

## ANALISIS FATTY ACID ETHYL ESTER PADA RAMBUT MENGGUNAKAN GAS CHROMATOGRAPHY- MASS SPECTROMETRY UNTUK MENDIAGNOSIS PENYALAHGUNAAN ETANOL

N. M. Suaniti<sup>1,2</sup>, I W. Wiratama<sup>1\*</sup> dan I. E. Suprihatin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Kimia, FMIPA, Universitas Udayana, Jimbaran, Badung, Indonesia.

<sup>2</sup>Departemen Kimia Terapan, Pascasarjana, Universitas Udayana, Denpasar, Bali, Indonesia

\*Email: [iwayanwiratama@hotmail.com](mailto:iwayanwiratama@hotmail.com)

---

### ABSTRAK

*Fatty acid ethyl ester* (FAEE) merupakan salah satu biomarker konsumsi etanol. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis senyawa FAEE dalam sampel rambut secara kualitatif dengan GC-MS. Pada penelitian ini dibuat campuran standar FAEE (Etil Palmitat dan Etil Oleat) 100 ppm dengan perbandingan 1:1 kemudian dibuat variasi konsentrasi. Metode validasi standar FAEE diukur menggunakan GC-MS. Sampel rambut dipreparasi dengan cara didekontaminasi kemudian diekstraksi dan diinjeksikan ke sistem GC-MS. Hasil validasi diperoleh persamaan regresi linier yaitu,  $y = 240713,507x - 147471,2353$  untuk etil palmitat dan  $y = 58361,45x + 242,5$  untuk etil oleat dengan nilai koefisien korelasi ( $r^2$ ) berturut-turut sebesar 0,9996 dan 0,9999. Batas deteksi diperoleh sebesar 2,5522 ppm dan 0,0189 ppm, dengan batas kuantitasi sebesar 8,5073 ppm dan 0,0630 ppm. Nilai koefisien variasi diperoleh sebesar 3,59% dan  $8,65 \times 10^{-4}\%$ , dengan persen perolehan kembali sebesar 100,05% dan 100,08%. Hasil analisis menunjukkan, sampel rambut semua sukarelawan mengandung etil palmitat dan etil oleat pada waktu retensi 22,03 menit dan 23,83 menit.

**Kata kunci:** *Fatty acid ethyl esters*, Etil Palmitat, Etil Oleat, Alkohol, Etanol, Biomarker, GC-MS

### ABSTRACT

*Fatty acid ethyl ester* (FAEE) is the one of ethanol consumption biomarker. The purpose of this research is to analyze qualitatively the presence of FAEE compound in hair samples by GC-MS. On this research has made mixture of FAEE standard (Ethyl Palmitate and Ethyl Oleate) 100 ppm with 1:1 ratio then variation of concentration were made. Validation method of FAEE standard were measured by GC-MS. Hair sample preparation consist of decontamination, continued by extraction and injected to GC-MS system. The validation results obtained that the linear regression equation was  $y = 240713,507x - 147471,2353$  for ethyl palmitate and  $y = 58361,45x + 242,5$  for ethyl oleate the correlation coefficient ( $r^2$ ) value respectively for 0.9996 and 0.9999. Limit of detection obtained for 2,5522 ppm and 0.0189 ppm. The limit of quantitation for 8.5073 ppm and 0.0630 ppm. The coefisien variation value obtained for 3.59% and  $8.65 \times 10^{-4}\%$ , with % recovery value for 100.05% and 100.08%. The analysis result showed that hair samples of all volunteers contain ethyl palmitate dan ethyl oleate, with the retention time at 22.00 minute and 23.83 minute.

**Keywords:** Fatty acid ethyl esters, Ethyl Palmitate, Ethyl Oleate, Alcohol, Ethanol, Biomarker, GC-MS

### PENDAHULUAN

*Fatty acid ethyl ester* (FAEE) merupakan salah satu produk hasil esterifikasi dari asam lemak dan etanol yang dapat digunakan sebagai biomarker konsumsi alkohol kronik dan sering kali digunakan sebagai alat diagnosa dalam ilmu forensik dan klinik (Crunelle *et al.*, 2014; Dumitrascu *et al.*, 2018). FAEE merupakan hasil metabolit non-oksidatif dari alkohol yang terbentuk dalam serum dan terdistribusi pada semua jaringan

setelah mengkonsumsi minuman beralkohol. Beberapa penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa FAEE positif terdeteksi dalam sampel sukarelawan yang mengkonsumsi alkohol seperti serum darah, bahkan air ketuban, (Liu *et al.*, 2018; Cabarcos *et al.*, 2018). Beberapa senyawa berbeda yang merupakan produk esterifikasi dari alkohol dengan asam lemak atau *fatty acyl-CoA* telah teridentifikasi dan dikelompokkan sebagai golongan FAEE, namun hanya empat senyawa yang terkolerasi

dengan penyalahgunaan alkohol seperti etil palmitat (E16), etil oleat (E18:1), etil stearat (E18), dan etil miristat (E14).

Berdasarkan penelitian sebelumnya yang menganalisis FAEE dalam sampel darah setelah mengkonsumsi alkohol menunjukkan bahwa konsentrasi FAEE dalam darah tikus yang telah mengkonsumsi alkohol 20%, lebih banyak terdeteksi saat 24 jam dibandingkan saat 6 jam setelah alkohol dikonsumsi. Sayangnya senyawa FAEE memiliki waktu paruh yang pendek dalam darah (<36 jam) setelah mengkonsumsi alkohol (Suaniti *et al.*, 2012), oleh karena itu dalam darah FAEE hanya bisa dideteksi langsung setelah alkohol dikonsumsi (Dasgupta *et al.*, 2015).

Beberapa dekade belakangan ini analisis pada rambut umumnya lebih digunakan untuk mendeteksi sejarah penggunaan obat (Thieme *et al.*, 2014; Maublanc *et al.*, 2014; Catterton *et al.*, 2014). Pada sampel rambut umumnya senyawa obat yang terdeteksi dalam bentuk derivatnya setelah dimetabolisme oleh tubuh. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa, senyawa obat parasetamol yang terdeteksi dalam sampel rambut adalah senyawa *acetaminophen-TMS* yang merupakan derivat dari parasetamol (Ari *et al.*, 2016). Keunggulan analisis menggunakan sampel rambut dibandingkan dengan sampel darah terletak pada keberadaan obat dalam waktu yang lebih lama (>3bulan) dibandingkan dalam darah yang hanya (<36jam), seperti halnya dengan obat-obatan, senyawa FAEE yang merupakan hasil metabolisme alkohol juga dapat terakumulasi pada rambut hingga lebih dari tiga bulan setelah mengkonsumsi alkohol (Dasgupta *et al.*, 2015). Berdasarkan uraian diatas peneliti tertarik untuk meneliti secara kualitatif senyawa FAEE dalam sampel rambut empat orang sukarelawan yang telah mengkonsumsi alkohol dalam kurun waktu satu tahun terakhir, untuk menjamin bahwa prosedur analisis yang digunakan akan memberikan hasil yang valid dan dapat dipercaya maka harus dilakukan validasi metode, seperti: linieritas, batas deteksi/LOD, batas kuantitasi/LOQ, akurasi dan presisi.

## MATERI DAN METODE

### Bahan

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol pro analisis ( $C_2H_5OH$ ), standar etil oleat ( $C_{20}H_{38}O_2$ ),

standar etil palmitat ( $C_{18}H_{36}O_2$ ), dietil eter ( $(C_2H_5)_2O$ ), aseton ( $C_3H_6O$ ), diklorometan ( $CH_2Cl_2$ ), dan akuades ( $H_2O$ ).

### Peralatan

Alat yang digunakan yaitu labu ukur 50 mL, labu ukur 10 mL, bola hisap, batang pengaduk, botol semprot, pipet tetes, pipet volume 1 mL, pipet mikro, timbangan analitik, alat sentrifugasi dan peralatan instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah instrument *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) Agilent 6980N *Network Gas Chromatography* dilengkapi dengan Agilent 5973 detektor massa dengan kolom HP-5MS 60 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m. Helium (99%) digunakan sebagai gas pembawa pada laju alir 1,3 mL/min. Sampel GC-MS diprogram sebagai berikut: mula-mula temperatur dalam oven dipertahankan pada suhu 80°C selama dua menit, kemudian ditingkatkan secara bertahap sebesar 10°C/menit hingga mencapai 290°C, dan dipertahankan selama tujuh menit sehingga diperoleh total waktu 30 menit. Suhu injektor dan *mass spectrometer* dipertahankan pada suhu 290°C dan 230°C (Catherine dan Laposata, 2003).

### Cara Kerja

#### Pembuatan Larutan Induk Standar Etil Palmitat dan Etil Oleat

Standar FAEE (larutan standar etil oleat dan etil palmitat) masing-masing ditimbang dengan teliti 50 mg dan ditempatkan dalam labu ukur 50 mL, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a hingga tanda batas. Larutan dikocok selama 3 menit sehingga didapatkan konsentrasi FAEE sebesar 1000 ppm.

#### Preparasi Larutan Standar Etil Palmitat dan Etil Oleat

Sebanyak 5,0 mL masing-masing larutan standar etil oleat dan etil palmitat dengan konsentrasi 1000 ppm dipipet, kemudian diencerkan dengan etanol p.a dalam labu ukur 50 mL hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan standar FAEE dengan konsentrasi 100 ppm kemudian diinjeksikan ke sistem GC-MS, setelah dipilih dan diperoleh kondisi kromatografi gas. Masing-masing larutan standar selanjutnya dicampur dengan perbandingan 1:1 v/v dan dibuat variasi konsentrasi dengan cara dipipet berturut-turut 0,0 mL; 1,0 mL; 2,0 mL; 4,0 mL; 8,0 mL

dimasukkan masing-masing ke dalam labu 10,0 mL dan diencerkan menggunakan etanol p.a sehingga masing-masing larutan standar diperoleh konsentrasi larutan standar yakni 0 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, dan 80 ppm kemudian diinjeksikan ke sistem GC-MS.

### Validasi Metode

#### Linieritas

Uji linieritas dilakukan dengan cara mengukur variasi konsentrasi larutan standar FAEE yakni 0 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, dan 80 ppm dengan replikasi sebanyak 3x, sehingga diperoleh kurva kalibrasi berdasarkan konsentrasi dan area (Miller dan Miller, 2010), dengan rumus:

$$y = a + bx \quad (1)$$

Keterangan:

y = Luas Puncak (*Peak Area*)

x = Konsentrasi Zat

#### Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Nilai batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) ditentukan Berdasarkan data linieritas kemudian akan diperoleh nilai standar deviasi (s). Nilai s kemudian digunakan untuk menentukan LOD dan LOQ (Miller dan Miller, 2010) menggunakan rumus:

$$LOD = \frac{3 \times s}{b} \quad (2)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (X_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3)$$

$$LOQ = \frac{10 \times s}{b} \quad (4)$$

Keterangan :

s = Standar Deviasi

$x_i$  = Konsentrasi Zat

$\bar{x}$  = Konsentrasi Rata-rata

n = Jumlah Data

b = Gradien (*Slope*)

#### Akurasi dan Presisi

Nilai akurasi ditentukan dengan mengukur campuran larutan standar 2,0 mL 100 ppm kemudian dilarutkan menggunakan etanol PA dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas sehingga didapatkan konsentrasi larutan standar 20 ppm dengan replikasi sebanyak 3x. Penentuan akurasi dilakukan

dengan menghitung persen *recovery* (Miller dan Miller, 2010), dengan rumus:

$$\%Recovery = \frac{Kons\ Terukur}{Kons\ Teoritis} \times 100\% \quad (5)$$

Presisi ditentukan dengan cara menghitung koefisien variasi (CV)nya dengan rumus:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad (6)$$

Keterangan :

s = Standar Deviasi

$\bar{x}$  = Nilai rata-rata

#### Ekstraksi Spesimen Rambut

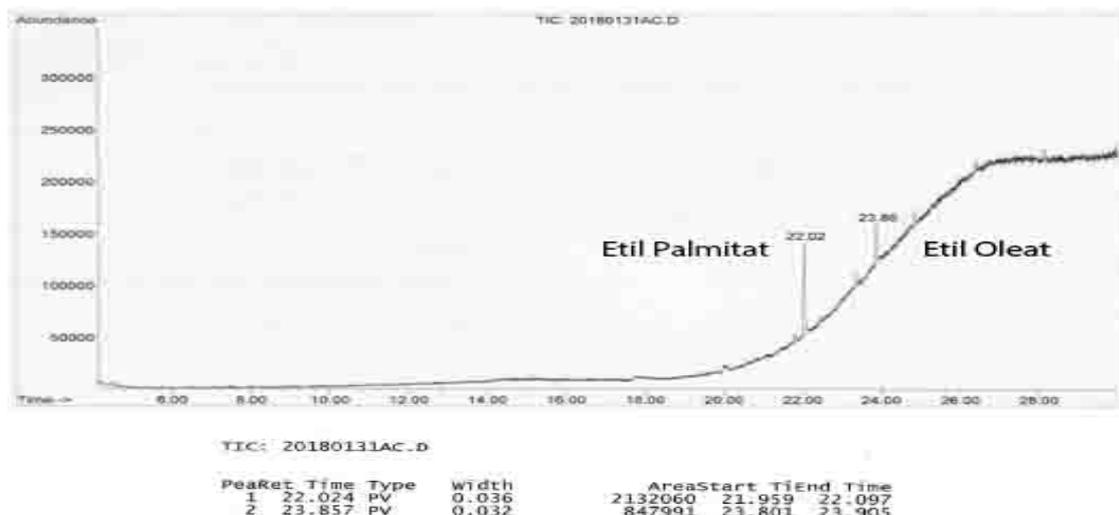
Spesimen rambut diperoleh dari empat orang sukarelawan, satu orang sukarelawan yang tidak mengkonsumsi alkohol sebagai kontrol, dan tiga orang sukarelawan lainnya diketahui mengkonsumsi alkohol dengan frekuensi konsumsi alkohol yang beragam mulai dari sukarelawan yang mengkonsumsi beberapa kali dalam setahun, beberapa kali dalam sebulan dan beberapa kali dalam seminggu. Sebanyak 150 mg specimen rambut didekontaminasi terlebih dahulu dengan dietil eter + aseton dengan perbandingan 1:1 v/v (Bossers *et al.*, 2014), kemudian diekstraksi dengan campuran diklorometan + etanol dengan perbandingan 300 $\mu$ L :1 mL v/v kemudian dilanjutkan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit, kemudian lapisan etanol diambil sebanyak 1 $\mu$ L dan diinjeksikan ke sistem GC-MS.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Analisis Standar Etil Palmitat dan Etil Oleat

Etil palmitat dan etil oleat merupakan salah satu kelompok FAEE yang telah divalidasi menggunakan kromatografi gas. Hasil analisis menunjukkan bahwa pada kromatogram blanko, puncak yang merupakan senyawa standar etil palmitat dan etil oleat tidak ditemukan, sedangkan pada larutan standar dengan pelarut etanol menunjukkan puncak tunggal senyawa etil palmitat dan etil oleat dengan waktu retensi berturut-turut 22,03 menit dan 23,86 menit, yang ditunjukkan pada Gambar 1. Berdasarkan hasil kromatogram dibawah, diperoleh pemisahan yang baik

antara standar etil palmitat dan etil oleat dengan nilai resolusi diatas 2,00.

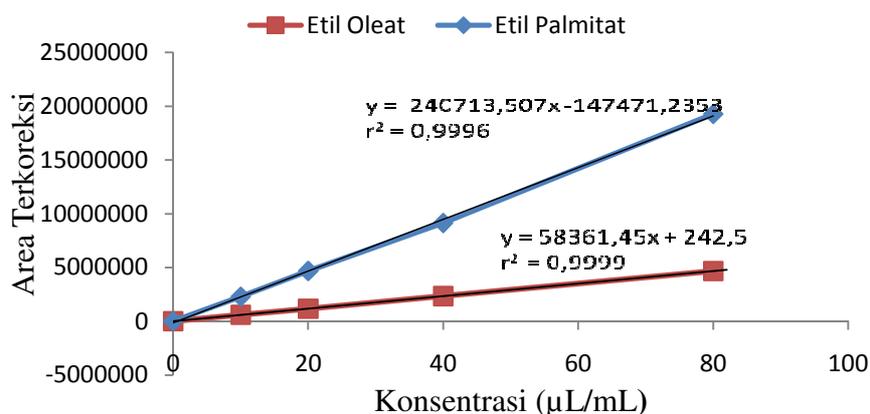


Gambar 1. Area Puncak Standar Etil Palmitat dan Etil Oleat 10 ppm menggunakan GC

Kurva Kalibrasi standar etil palmitat dan etil oleat yang ditunjukkan pada Gambar 2 diperoleh dari hasil perhitungan pengukuran larutan standar campuran dengan lima variasi konsentrasi yaitu 0 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm dan 80 ppm, sehingga diperoleh persamaan regresi  $y = 240713,507x - 147471,2353$  untuk etil palmitat dan  $y = 58361,45x + 242,5$  untuk etil oleat.

Nilai koefisien korelasi ( $r^2$ ) dari standar etil palmitat dan etil oleat berturut-turut sebesar 0,9996 dan 0,9999. Linieritas diperbolehkan jika nilai

koefisien korelasi ( $r^2$ ) yang dimiliki sebesar  $\geq 0,997$  (Gandjar dan Rohman, 2012). Nilai batas deteksi standar etil palmitat dan etil oleat dengan metode GC-MS berturut-turut diperoleh sebesar 2,5522 ppm dan 0,0189 ppm, serta untuk batas kuantitasi berturut-turut diperoleh sebesar 8,5073 ppm dan 0,0630 ppm yang berarti kromatografi gas sangat sensitif untuk mendeteksi etil palmitat dan etil oleat dalam sampel.



Gambar 2. Kurva Kalibrasi Standar Etil Palmitat dan Etil Oleat dalam Etanol p.a

Ketelitian dan ketepatan yang didapatkan menggunakan metode kurva kalibrasi ini dilakukan dengan mengukur area

terkoreksi standar etil palmitat dan etil oleat pada konsentrasi 20 ppm dengan tiga kali pengulangan. Berdasarkan hasil perhitungan

nilai koefisien variasi standar etil palmitat dan etil oleat berturut-turut diperoleh sebesar 3,59 % dan  $8,65 \times 10^{-4}$  %, uji validitas ketelitian memenuhi syarat apabila nilai CV  $\leq 2\%$  (Gandjar dan Rohman, 2012). Hasil perhitungan menunjukkan koefisien variasi standar etil palmitat melebihi syarat yang ditentukan yaitu sebesar 3,59% sedangkan koefisien variasi standar etil oleat memenuhi syarat yang ditentukan yaitu sebesar  $8,65 \times 10^{-4}\%$ . Sedangkan nilai persen perolehan kembali standar etil palmitat dan etil oleat berturut-turut didapatkan sebesar 100,05% dan 100,08%. Nilai *%recovery* yang dapat diterima untuk pengukuran analit berada pada rentang 80% hingga 110% menunjukkan tingkat akurasi yang baik (AOAC, 1998).

### Analisis Senyawa FAEE Sampel Rambut

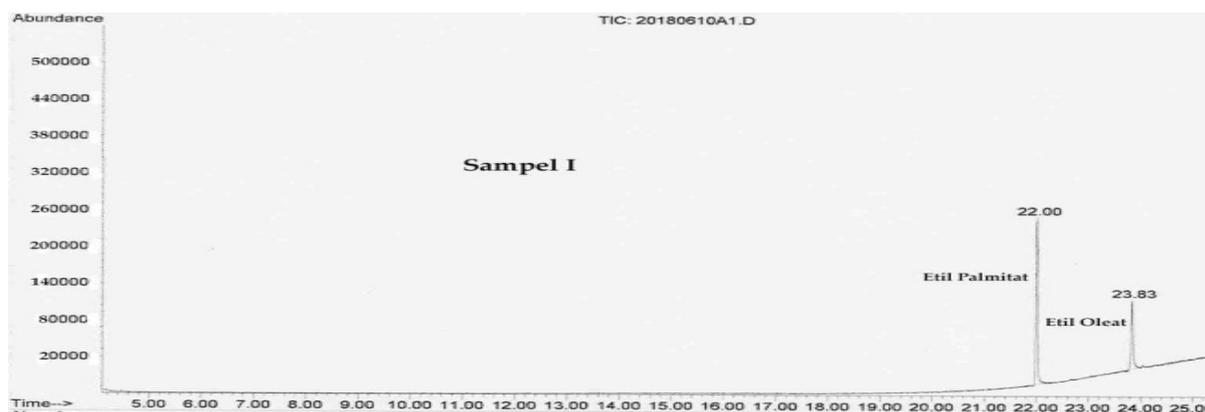
Analisis pada rambut dilakukan pada 4 orang sukarelawan yang diketahui telah mengkonsumsi alkohol selama satu tahun terakhir, kemudian specimen rambutnya diambil sepanjang 3 hingga 5 cm sebanyak 150 mg untuk dianalisis. Dalam penelitian ini semua sampel rambut menunjukkan hasil positif (+) terhadap etil palmitat dan etil oleat, dengan waktu retensi berturut-turut sebesar 22,00 dan 23,83 menit. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Dumitrascu *et al* (2018) dan Kintz (2014) menyebutkan bahwa kontaminasi eksternal yang berasal dari produk perawatan rambut yang mengandung

10% etanol, atau pelembab rambut yang mengandung 62,5% etanol dapat menyebabkan terjadinya sintesis FAEEs pada rambut, demikian pula dengan penggunaan *hair spray* atau *lotion* rambut, yang terjadi pada sampel IV (kontrol) dicurigai terjadi karena faktor eksternal ini. Adanya faktor eksternal ini memberikan konsentrasi tambahan pada senyawa etil palmitat dan etil stearat pada rambut, sehingga menyebabkan konsentrasi yang terukur sedikit lebih banyak dibanding yang sebenarnya

Ditinjau dari ion fragmentasi dan *Library C / Database 02 \ NIST14.L* menunjukkan keberadaan senyawa etil palmitat dan etil oleat (kromatogram salah satu sampel rambut sukarelawan disajikan pada Gambar 3). Sedangkan etil miristat dan etil stearat tidak terdeteksi pada instrumen GC-MS. Tidak terdeteksinya etil miristat dan etil stearat kemungkinan disebabkan karena kadarnya lebih rendah dibandingkan etil palmitat dan etil oleat dalam spesimen rambut, hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa etil miristat dan etil stearat memiliki kadar rata-rata pada sampel rambut  $\pm 0,045$  ng/mg sedangkan untuk etil palmitat dan etil oleat memiliki kadar rata-rata sebesar  $\pm 0,05$  ng/mg (Pragst *et al.*, 2001), sehingga mudah tereduksi atau teroksidasi selama proses analisis dalam GC-MS (Bossers *et al.*, 2014).

Tabel 1. Hasil Analisis Sampel Rambut

Sukarelawan	Hasil Analisis (+)/(-)		Keterangan
	Etil Palmitat	Etil Oleat	
I	(+)	(+)	Etil Palmitat & Etil Oleat
II	(+)	(+)	Etil Palmitat & Etil Oleat
III	(+)	(+)	Etil Palmitat & Etil Oleat
IV (Kontrol)	(+)	(+)	Etil Palmitat & Etil Oleat



Gambar 3. Kromatogram Salah Satu Sampel Rambut Sukarelawan

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Senyawa golongan FAEEs yang dapat terdeteksi pada sampel rambut dengan menggunakan GC-MS adalah etil palmitat dan etil oleat yang memiliki waktu retensi berturut-turut sebesar 22,00 dan 23,83 menit, sedangkan etil miristat dan etil stearat tidak terdeteksi pada instrumen GC-MS

### Saran

Perlu dilakukan uji kuantitatif terhadap kadar senyawa golongan FAEE pada sampel rambut untuk mengetahui hubungan antara frekuensi konsumsi terhadap kadar FAEE dalam sampel rambut dan perlakuan dalam penggunaan produk perawatan rambut.

## DAFTAR PUSTAKA

- AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). 1998. Official Method of Analysis of AOAC International 20<sup>th</sup> ed. AOAC International, MD, Gaithersburg.
- Ari G D., K, Basori A., Suaniti N. M. 2016. Pengembangan metode GC-MS untuk penetapan kadar acetaminophen pada specimen rambut manusia. *Jurnal Biosains Pascasarjana*. 18(3): 64-79.
- Bossers L. C.A.M., Paul, R., Berry, A.J., Kingston, R., Middendorp, C., Guwy, A.J. 2014. An evaluation of washing and extraction techniques in the analysis of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters from hair samples. *Journal of Chromatography B*. 953-954 (6): 115-119.
- Cabarcos P, Tabernero M.J, Otero J.L, Miguez M, Barmejo A.M, Martello S, Giovanni N.D, Chiarotti M. 2014. Quantification of Fatty Acid Ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in meconium for detection of alcohol abuse during pregnancy: correlation study between both biomarkers. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 100(13): 74-78.
- Catherine A.B, Laposata M. 2003. Fatty Acid Ethyl Esters: Toxic Non-Oxidative Metabolites of Ethanol and Markers of Ethanol Intake. *Frontiers in Bioscienc*. 8(1): 202-217.
- Catterton C, Kintz P. 2014. Hair analysis to demonstrate administration of amitriptyline, temazepam, tramadol and dihydrocodeine to a child in a case of kidnap and false imprisonment. *J. Forensic Legal Med*. 23(3): 26-31.
- Crunelle C, Yegles M, van Nuijs A., 2014. Hair ethyl glucuronide levels as a marker for alcohol use and abuse: a review of the current state of the art. *Drug Alcohol Dep*. 134(1): 1—11.
- Dasgupta, A. 2015. *Alcohol and its Biomarker: Clinical aspects and laboratory determination* (pp. 202-207). Houston. United State of America: Clinical aspects and laboratory determination of biomarkers series Vol. 1
- Dumitrascu C, Raul R, Kingston R, Williams R. 2018. Influence of alcohol containing and alcohol free cosmetics on FAEE concentration in hair, a performance evaluation of ethyl palmitate as sole marker, versus the sum of four FAEEs.

- Forensic Science International*. 283(2): 29-34.
- Gandjar, G dan Rohman. 2012, *Analisis obat secara spektrometri dan kromatografi*. Pustaka Pelajar,; Jakarta.
- Liu Y, Zhang X, Li J, Huang Z, Lin Z, Wang J, Zhang C, Rao Y. 2018. Stability of ethyl glucuronide, ethyl sulfate, phosphatidylethanol, and fatty acid ethyl esters in postmortem human blood. *Analytical Toxicology*. 42(5): 346-352.
- Maublanc J, Dulaurant S, Imbert L, Kintz P, Gaulier JM. 2014. Unusual pattern in hair after prazepam exposure. *Toxicol Anal Clin*. 26(2): 24-6.
- Miller, J.N., Miller, J.C. 2010. *Statistic for analytical chemistry* 6<sup>th</sup> ed. pp. 18-19. Pearson Education Limited.
- Pragst, F., Auwaerter V., Spokert F., dan Spiegel K.. 2001. Analysis of Fatty Acid Ethyl Esters in Hair as Possible Markers of Chronically Elevated Alcohol Consumption by Headspace Solid-Phase Microextraction (HS-SPME) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). *Forensic Science International*. 121(1): 76-88.
- Suaniti N.M, Djelantik G.S, Suastika K, Astawa I.N.M. 2012. Validation of analysis fatty acid ethyl esters as biomarkers of ethanol administration. *Journal of Medicine and Medical Sciences*. 3(5): 330-333.
- Thieme D, Sachs H, Uhl M. 2014. Proof of cannabis administration by sensitive detection of 11-ndrDelta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using selective methylation and application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal*. 6(3): 112-8.