidad, especificidad y selectividad en análisis dirigidos.

La principal limitación de esta técnica es que requiere el uso de patrones analíticos de las sustancias de interés, los cuales no existen para la mayoría de NPS debido a su constante novedad. Además, si aparece una nueva NPS que no ha sido incluida previamente en el método de adquisición, simplemente no será detectada.

La LC-MS/MS ha sido ampliamente utilizada para identificar y cuantificar NPS en diferentes matrices biológicas, como orina [14], sangre [15] o incluso pelo [16]. Asimismo, ha sido fundamental en el estudio de la farmacología y farmacocinética de ciertas NPS, ayudando a comprender su potencia y mecanismo de acción. A modo de ejemplo, Fabregat et al. determinaron 13 catinonas sintéticas diferentes en tejido cerebral de ratas, estableciendo una correlación entre la estructura molecular de cada compuesto y su capacidad para travesar la barrera hematoencefálica [17].

No obstante, su aplicación ha sido más limitada en el análisis de productos consumidos o incautados. Esto se debe a que, al ser matrices menos complejas, es posible utilizar instrumentación analítica más sencilla y

disponible habitualmente en los laboratorios de toxicología forense.

Recientemente, se han desarrollado metodologías que exprimen los diferentes modos de trabajo del QqQ para aplicaciones menos dirigidas en la detección de NPS en productos. Estos enfoques incluyen estrategias como el cribado *pseudo-dirigido,* basado en la monitorización de iones producto o de pérdidas neutras característicos de familias enteras de compuestos, como las catinonas [17] o los cannabinoides sintéticos [18]. Estas aproximaciones son particularmente útiles para la detección rápida de análogos estructurales en laboratorios que solamente cuentan con MS de baja resolución.

4.2 Análisis no dirigido (*Untargeted*)

Para hacer frente a la rápida y constante aparición de NPS, los laboratorios recurren cada vez más a la MS de alta resolución (HRMS). Los equipos basados en analizadores como el TOF o el orbitrap han supuesto un gran avance en la lucha contra las drogas de diseño. Su principal ventaja es que permite una detección "abierta", es decir, es posible analizar una muestra sin necesidad de seleccionar previamente qué compuestos se buscan.

El poder de la HRMS reside en su capacidad para medir la *m/z* de los iones con una exactitud de hasta cuatro o cinco cifras decimales. Esta relación *m/z,* conocida como masa exacta experimental, permite deducir la fórmula molecular de un compuesto y diferenciar inequívocamente una NPS de un posible interferente con la misma masa nominal, pero con una masa exacta diferente. Además, los sistemas HRMS registran el espectro completo de todos los iones presentes en la muestra durante todo el análisis (*full-range acquisition*), en lugar de limitarse a un número reducido de iones seleccionados [10].

Una vez adquiridos los datos experimentales mediante LC-HRMS, el proceso de identificación suele comenzar comparando la información obtenida con bases de datos que recopilan las estructuras, fórmulas moleculares e incluso espectros de fragmentación de NPS previamente reportadas en la literatura científica (*suspect screening*). Este modo de trabajar permite una identificación tentativa de las sustancias sin necesidad de disponer de patrones analíticos, los cuales pueden adquirirse posteriormente para confirmar la estructura de manera definitiva [10]. Sin embargo, el mercado de las NPS evoluciona tan rápido que estas bases de datos nunca están completamente actualizadas. Por ello, los laboratorios necesitan recurrir también a estrategias de detección no dirigida (*untargeted screening*), capaces de descubrir compuestos nuevos o no descritos previamente.

A menudo, los laboratorios de análisis de drogas tan sólo disponen de cromatografía de gases acoplada a MS (GC-MS) e instrumentos de espectroscopía infrarroja (IR), técnicas que no permiten una elucidación estructural completa en muchos casos.

La combinación de LC-HRMS y resonancia magnética nuclear (RMN) se ha convertido en la más utilizada para la elucidación estructural y la caracterización de nuevas NPS que aparecen en el mercado y que no han sido reportadas previamente. En primer lugar, se analiza la muestra mediante HRMS para determinar la composición elemental de la molécula original y sus iones fragmento en base a la masa exacta observada. Posteriormente, se realizan diferentes experimentos de RMN para establecer su estructura química completa. El uso de estas dos técnicas ha sido clave para caracterizar nuevas catinonas sintéticas, como la *N*-ciclohexil butilona [19] y 5-PPDI [20].

Además, una de las principales ventajas de la HRMS es la posibilidad de llevar a cabo análisis retrospectivos. Esto significa que, si un laboratorio analiza una muestra hoy y al año siguiente se detecta una nueva NPS, no es necesario volver a inyectar la muestra antigua; basta con reprocesar los datos ya adquiridos aplicando los nuevos parámetros de búsqueda. Esta capacidad de "volver al pasado" es fundamental para el seguimiento de tendencias y la trazabilidad forense.

5. El metabolismo de las NPS: el desafío del bioanálisis

Como se ha comentado anteriormente, tanto la LC-MS/MS como la LC-HRMS se utilizan para la determinación e identificación de NPS en productos consumidos y matrices biológicas. Sin embargo, el análisis de muestras biológicas presenta un reto adicional: la sustancia original suele desaparecer por completo al metabolizarse, o encontrarse en concentraciones muy bajas en sangre y orina, lo que dificulta enormemente su detección [21]. Por ello, conocer cómo se metabolizan estas sustancias es esencial para identificar posibles biomarcadores que permitan detectar su consumo.

Idealmente, los estudios de metabolismo deberían realizarse con personas voluntarias o consumidores reales de NPS. Sin embargo, esto plantea importantes cuestiones éticas, siendo necesarias otras alternativas. Entre ellas, los modelos *in vitro* simulan en el laboratorio las reacciones que ocurren en el hígado, proporcionando información valiosa sobre los metabolitos producidos por una determinada sustancia. Los sistemas *in vitro* más utilizados son los microsomas hepáticos humanos (HLM) y los hepatocitos humanos (pHH) [22].

Otra opción son los modelos *in vivo,* utilizando generalmente ratas o ratones, que permiten estudiar no solo el metabolismo, sino también la distribución, la excreción e incluso la acumulación de las NPS a lo largo del tiempo en matrices como sangre, orina, órganos, pelo o uñas [23].

La mayoría de las NPS, al igual que otras sustancias exógenas, son neutralizadas en primera instancia a través del metabolismo hepático. Los compuestos generados se clasifican en metabolitos de fase I o de fase II. Los metabolitos de fase I se generan principalmente a través de reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, entre otras. Cuando estos metabolitos se unen a moléculas endógenas, como el ácido glucurónico o el sulfato, para incrementar su polaridad y facilitar su excreción urinaria, se generan los metabolitos de fase II [24].

En algunos casos, los metabolitos generados pueden ser incluso más tóxicos que el compuesto original, por lo que es fundamental elucidar sus estructuras químicas y establecer las rutas metabólicas [25, 26].

La identificación de metabolitos sigue dos pasos clave: la detección en la matriz biológica y la caracterización estructural.

Si ya existen metabolitos previamente reportados en la literatura, la primera opción suele ser realizar una búsqueda dirigida de estos metabolitos [10]. El siguiente paso sería realizar una búsqueda *suspect* de metabolitos que podrían originarse en base a la estructura de la NPS en cuestión [23, 27]. En el caso de metabolitos desconocidos, se suele aplicar la estrategia de fragmentación común, que asume que los metabolitos comparten ciertos iones fragmento con la molécula original [23].

En el caso de estudios controlados de metabolismo, el procedimiento consiste en comparar las muestras obtenidas antes de la administración de la sustancia (muestras control o de referencia) con las muestras obtenidas después. Los compuestos que aparecen únicamente en las muestras post-administración corresponderían a potenciales metabolitos [28]. Otra estrategia adicional es la búsqueda de perfiles isotópicos característicos, especialmente útil en el caso de NPS que contienen halógenos, ya que estos elementos generan patrones isotópicos muy distintivos y fáciles de reconocer.

Finalmente, una vez detectados los posibles metabolitos, su elucidación estructural se lleva a cabo combinando la composición elemental, derivada de la masa exacta observada, con la información proporcionada por sus espectros de fragmentación [10]. A partir de toda esta información se proponen las rutas metabólicas y se seleccionan los mejores biomarcadores, que pueden emplearse como indicadores fiables del consumo tanto en aplicaciones clínicas como forenses.

Estas estrategias se han aplicado con éxito en diferentes estudios de metabolismo de NPS. Los modelos *in vitro* han permitido evaluar el metabolismo de catinonas sintéticas (como la dipentilona [29] o la *N*-etil pentedrona [30]), SCRAs de nueva generación [31, 32, 33] y opioides sintéticos de la familia de los nitazenos [34, 35]. Complementariamente, los estudios *in vivo* han sido fundamentales para proponer biomarcadores de consumo y mostrar los perfiles farmacocinéticos de algunos SCRAs [23] y triptaminas sintéticas [36], entre otros.

6. La metabolómica en el estudio toxicológico de las NPS

En el campo de las NPS, la LC-MS ha abierto una nueva vía para estudiar el impacto que produce su consumo en el organismo. La metabolómica es una estrategia analítica que busca evaluar el mayor número posible de metabolitos endógenos presentes en un sistema biológico. Se trata de un enfoque típicamente centrado en el estudio de moléculas pequeñas (generalmente con un peso molecular inferior a 1000 Da) que reflejan el estado bioquímico de un organismo en un momento dado [37].

La metabolómica puede abordarse desde dos perspectivas principales: dirigida y no dirigida. La metabolómica dirigida se centra en cuantificar de forma precisa un conjunto específico de metabolitos relacionados con una o varias rutas metabólicas concretas. En cambio, la metabolómica no dirigida amplía el alcance a todos los metabolitos detectables por la técnica analítica empleada, comparando los perfiles o 'huellas' metabólicas que varían en respuesta a alteraciones del estado biológico. Estas variaciones pueden deberse tanto a factores endógenos (como enfermedades o predisposición genética) como a factores exógenos (como la dieta o la exposición a xenobióticos) [10].

Ante la continua aparición de NPS que aún no han sido reguladas legalmente, la metabolómica no dirigida se ha convertido en una herramienta especialmente valiosa. Por ejemplo, Bijlsma et al. [38] aplicaron este enfoque para establecer marcadores indirectos del consumo de SCRAs mediante el análisis de saliva tomada después de fumar las hierbas que suelen acompañar a estos compuestos en los productos vendidos como *spice*.

7. Conclusiones y tendencias futuras

La lucha contra las NPS supone un desafío no solo para las autoridades sanitarias, organismos reguladores y fuerzas del orden, sino también para los laboratorios analíticos encargados de su detección y caracterización. En este contexto, la LC-MS se ha consolidado como una de las herramientas analíticas por excelencia para afrontar esta situación.

Tal y como se ha comentado previamente (**Tabla 1**), la LC-MS/MS ha sido la técnica más utilizada en toxicología por su alta sensibilidad y selectividad. Sin embargo, presenta algunas limitaciones, como la falta de patrones analíticos para muchas NPS (debido a su constante aparición) y la dependencia de listas predefinidas de compuestos.

Para superar estos obstáculos, las estrategias de cribado mediante LC-HRMS han supuesto un cambio de paradigma. Esta técnica permite obtener una información mucho más completa, abarcando una enorme cantidad de compuestos presentes en la muestra sin necesidad de seleccionarlos previamente ni de disponer de patrones analíticos (**Tabla 1**). Gracias a ello, la HRMS no solo facilita la identificación y elucidación estructural de las nuevas sustancias que irrumpen en el mercado, sino que también permite el análisis retrospectivo, una característica esencial para seguir las tendencias de consumo.

En el ámbito biológico, la HRMS es crucial para identificar metabolitos y establecer biomarcadores de consumo, aportando información indispensable en toxicología clínica y forense. El creciente uso de la HRMS ha impulsado, además, el desarrollo de enfoques basados en metabolómica, una disciplina que analiza los cambios metabólicos inducidos por estas sustancias y permite evaluar su impacto en el organismo.
Las tendencias futuras en la química analítica aplicada a la detección de NPS se enfocan, previsiblemente, en tres líneas clave:

- Mejora instrumental. La continua evolución de la HRMS promete alcanzar una mayor resolución, sensibilidad y precisión, lo que facilitará la identificación y cuantificación de estas sustancias en concentraciones más bajas y en matrices cada vez más complejas.
- Inteligencia artificial y análisis de datos. La evolución en el procesamiento de datos y la incorporación de algoritmos de aprendizaje automático (*Machine Learning*) optimizarán la interpretación de los resultados. Esto permitirá una identificación más rápida y precisa de las NPS, facilitando también la detección de nuevos análogos y derivados que podrían escaparse con los métodos de cribado convencionales, y proporcionará herramientas muy potentes para estudios metabolómicos.
- Enfoque multimodal. La combinación de la MS con otras técnicas analíticas, como la espectroscopía, proporcionará información complementaria para un análisis más integral. Estos enfoques multimodales aumentarán la confianza en la identificación y facilitarán la elucidación estructural de compuestos desconocidos.

Con esto, queda demostrado el papel esencial de la LC-MS para el estudio integral de las NPS, en términos de identificación, caracterización, cuantificación y metabolismo. Además, se perfila como una técnica indispensable para abordar futuras tendencias, como las estrategias analíticas integradas y el uso de la inteligencia artificial y el análisis de grandes volúmenes de datos. En definitiva, en un escenario en constante evolución, la LC-MS se consolida como una herramienta indispensable para enfrentar los retos que plantea el estudio de estas sustancias.

Agradecimientos

Este trabajo se ha llevado a cabo con la ayuda de la Conselleria d'Educació, Universitats i Ocupació de la Generalitat Valenciana (CIAICO/2022/041). M. Mata-Pesquera agradece al Ministerio de Universidades de España por su beca predoctoral (FPU21/00120). D. Fabregat-Safont agradece su beca postdoctoral (CD24/00027), financiada por el Instituto de Salud Carlos III y cofinanciado por la Unión Europea (Fondo Social Europeo Plus (FSE+)).

Referencias

[1] I. C. Santos, D. Maia, R. J. Dinis-Oliveira, D. J. Barbosa, New Psychoactive Substances: Health and Legal Challenges, *Psychoactives*. 3 (2024) 285–302. https://doi.org/10.3390/psychoactives3020018
[2] European Union Drugs Agency (EUDA), European Drug Report 2025. https://www.euda.europa.eu/publications/european-drug-report/2025_en (Acceso diciembre 2025).
[3] V. L. Alves, J. L. Gonçalves, J. Aguiar, H. M. Teixeira, J. S. Câmara, The synthetic cannabinoids phenomenon: from structure to toxicological properties. A review, *Crit. Rev. Toxicol.* 50 (2020) 359-382. https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1762539
[4] M. Ibáñez, L. Bijlsma, A. L. N. van Nuijs, J. V. Sancho, G. Haro, A. Covaci, Quadrupole-time-of-flight mass spectrometry screening for synthetic cannabinoids in herbal blends, *J. Mass. Spectrom.* 48 (2013) 685–694. https://doi.org/10.1002/jms.3217
[5] A. Alzu'bi, F. Almahasneh, R. Khasawneh, E. Abu-El-Rub, W. B. Baker, R. M. Al-Zoubi, The synthetic cannabinoids menace: a review of health risks and toxicity, *Eur. J. Med. Res.* 29 (2024) 49. https://doi.org/10.1186/s40001-023-01443-6
[6] M. L. Banks, T. J. Worst, D. E. Rusyniak, J. E. Sprague, Synthetic Cathinones ('Bath Salts'), *J. Emerg. Med.* 46 (2014) 632–642. https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2013.11.104
[7] S. Zaami, R. Giorgetti, S. Pichini, F. Pantano, E. Marinelli, F. P. Busardò, Synthetic cathinones related fatalities: An update, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22 (2018) 268–274. https://doi.org/10.26355/eurrev_201801_14129
[8] L. Karila, J. Billieux, A. Benyamina, C. Lançon, O. Cottencin, The effects and risks associated to mephedrone and methylone in humans: A review of the preliminary evidences, *Brain Res. Bull.* 126 (2016) 61–67. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.03.005
[9] J. R. P. Pereira, A. Quintas, N. R. Neng, Nitazenes: The Emergence of a Potent Synthetic Opioid Threat, *Molecules*. 30 (2025) 3890. https://doi.org/10.3390/molecules30193890
[10] M. Ibáñez, M. Mata-Pesquera, D. Fabregat-Safont, J. V. Sancho, Liquid chromatography-mass spectrometry for comprehensive research of new psychoactive

substances, Comprehensive Analytical Chemistry, Elsevier, 2024.
[11] D. Skoog, F. Holler, T. A. Nieman, Principles of instrumental analysis, 5th ed. Harcourt College Publishers, 1998.
[12] C. Dass, Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry, John Wiley & Sons, Inc., 2006.
[13] W. M. A. Niessen, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, 3rd edition. CRC Press, 2006.
[14] B. P. dos Santos, L. Birk, V. C. Pôrto, S. N. Nascimento, V. C. Sebben, S. Eller, T. F. de Oliveira, A Sensitive and Comprehensive LC-MS/MS Method for the Analysis of Hallucinogens, Synthetic Cathinones, and Synthetic Cannabinoids in Urine Samples, *J. Mass Spectrom.* 60 (2025) e5178. https://doi.org/10.1002/jms.5178
[15] J. Ayala, S. Kerrigan, Comprehensive toxicological screening of common drugs of abuse, new psychoactive substances and cannabinoids in blood using supported liquid extraction and liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 47 (2023) 656–667. https://doi.org/10.1093/jat/bkad069
[16] Y. Yang, B. Xu, D. Li, Q. Zhan, J. Zhan, L. Yang, Y. Ye, A comprehensive LC-MS/MS method for simultaneous analysis of 65 synthetic cannabinoids in human hair samples and application to forensic investigations, *J. Forensic Leg. Med*. 101 (2024) 102636. https://doi.org/10.1016/j.jflm.2023.102636
[17] D. Fabregat-Safont, M. Barneo-Muñoz, X. Carbón, F. Hernández, F. Martinez-Garcia, M. Ventura, C. P. Stove, J. V. Sancho, M. Ibánez, Understanding the pharmacokinetics of synthetic cathinones: Evaluation of the blood–brain barrier permeability of 13 related compounds in rats, *Addict. Biol.* 26 (2021) e12979. https://doi.org/10.1111/adb.12979
[18] M. Mata-Pesquera, D. Fabregat-Safont, J. V. Sancho, M. Ibáñez, Exploiting the triple quadrupole mass analyzer for the open detection and tentative identification of synthetic cannabinoid receptor agonists based on common fragmentation pathways, *Anal. Chim. Acta*. 1329 (2024) 343226. https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.343226
[19] M. Mata-Pesquera, D. Fabregat-Safont, C. Gil, M. Ventura, F. P. Steinmetz, M. Ibáñez, Characterization of the recently detected cathinone N-cyclohexyl butylone: From structure elucidation to in silico supported pharmacological/toxicological considerations, *Microchem. J*. 190 (2023) 108577 https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108577
[20] D. Fabregat-Safont, X. Carbón, C. Gil, M. Ventura, J. V. Sancho, F. Hernández, M. Ibáñez, Reporting the novel synthetic cathinone 5-PPDI through its analytical characterization by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance, *Forensic Toxicol.* 36 (2018) 447–457. https://doi.org/10.1007/s11419-018-0422-0
[21] J. M. Matey, F. Zapata, L. M. Menéndez-Quintanal, G. Montalvo, C. García-Ruiz, Identification of new psychoactive substances and their metabolites using non-targeted detection with high-resolution mass spectrometry through diagnosing fragment ions/neutral loss analysis, *Talanta*. 265 (2023) 124816. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124816
[22] X. Diao, M. A. Huestis, New Synthetic Cannabinoids Metabolism and Strategies to Best Identify Optimal Marker Metabolites, *Front. Chem.* 7 (2019) 109. https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00109
[23] D. Fabregat-Safont, M. Mata-Pesquera, M. Barneo-Muñoz, F. Martinez-Garcia, M. Mardal, A.B. Davidsen, J. V. Sancho, F. Hernández, M. Ibáñez, In-depth comparison of the metabolic and pharmacokinetic behaviour of the structurally related synthetic cannabinoids AMB-FUBINACA and AMB-CHMICA in rats, *Commun. Biol.* 5 (2022) 161. https://doi.org/10.1038/s42003-022-03113-5
[24] R. Pelletier, D. Nahle, M. Sarr, A. Bourdais, I. Morel, B. Le Daré, T. Gicquel, Identifying metabolites of new psychoactive substances using in silico prediction tools, *Arch. Toxicol.* 99 (2025) 2953–2973. https://doi.org/10.1007/s00204-025-04049-5
[25] S. Tai, W. E. Fantegrossi, Pharmacological and Toxicological Effects of Synthetic Cannabinoids and Their Metabolites, Neuropharmacology of New Psychoactive Substances (NPS), in: Baumann, M.H., Glennon, R.A., Wiley, J.L. (eds) Neuropharmacology of New Psychoactive Substances (NPS). Current Topics in Behavioral Neurosciences, vol 32. Springer, Cham.
[26] T. Coccini, S. Vecchio, M. Crevani, U. De Simone, Cytotoxic Effects of 3,4-Catechol-PV (One Major MDPV Metabolite) on Human Dopaminergic SH-SY5Y Cells, *Neurotox. Res.* 35 (2019) 49–62. https://doi.org/10.1007/s12640-018-9924-0
[27] D. Fabregat-Safont, M. Mardal, J. V. Sancho, F. Hernández, K. Linnet, M. Ibáñez, Metabolic profiling of four synthetic stimulants, including the novel indanyl-cathinone 5-PPDi, after human hepatocyte incubation, J. *Pharm. Anal.* 10 (2020) 147–156. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.12.006
[28] Ó. J. Pozo, M. Ibáñez, J. V. Sancho, J. Lahoz-Beneytez, M. Farré, E. Papaseit, R. de la Torre, F. Hernández, Mass spectrometric evaluation of mephedrone in vivo human metabolism: identification of phase I and phase II metabolites, including a novel succinyl conjugate, *Drug. Metab. Dispos.* 43 (2015) 248–257. https://doi.org/10.1124/dmd.114.061416
[29] Y. Tang, L. Xu, J. Zhao, P. Xiang, H. Yan, Metabolism of dipentylone in zebrafish and human liver microsomes determined by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 236 (2023) 115710. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115710
[30] A. B. Godoi, N. de J. Antunes, K. F. Cunha, A. F. Martins, M. A. Huestis, J. L. Costa, Metabolic Stability and Metabolite Identification of N-Ethyl Pentedrone Using Rat, Mouse and Human Liver Microsomes, *Pharmaceutics* 16 (2024) 257. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16020257
[31] S. Watanabe, S. Baginski, T. Iwai, R. Matsushita, M. Takatsu, T. Nakanishi, K. Lindbom, C. Mckenzie, S. Vikingsson, R. Kronstrand, H. Gréen, Systematic in vitro metabolic profiling of the OXIZID synthetic cannabinoids BZO-4en-POXIZID, BZO-POXIZID, 5F-BZO-POXIZID, BZO-HEXOXIZID and BZO-CHMOXIZID, *J. Anal. Toxicol.* 47 (2023) 455–463.

https://doi.org/10.1093/jat/bkad016
[32] D. Stalberga, S. Ingvarsson, G. Bessa, L. Maas, S. Vikingsson, M. Persson, C. Norman, H. Gréen, Metabolism studies of 4′Cl-CUMYL-PINACA, 4′F-CUMYL-5F-PINACA and 4′F-CUMYL-5F-PICA using human hepatocytes and LC-QTOF-MS analysis, *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 132 (2023) 263–280. https://doi.org/10.1111/bcpt.13829
[33] S. Watanabe, H. Yamane, T. Iwai, R. Matsushita, Y. Seto, In vitro metabolic profiling of new synthetic cannabinoids, ADB-FUBIATA, AFUBIATA, CH-FUBIATA, and CH-PIATA, *Arch. Toxicol.* 97 (2023) 3085–3094. https://doi.org/10.1007/s00204-023-03605-1
[34] O. Taoussi, D. Berardinelli, S. Zaami, F. Tavoletta, G. Basile, R. Kronstrand, V. Auwärter, F. P. Busardò, Human metabolism of four synthetic benzimidazole opioids: isotonitazene, metonitazene, etodesnitazene, and metodesnitazene, *Arch. Toxicol*. 98 (2024) 2101–2116. https://doi.org/10.1007/s00204-024-03735-0
[35] A. Ameline, L. Gheddar, S. Pichini, C. Stove, F. Aknouche, C. Maruejouls, J. S. Raul, P. Kintz, In vitro characterization of protonitazene metabolites, using human liver microsomes, and first application to two urines collected from death cases, *Clin. Chim. Acta.* 561 (2024) 119764. https://doi.org/10.1016/j.cca.2024.119764
[36] M. Massano, E. Gerace, M. Borsari, M. Marti, M. Tirri, C. Ververi, E. Alladio, M. Vicenti, A. Salomone, Metabolic study of new psychoactive substance methoxpropamine in mice by UHPLC-QTOF-HRMS, *Drug. Test. Anal.* 15 (2023) 586–594. https://doi.org/10.1002/dta.3449
[37] L. Lacalle-Bergeron, D. Izquierdo-Sandoval, J. V. Sancho, F. J. López, F. Hernández, T. Portolés, Chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry in untargeted metabolomics for investigation of food (bio)markers, *TrAC – Trend Anal. Chem.* 135 (2021) 116161. https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116161
[38] L. Bijlsma, R. Gil-Solsona, F. Hernández, J. V. Sancho, What about the herb? A new metabolomics approach for synthetic cannabinoid drug testing, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 5107–5112. https://doi.org/10.1007/s00216-018-1182-8