

**Desirèe Moya Rodríguez.**

# **Preconcentración y separación enantiomérica de cationas por electroforesis capilar.**

---

**TRABAJO FINAL DE GRADO**

**Dirigido por la Dra. Carme Aguilar Anguera**

**Grado en Química**



**Tarragona. Julio de 2016**



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	5
<b>1.1. Drogas de abuso: Catinonas.</b>	5
<b>1.2. Separación de catinonas mediante electroforesis capilar.</b>	7
1.2.1. Selectores quirales para la separación enantiomérica de catinonas.	9
• Ciclodextrinas.	9
• Líquidos iónicos.	11
<b>1.3. Técnica de preconcentración electroforética: <i>field-amplified sample injection</i>(FASI).</b>	12
<b>2. OBJETIVO.</b>	13
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL.</b>	13
<b>3.1. Reactivos y patrones.</b>	14
3.1.1. Toxicidad.	14
<b>3.2. Instrumentación.</b>	15
<b>3.3. Procedimiento FASI-CE.</b>	15
<b>3.4. Estudio económico.</b>	16
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	19
<b>4.1. Separación electroforética aquiral.</b>	19
<b>4.2. Separación electroforética enantiomérica con ciclodextrinas.</b>	20
<b>4.3. Separación electroforética enantiomérica con líquidos iónicos.</b>	22
<b>4.4. Estudio de la técnica de preconcentración electroforética: FASI.</b>	25
4.4.1. Tipo de <i>solvent plug</i> para la técnica de preconcentración.	25
4.4.2. Composición de la muestra.	28
4.4.3. Tiempo de inyección del <i>solvent plug</i> .	29
4.4.4. Voltaje y tiempo de inyección de la muestra.	30
4.4.5. Estudio factor de preconcentración.	33
<b>4.5. Estudio de la linealidad del método.</b>	33
<b>5. CONCLUSIONES.</b>	34
<b>6. REFERENCIAS.</b>	34
<b>7. COMPETENCIAS ADQUIRIDAS.</b>	39

## ABSTRACT

In this work we have focused in the preconcentration and separation of six cathinone compounds (3,4-Dimethylmethcathinone, 4-Methylethylcathinone,  $\alpha$ -PVP, Mephedrone, Methylone y 3,4-Methylenedioxypropylvalerone), by using field-amplified sampling injection (FASI), as in-line preconcentration strategy combination with CE. Firstly we have focused in the enantiomeric separation of the analytes and for that different chiral additives were tested by adding them in the background electrolyte (BGE). In particular the best resolution between all the enantiomers was achieved by adding a mixture of two cyclodextrins (CDs), in particular 5 mM of HP- $\beta$ -CD and 5 mM  $\beta$ -CD. Moreover, the effect of adding different ionic liquids (IL) as 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate and 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate was also evaluated. Secondly, in order to improve the limited sensitivity inherent to CE, we evaluated the use of an in-line electrophoretic preconcentration strategy, in particular FASI for that, different parameters which can have an effect on the preconcentration were tested as the nature and amount of solvent plug or the sample injection conditions. The best results were obtained using an hydrodynamic injection of MeOH/H<sub>2</sub>O 25/75 as a solvent plug, at 50 mbar during 5 seconds and an electrokinetic injection of the sample dissolved in water, using 13 kV during 5 seconds. Under these conditions the preconcentration factors were found to be +30 kV , 25°C during 35 minutes.

## 1. INTRODUCCIÓN.

Las drogas recreativas se han utilizado durante años para lograr estimular el sistema nervioso central (CNS) produciendo efectos diversos, desde débiles estados de euforia hasta efectos más graves como problemas de delirio. Algunas de ellas derivan de plantas tales como: la coca (*Erythroxylum coca*), khat (*Catha edulis*), el cannabis (*Cannabis sativa*).

No obstante, en los últimos años ha tenido lugar un aumento en la producción de un gran número de drogas sintéticas en laboratorios clandestinos. Entre este tipo de drogas cabe citar los derivados sintéticos de la catinonas, el abuso de las cuales se ha extendido notablemente, incrementándose 20 veces más el consumo entre 2010 y 2011<sup>[1]</sup>. Este aumento se ha producido por una parte debido a los efectos eufóricos y a la capacidad de estas drogas para mimetizar y representar una alternativa legal a las drogas ilegales ya establecidas (tales como la anfetamina (*speed*), la metanfetamina (cristal), y la metilendioximetanfetamina (éxtasis), que pertenecen a distintas familias como los cannabinoides, las catinonas, las fenetilaminas, las anfetaminas y las triptaminas, todas ellas conocidas por sus efectos psicoactivos), y por otra parte a la fácil adquisición de éstas, ya que se comercializan generalmente por internet con el nombre de “sales de baño” (*bath salts*)<sup>[2]</sup>. Además, cabe señalar que el consumo excesivo de estos compuestos ha desencadenado en un aumento de los casos de sobredosis y de los efectos secundarios perjudiciales para la salud.

Todo ello ha provocado que se despierte en la comunidad científica un gran interés en el desarrollo de diferentes métodos que posibiliten la determinación de este tipo de drogas en muestras biológicas, como en orina, sangre y cabello. En este sentido, el presente trabajo tiene como objetivo profundizar en este tema a través del desarrollo de un método que permita la determinación de este nuevo tipo de drogas sintéticas, las catinonas.

La memoria del trabajo está dividida en dos bloques. El primero de ellos está enfocado a la parte más teórica donde se hace una introducción en la que se describe básicamente, la importancia y las características de las catinonas estudiadas, así como, se realiza una revisión bibliográfica de la separación de estas drogas mediante la técnica de electroforesis capilar (CE). También se describe como se lleva a cabo la técnica de preconcentración electroforética *field-amplified sample injection*. Después de detallar el objetivo de trabajo, el segundo bloque corresponde a la descripción de la parte experimental del mismo y la presentación de los principales resultados obtenidos. Finalmente se detallarán las conclusiones derivadas de la realización de la investigación.

### 1.1. Drogas de abuso: Catinonas.

Las catinonas constituyen una gran familia de derivados sintéticos de las beta-ceto fenilalquilaminas, concretamente de la *phenylethylamine (2-amino-1-phenil-1-propanone)*<sup>[3]</sup> también conocida como catinona, cuya estructura se muestra en la *Figura 1*. Este compuesto es un alcaloide monoamínico natural, el principal psicoestimulante presente en las hojas del arbusto

*Khat* (*Catha edulis*), que fue descubierto en *Yemen* por *Peter Forsk* en el siglo XVIII y que ha sido utilizado durante años con fines terapéuticos y alimentarios.

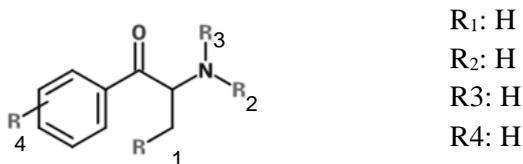
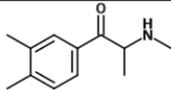
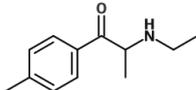
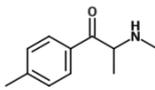
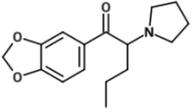
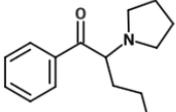
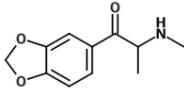


Figura 1. Estructura principal de la catinona.

A partir de este compuesto natural, se obtienen por la modificación de los diferentes sustituyentes de la catinona las llamadas catinonas sintéticas. Éstas presentan, en general, una estructura cíclica aromática conteniendo cuatro puntos de sustitución, teniendo en cuenta la molécula de la catinona; en el carbono vecino al carbono en posición alfa (R1), en el átomo de nitrógeno (R2 y R3), y en el grupo fenilo (R4). Estos cuatro sustituyentes pueden ser diversos tales como: *alkyl*, *alkoxy*, *alkylenedioxy*, *haloalkyl*, *halide* y *phenil*.

En el presente trabajo se estudiarán seis catinonas sintéticas concretamente *α-Pyrrolidinovalerophenone*, *3,4-Dimethylmethcathinone*, *3,4-Methylenedioxypropylvalerone*, *4-Methylethylcathinone*, *Mephedron* y *Methylone*. En la Tabla 1 se muestran las estructuras de estas catinonas.

Tabla 1. Estructura para las seis catinonas utilizando la estructura genérica de la catinona (Figura 1.).

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
	H	CH <sub>3</sub>	H	2(CH <sub>3</sub> )
	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	CH <sub>3</sub>
	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>			
	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>		H	
	H	H	CH <sub>3</sub>	



En general, para las catinonas incluidas en este estudio, aunque la presencia del grupo beta-ceto hace aumentar la polaridad respecto a por ejemplo las anfetaminas y hace que se reduzca la capacidad de éstas para cruzar la barrera de sangre-cerebro, se produce una interacción con los transportadores de la membrana plasmática y promueven la liberación de noradrenalina, serotonina y dopamina e inhiben la captación de estos compuestos en el sistema nervioso y periférico, simulando los efectos de la hormona epinefrina (adrenalina) y del neurotransmisor norepinefrina (noradrenalina)<sup>[4]</sup>. Así, las catinonas sintéticas están consideradas como drogas estimulantes.

Por lo que respecta a las características físicoquímicas más relevantes de los seis analitos de interés, éstas se muestran en la Tabla 2. En ella se muestran los diferentes nombres químicos por los que se les puede conocer, la masa molecular de cada uno de ellos como su número de identificación (CAS). Por otro lado, se muestran parámetros tales como el pKa y la solubilidad que presentan estos compuestos.

Tabla 2. Propiedades físicoquímicas para las 6 catinonas de interés.

Nombre común	3,4-DMMC <sup>[6]</sup>	4-MECHCl <sup>[5][6]</sup>	PVP (α-PVP) <sup>[5][6]</sup>	Mephedrone <sup>[6][7]</sup>	MDPV <sup>[8][6]</sup>	Methylone <sup>[9][6]</sup>
Nombre químico	3,4-Dimethylmethcathinone Hydrochloride	4-Methyl-N-ethylcathinone Hydrochloride Methylethcathinone Hydrochloride 4-Methylethcathinone Hydrochloride	α-Pyrrolidinovallero-phenone	4'-Methylmethcathinone <sup>[6]</sup> ; (RS)-2-methylamino-1-(4-methylphenyl)propan-1-one <sup>[7]</sup> 4-MMCHCl	3',4'-Methylenedioxy-alfa-pyrrolidinovallero-phenone <sup>[8]</sup> ; 3,4-Methylenedioxyvalerone HCl (RS)-1-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one <sup>[7]</sup>	3',4'-Methylenedioxymethcathinone <sup>[9]</sup> ; (±)-2-methylamino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)propan-1-one <sup>[4]</sup>
Fórmula molecular	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO·HCl	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO·HCl	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO·HCl	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO·HCl	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub> ·HCl	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub> ·HCl
CAS	1081772-06-6	1266688-86-1	5485-65-4	1189726-22-4	1246820-09-6	186028-80-8
Peso molecular (g/mol)	227,73	227,73	267,80	213,70	275,343	243,69
pKa	8,3	7,82	8,1	7,41	8,41	7,74
Solubilidad en agua	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble

Las catinonas presentan un centro estereogénico lo que permite la existencia de un par de enantiómeros de manera que estos compuestos están presentes en forma de mezcla racémica, mostrando dos isoformas, conformación S y R<sup>[10]</sup>. El par de enantiómeros difieren en la farmacodinámica y propiedades farmacocinéticas resultantes en diversas actividades farmacológicas y toxicológicas, pudiendo seguir diferentes rutas metabólicas en el organismo vivo y por tanto produciendo un efecto farmacológico distinto siendo más o menos violento según del enantiómero del que se trate. Esta cuestión hace que la enantioseparación de las nuevas drogas sea un tema de gran interés científico.

## 1.2. Separación de catinonas mediante electroforesis capilar.

Debido a la importancia que presenta la investigación de la toxicidad de las catinonas sintéticas y los efectos derivados de estos compuestos, se han desarrollado diferentes métodos analíticos para su determinación en diferentes tipos de muestras biológicas tales como orina,



plasma o cabello. En estos métodos se utilizan técnicas cromatográficas tales como la cromatografía líquida (LC)<sup>[11]</sup> y la cromatografía de gases (GC)<sup>[12]</sup>, aunque también existen algunos estudios en los que la técnica empleada es la electroforesis capilar<sup>[13]</sup>.

En los estudios citados se lleva a cabo la determinación de estas drogas sin distinguir entre enantiómeros. No obstante, existe un gran interés en su determinación enantiomérica, debido al efecto diferente que cada enantiómero puede tener sobre el cuerpo humano. En este campo destacan sobre todo las técnicas cromatográficas, como la cromatografía líquida, aunque hay que resaltar que la electroforesis capilar presenta algunas ventajas para la separación de enantiómeros respecto a la LC. La separación quiral por LC requiere la utilización de columnas cromatográficas de características quirales, las cuales presentan un elevado coste económico. En cambio en CE se puede obtener la separación de los enantiómeros añadiendo simplemente un selector quiral a la solución electrolítica. Otras ventajas en cuanto a la utilización de la CE son el pequeño volumen de muestra y disolventes que se requieren, los tiempos cortos de análisis y la elevada resolución<sup>[14-15]</sup>.

Por todo ello, en este estudio se ha trabajado con la técnica de electroforesis capilar, una técnica muy versátil, basada en la diferencia de movilidad electroforética de los iones en medios electroforéticos en el interior del capilar bajo la influencia del campo eléctrico de corriente continua, creada cuando se aplica un voltaje a través del capilar. En la Figura 2 se muestra un esquema general de un equipo de CE. En ésta se puede ver que el sistema está formado por un capilar de sílice fundida (de entre 10 a 100 cm de longitud y con un diámetro entre 20 y 100  $\mu\text{m}$ ), los extremos del capilar se sumergen en una solución electrolítica que será el medio de separación (denominado BGE, *background electrolyte*). Esta solución actúa como conductora de la corriente eléctrica y controla la carga de las sustancias a analizar. Los electrodos, que son de platino, están conectados por las dos terminaciones del capilar con una fuente de alimentación de alta tensión, proporcionando voltajes de entre 1 a 100 kV. El sistema se completa con el detector, que proporciona una respuesta que pasa posteriormente a un sistema de adquisición de datos. La representación gráfica obtenida es un electroferograma.

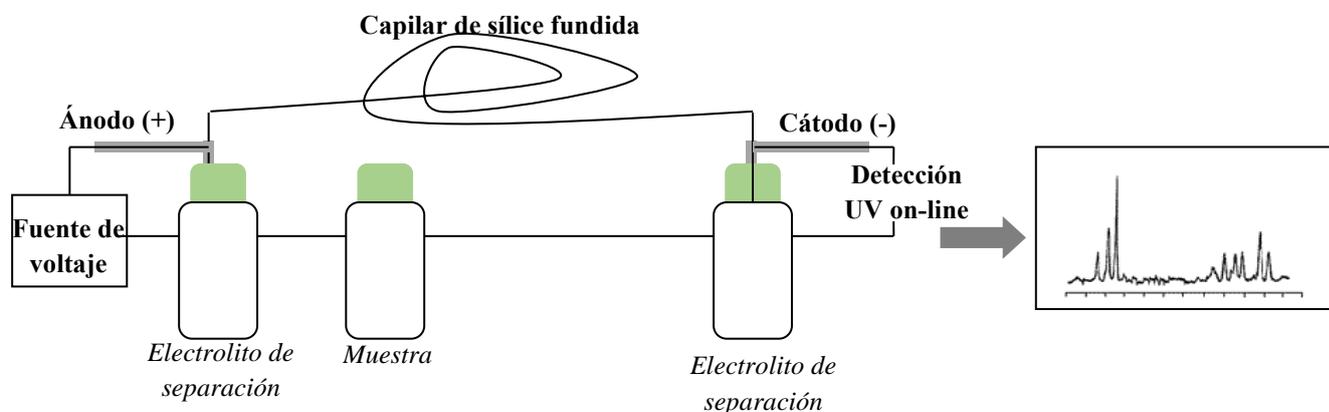


Figura 2. Esquema general de un equipo de CE.



De entre las diferentes modalidades de la CE, la electroforesis capilar por zonas (CZE)<sup>[16]</sup>, es la modalidad más utilizada para la separación electroforética de cationas debido a su simplicidad operacional y a su versatilidad. Si bien otras modalidades tales como la electroforesis capilar en gel<sup>[17]</sup> (CGE), electrocinética micelar (MEKC)<sup>[18]</sup> e isotacoforesis (ITP)<sup>[19]</sup> también han sido utilizadas.

En términos generales la CZE, es una técnica útil para la separación de compuestos cargados, ya que su mecanismo de separación se basa en las diferentes relaciones masa/carga y en las diferencias de movilidad electroforética de los analitos en el interior del capilar. En este caso, los analitos cargados positivamente, se desplazarán por el movimiento electrolítico generado en el capilar hacia el cátodo. Además en este caso para conseguir la separación quiral se ha requerido una solución electrolítica a pH ácido para que así los analitos estuviesen cargados positivamente y poderse separar por esta modalidad.

Teniendo en cuenta el fundamento de la técnica, en el apartado 1.3, se detalla cómo se consigue la separación enantiomérica para las cationas.

### **1.2.1. Selectores quirales para la separación enantiomérica de cationas.**

La separación quiral en CZE, tiene lugar al adicionar un selector quiral en el electrolito de separación. Hay una gran cantidad de selectores tales como: las micelas quirales, los éteres corona, los ligandos quirales, oligo- y polisacáridos, los antibióticos macrocíclicos, las ciclodextrinas y los derivados de estas, como también los líquidos iónicos.

Los selectores permiten una asociación diastereomérica temporal, entre el analito y el selector, y así, se pueda diferenciar entre enantiómeros, debido a que si no fuese por esta interacción los miembros del par enantiomérico serían indistinguibles por lo que respecta a la relación masa/carga.

Uno de los selectores más utilizados son las CD, aunque en este trabajo debido a la importancia reciente que presentan, también se han considerado los líquidos iónicos. En los párrafos anteriores se comentan algunas características principales de ambos tipos de selectores quirales.

- **Ciclodextrinas.**

Las ciclodextrinas son ciclos oligosacáridos compuestos por diferente número de unidades de D-glucosa, las cuales están conectadas en una estructura de anillo por enlaces alfa (1,4')-glucosídicos. Se pueden encontrar dos tipos de CDs principales: las ciclodextrinas nativas, las cuales no tienen ningún tipo de sustituyente; y las ciclodextrinas substituidas, las cuales tienen distintos sustituyentes con diferentes propiedades, dando ciclodextrinas neutras o CDs cargadas en función de si pertenecen a un tipo u otro.

Las ciclodextrinas son compuestos con forma de anillo con una parte interior relativamente hidrofóbica, pero una parte exterior principalmente hidrofílica debido a la presencia de grupos hidroxilos. La estructura química genérica de las ciclodextrinas se muestra en la Figura 3.



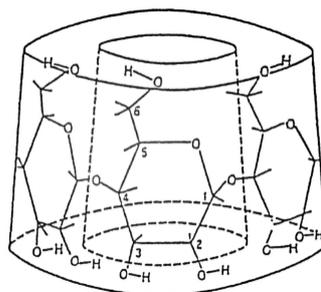


Figura 3. Estructura general de las ciclodextrinas

Aunque existen CDs de muy diferentes características, únicamente las llamadas CDs nativas que contienen 6, 7 o 8 glucosas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -CD respectivamente), son utilizadas activamente en química analítica. Cada una de ellas presenta propiedades físicoquímicas diferentes como el tamaño del anillo, la solubilidad, la masa molecular, el diámetro interno y externo de la cavidad. En la Tabla 3<sup>[23]</sup> se muestran estas características para  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD.

Tabla 3. Propiedades físicoquímicas y estructurales para las CDs nativas.

	Tipo de CDs		
	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
<b>Nº de glucosas</b>	6	7	8
<b>Masa molecular</b>	972	1135	1297
<b>Diámetro interno de la cavidad (Å)</b>	5,7	7,8	9,5
<b>Diámetro externo de la cavidad (Å)</b>	13,7	15,3	16,9
<b>Solubilidad en H<sub>2</sub>O (%p/v 25°C)</b>	14,5	1,85	23,2
<b>pK<sub>a</sub></b>	12,33	12,20	12,08

Aparte de las CDs comentadas, se utilizan otros tipos de derivados de las CDs en la técnica de CE para conseguir separaciones quirales. Por ejemplo, se pueden encontrar ciclodextrinas no cargadas que tienen grupos tan diferentes como metilos, hidroxietilos, hidroxipropilos o acetilos, como es un ejemplo la HP- $\beta$ -CD, como también ciclodextrinas cargadas que tienen grupos metil-amino, sulfobutiléteres, carboxilometilo, sulfato, etc. Una de las CDs derivadas más utilizadas es la ciclodextrina sulfatada, *Sulfated- $\beta$ -CD* (S- $\beta$ -CD), que se caracteriza por contener sustituyentes sulfato que hacen que toda la estructura adquiera una carga negativa.

Las CDs pueden interactuar enantioselectivamente con una molécula quiral durante la migración del compuesto de interés por el capilar, haciendo que debido a las interacciones que se producen, tenga lugar una interacción mayor con uno de los dos enantiómeros, variando así la movilidad electroforética de los analitos y consecuentemente se puede conseguir su separación. La estabilidad de los complejos formados está gobernada por factores como interacciones Van-der-Waals, efectos de solvatación y puentes de hidrógeno. La interacción entre el selector quiral y el analito es clave para que tenga lugar la separación con enantioresolución. Ésta se puede ver afectada por diversos factores, tales como la concentración y el pH del electrolito,



la composición de la solución electrolítica (BGE) y la temperatura en el capilar. Estos parámetros generalmente son optimizados con el fin de mejorar la enantioseparación<sup>[24]</sup>.

En la bibliografía se utilizan algunas de las ciclodextrinas citadas con anterioridad. Como ejemplo, Mohr et al.<sup>[25]</sup>, utiliza la técnica de electroforesis capilar por zonas para la separación quiral de 19 catinonas derivadas utilizando CD nativas ( $\alpha$  y  $\beta$ -CD) y una ciclodextrina sulfatada (S- $\beta$ -CD). Los mejores resultados se obtienen utilizando 20 mg/mL de la CD sulfatada en una solución tampón de 50 Mm de acetato de amonio a pH= 4,5.

Otro ejemplo en la aplicación de las CD como selectores quirales es el estudio que presenta Merola et al.<sup>[26]</sup> realiza un trabajo donde estudia la separación quiral de 12 catinonas utilizando como selector quiral la  $\beta$ -CD un tiempo de análisis menor de 18 minutos.

- **Líquidos iónicos.**

El término “líquido iónico”, es utilizado para describir la clase de sales con puntos de fusión por debajo de 100°C. Los IL están compuestos completamente por iones, y generalmente están formados por un catión orgánico voluminoso (*alkylimidazolium* (Im); *pyridinium* (Pyr), o *pyrrolium* (Pyrrol); y *ammonium* (N) o *phosphonium* (P)) y un anión orgánico (*trifluoroacetate* ( $\text{CF}_3\text{COO}^-$ ), *triflate* ( $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ ) o *acetate* ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ )), o inorgánico (*bromide* ( $\text{Br}^-$ ); *chloride* ( $\text{Cl}^-$ ), *nitrate* ( $\text{NO}_3^-$ ); *perchlorate* ( $\text{ClO}_4^-$ ), *tetrafluoroborate* ( $\text{BF}_4^-$ ) o *hexafluorophosphate* ( $\text{PF}_6^-$ ))<sup>[27]</sup>.

Los líquidos iónicos tienen una baja volatilidad y presión de vapor, una alta conductividad y estabilidad térmica y finalmente una habilidad para disolver diferentes clases de compuestos orgánicos y metales iónicos. Algunas de las propiedades dependen del anión, y otras dependen de la longitud de la cadena del alquilo en el catión, de la forma o de la simetría<sup>[28]</sup>.

Los CIL están siendo utilizados en diversos campos para la separación enantiomérica. Algunas de las técnicas en las que éstos son aplicados son la cromatografía líquida<sup>[29]</sup>, la cromatografía de gases<sup>[30]</sup>, como también en la electroforesis capilar<sup>[31]</sup>, siendo éste último el campo más utilizado.

En la bibliografía aun que no se han encontrado artículos en los que se adicionen los líquidos iónicos como selectores quirales para la separación enantiomérica de las catinonas, a continuación se muestran algunos ejemplos en los que sí se utilizan para la separación de diversas drogas.

Francois et al.<sup>[32]</sup> demuestra la habilidad quiral que los líquidos iónicos quirales tienen, utilizando dos CILs *ethyl* y *phenylcholine bis* (*trifluorometilfulfonil*)imida, EtCholNTf<sub>2</sub>, PhCholNTf<sub>2</sub>.

También Liu et al.<sup>[33]</sup>, investiga la enantioselectividad del tetramethylammonium L-hydroxyproline, para la separación enantiomérica de aminoácidos aromáticos (*tryptophan*, *3,4-dihydroxyphenylalanine*, *phenylalanine*, and *histidine*) utilizando la técnica MEKC.



### 1.3. Técnica de preconcentración electroforética: *field-amplified sample injection* (FASI).

La técnica de electroforesis es conocida por presentar una baja sensibilidad. Esto se puede deber a que la técnica presenta principalmente dos limitaciones: por un lado la poca cantidad de muestra inyectada y por otro lado el pequeño camino óptico. Estas limitaciones están relacionadas con la reducida dimensión del capilar, generalmente 25-150 ID micras y 40-80 cm de longitud, cuando se utiliza un detector UV-visible, el más ampliamente utilizado.

Para poder llegar a límites de detección más bajos y así obtener una mejora en la sensibilidad, diversos autores han estudiado la aplicación de técnicas de preconcentración electroforéticas en línea. Estas técnicas se basan en la introducción de un gran volumen de muestra en el capilar y la posterior preconcentración de la misma en una banda estrecha al inicio del capilar. Existen diferentes técnicas que se han aplicado exitosamente para superar la limitación de la baja sensibilidad tales como: *Field-amplified sample injection* (FASI)<sup>[34]</sup>, *Large-volume sample stacking* (LVSS)<sup>[35]</sup>, *Isotachopheresis* (ITP)<sup>[36]</sup>. En este caso, la técnica escogida, debido a su elevada simplicidad a la hora de llevarla a cabo, ha sido la técnica de preconcentración FASI.

La llamada *field-amplified sample injection*, es una de las técnicas de preconcentración electroforéticas más populares y simples, que fué introducida por Mikkers<sup>[37][38]</sup>. En la Figura 4 se muestra un esquema de esta técnica.

La técnica FASI consiste inicialmente en una inyección hidrodinámica (aplicando presión durante un cierto tiempo) de un pequeño volumen de una solución que se denomina *solvent plug*, que es una solución que presenta una baja conductividad, 4A. El objetivo principal al añadir una solución con baja conductividad, es que ésta sea menor que la que presenta la solución electrolítica de separación (BGE). Cuanto menor sea la conductividad del *solvent plug*, al aplicar una diferencia de potencial mayor será el campo eléctrico al inicio del capilar y por lo tanto la velocidad del ión será mayor en esta solución. Seguidamente tiene lugar la inyección electrocinética de la muestra en una solución de baja conductividad (aplicando una diferencia de voltaje durante un tiempo específico) 4B. En la inyección electrocinética la introducción de los analitos en el capilar depende de la carga y la movilidad de los analitos. Por ello, mientras la cantidad de analitos iónicos introducida en el capilar aumenta, la de aquellos analitos que no poseen carga disminuye. Al aplicar una diferencia de potencial, para que tenga lugar la separación de los analitos, la baja conductividad del *solvent plug* hace que la velocidad de los iones de la muestra (positivos en este caso) sea mayor en *solvent plug* que en el BGE, 4C. Todo ello se traduce en un aumento de la cantidad inyectada, y en la concentración de los analitos en la zona de separación entre *solvent plug* y solución electrolítica, creándose una banda más estrecha “stacking”, 4D. Para conseguir este efecto de preconcentración generalmente se utilizan para el *solvent plug* y la composición de la muestra agua, ácidos débiles a bajas concentraciones o compuestos orgánicos puros o en diferentes proporciones de volumen.



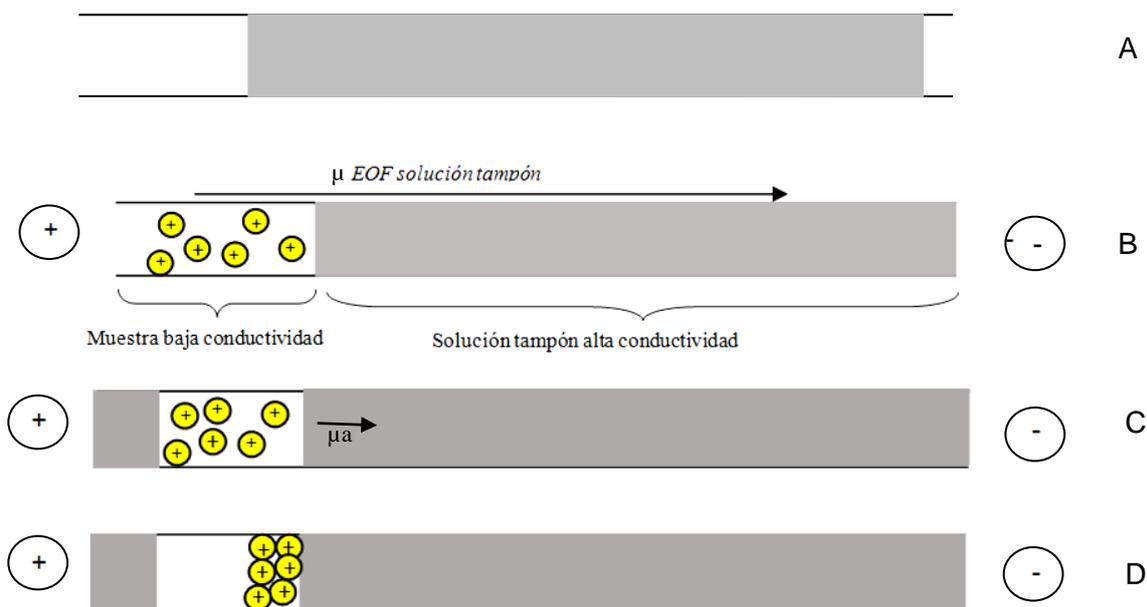


Figura 4. Proceso esquemático de la técnica de preconcentración FASI. A) Inyección del *solvent plug* por inyección hidrodinámica. B) Inyección de la muestra electrocinéticamente. C) Movilidad de los analitos por la diferencia de conductividades. D- Acumulación de los analitos en el límite de ambas soluciones, "stacking".

Las variables a optimizar de la técnica, para así mejorar la preconcentración electroforética, son por un lado, el tipo de *solvent plug* y el tiempo de inyección de éste (donde generalmente más tiempo de *solvent plug* hace que el compuesto se preconcentre más ya que permite la inyección de mas cantidad de muestra, aunque deje menos capilar disponible para que se dé la separación). Por otro lado, la composición de la muestra, (dependiendo del solvente en el que éste está disuelta mejora la disolución del analito y puede mejorar el proceso de preconcentración), y el voltaje y el tiempo aplicado para la inyección de la muestra (una elevada cantidad de éstos puede aumentar la preconcentración).

## 2. OBJETIVO.

El objetivo de éste trabajo es la optimización de la separación electroforética quiral de seis catinonas, utilizando selectores quirales, y el estudio de una técnica de preconcentración electroforética en línea, *field-amplified sample injection*, evaluando el efecto de distintas variables sobre el proceso de preconcentración.

## 3. PARTE EXPERIMENTAL.

En este apartado se comentan los diferentes productos químicos utilizados para poder desarrollar la investigación, como también las concentraciones en los que éstos se han estado preparados. También se cita tanto la instrumentación utilizada como se detalla el proceso experimental seguido tanto para la separación como para la técnica de preconcentración aplicada.



### 3.1. Reactivos y patrones.

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico. Los reactivos que se han utilizado han sido: hidróxido de sodio (NaOH) 1M, metanol (MeOH), fosfato monosódico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 0,1M, ácido fórmico (HCOOH) 0,1M, acetonitrilo (ACN) e isopropanol. También se han utilizado diferentes selectores quirales como ciclodextrinas: α-CD, β-CD, γ-CD, HP-β-CD y S-β-CD y líquidos iónicos en particular *1-octyl-3-methylimidazolium hezafluorophosphate* y *1-hexyl-3-methylimidazolium hezafluorophosphate*.

Todos los reactivos, disolventes y selectores quirales, han sido proporcionados por Sigma Aldrich (St. Luis, MO, Estados Unidos).

Los patrones de catinonas que se han utilizado para desarrollar el trabajo son 3,4-Dimethylmethcathinone, 4-Methylethylcathinone, α-PVP, Mephedrone, Methyline y 3,4-Methylenedioxypropylvalerone proporcionados por LCG (España). Las soluciones patrón han sido preparadas en H<sub>2</sub>O Milli-Q (18.2 MΩ cm) (Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos), en concentraciones de 10, 25 y 50 ppm (preparados a partir de soluciones madre en MeOH en concentraciones de 1000, 2000 y 100 ppm, dependiendo del compuesto) y conservados en el congelador a -18 °C.

#### 3.1.1. Toxicidad.

Para tener una idea de la toxicidad que presentan los compuestos, reactivos y patrones utilizados en la investigación, y de la precaución que se ha de tener durante la manipulación de estos, se ha considerado hacer una recopilación de estas características y reflejarlas en la tabla 4.

Tabla 4. Toxicidad y precauciones de los diferentes reactivos, patrones<sup>[41]</sup> y selectores quirales<sup>[39][40]</sup>.

COMPUESTO	FORMULA QUÍMICA	CAS	TOXICIDAD	PRECAUCIÓN
<i>1-hexyl-3-methylimidazolium hezafluorophosphate</i>	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> F <sub>6</sub> N <sub>2</sub> P	304680-35-1	Tóxico e irritante.	Utilizar protección ocular y corporal. Manipularlo en zonas ventiladas. En caso de contacto lavar con agua.
<i>1-octyl-3-methylimidazolium hezafluorophosphate</i>	C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> ·PF <sub>6</sub>	304680-36-2	Irritante.	Llevar protección ocular y corporal. Manipulación en zonas ventiladas. En caso de contacto lavar con agua.
(2-Hydroxypropyl)-β-CD	(C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>7</sub> (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O)	128446-35-5	No considerada peligrosa.	En caso de contacto lavar con agua.
α-Cyclodextrin	C <sub>36</sub> H <sub>60</sub> O <sub>30</sub>	10016-20-3	No considerada peligrosa.	En caso de contacto lavar con agua.
β- CD	C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>35</sub>	7585-39-9	No considerada peligrosa.	Manipular en zonas ventiladas. En caso de contacto lavar con agua.
γ-CD	C <sub>48</sub> H <sub>80</sub> O <sub>40</sub>	17465-86-0	No considerada peligrosa.	Manipularlo en zonas ventiladas. En caso de contacto lavar con agua.
Acetonitrilo	CH <sub>3</sub> CN	75-05-8	Tóxico, nocivo e irritante. Inflamable (vapores y líquidos). Perjudicial para la salud.	Utilizar protección ocular y corporal. Manipulación de éste en zonas ventiladas.

Acido fosfórico	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	7664-38-2	Corrosivo. Gases tóxicos.	Utilizar protección ocular y corporal. Manipulación en zonas ventiladas.
Acido fórmico	HCOOH	64-18-6	Corrosivo. Combustible.	Utilizar protección ocular y corporal. Uso en zonas ventiladas.
Hidróxido de sodio	NaOH	1310-73-2	Nocivo, corrosivo e irritante.	Utilizar protección ocular y corporal. Manipulación en zonas ventiladas. En caso de contacto lavar con agua.
Isopropanol	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHOH	67-63-0	Altamente inflamable. Mezcla vapor-agua son explosivas.	Uso de protección ocular y corporal. Manipulación en zonas ventiladas. En caso de contacto con agua.
Fosfato monosódico anhidro	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7558-80-7	Irritante.	Recomendado el uso de protección ocular y corporal, como también la manipulación de este compuesto en zonas ventiladas.
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	67-56-1	Tóxico e inflamable. Las mezclas vapor aire son explosivas.	Utilizar protección ocular y corporal. Hacer uso en zonas ventiladas. En caso de contacto enjuagar con agua
Catinonas sintéticas	$\alpha$ -PVP 3,4-DMMC 4-MEC <i>Methylone</i> <i>Mephedrone</i> MDPV		Tóxico en caso de ingestión o contacto con la piel. Irritante.	Usar guantes, gafas y ropa de protección

### 3.2. Instrumentación

La instrumentación utilizada para la separación electroforética ha consistido en un equipo *Agilent 3D CE (Agilent Technologies, Waldbroon, Alemania)* equipado con un detector ultravioleta de diodos en línea (DAD). La detección de los compuestos estudiados se ha realizado a una longitud de onda de 200 nm. La cámara que contiene el capilar se mantuvo a 25 °C en todos los experimentos.

Se ha utilizado un capilar de sílice fundida de 80 cm de longitud (71,5 cm de longitud efectiva) con un ID (diámetro interno) de 50  $\mu$ m (recubierto de una capa de poliamida que permite su flexibilidad sin roturas) y un diámetro externo (OD) de 360  $\mu$ m.

### 3.3. Procedimiento *on-line* FASI-CE.

Diariamente antes del inicio del primer análisis del día, se ha realizado un acondicionamiento de 30 minutos; 10 minutos a máxima presión (930 mbar) de solución NaOH 1M previamente filtrada con un filtro de 45  $\mu$ m, 10 minutos de H<sub>2</sub>O y finalmente 10 minutos del BGE de trabajo (preparada diariamente). Una vez pasados los 30 minutos se ha aplicado un voltaje de trabajo de 30kV durante 3 segundos para asegurar que la corriente era estable.

Entre análisis también se ha realizado un acondicionamiento. Para éste se han seguido los mismos pasos que para el acondicionamiento mostrado en el párrafo anterior, únicamente variando la concentración de la solución de hidróxido de sodio, siendo ésta de 0,1M. Los capilares nuevos se han acondicionado con NaOH 1M durante 40 minutos y 10 minutos de H<sub>2</sub>O Milli-Q.

Por lo que respecta a la técnica de preconcentración estudiada, FASI-CE, en la Figura 4 en el apartado 1.3, se ha mostrado un esquema detallado de las etapas que se han seguido para realizarla. Una vez acondicionado el capilar con la solución electrolítica BGE, el primer paso ha consistido en la inyección hidrodinámica del *solvent plug* concretamente MeOH/H<sub>2</sub>O 25/75 a 50 mbar durante 5 segundos. A continuación, se ha realizado la inyección electrocinética de la solución patrón que contenía las 6 cationas sintéticas, en una concentración de 10 ppm, en unas condiciones de 13 kV durante 5 segundos con un voltaje de +30 kV y una temperatura de 25 °C para que se produzca la separación.

### 3.4. Estudio económico<sup>[39][40]</sup>.

Un punto importante en la realización de un trabajo es el coste económico asociado al desarrollo de éste.

En este apartado se le ha querido dar un enfoque mayor al coste que presenta la preparación de las soluciones patrón, el *solvent plug* optimizado, el tratamiento de los residuos generados, como también el coste del instrumento de electroforesis capilar y su amortización durante los análisis. Todo esto queda reflejado en las tablas que se muestran a continuación.

Una vez detallados estos valores se presenta el coste que representaría llevar a cabo un análisis en las condiciones óptimas halladas en este estudio para la determinación de cationas.

En la Tabla 5 se muestra el coste económico derivado de la preparación de la solución electrolítica.

Tabla 5. Coste económico asociado a la preparación de la solución BGE pH= 2,5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; β-CD + HP- β-CD (5 mM).

Material /Reactivos	Cantidad	Precio €	Concentración requerida	Cantidad utilizada para la preparación BGE	Precio según la cantidad (€)	% respecto al total gastado
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50g	44,50	69 mM	0,0836g	0,07	2,0
β-cyclodextrin	25g	93,00	5 mM	0,00587g	0,03	0,9
HP-β-cyclodextrin	25g	122,00	5 mM	0.073g	0,36	10,5
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1L	44,00	31 mM	21μL	0,01	0,3
Jeringa 10mL	100 u	23,51		1	0,24	6,9
Filtro 0,45 μm	100 u	91,29	-	1	0,91	26,5
<b>TOTAL €</b>	-	-	-	-	1,62	



En la tabla 6., se presentan las concentraciones en las que se han preparado las soluciones madre para cada una de las drogas de abuso y el coste asociado. Estas soluciones se han preparado una única vez durante toda la investigación.

Tabla 6. Coste económico asociado a la preparación de las soluciones madre en 10 mL de MeOH para cada una de las catinonas.

Material /Reactivos	Volumen inicial	Precio €	Concentración requerida sol madre	Precio según la cantidad de MeOH+analito utilizado	% respecto al total gastado
MeOH	2,5 L	144,25	10 mL	0,58	4,3
<i>3,4-Dimethylmethcathinone</i>	10 mg	103	1000 ppm	103,58	10,9
<i>4-Methylethylcathinone</i>	20 mg	177	2000 ppm	177,58	18,7
$\alpha$ -PVP	1 mg/mL	111	100 ppm	111,58	11,7
MDPV	10 mg	177	2000 ppm	177,58	18,7
<i>Mephedrone</i>	10 mg	52	1000 ppm	52,58	5,5
<i>Methylone</i>	10 mg	274	1000 ppm	274,58	28,8
<i>R-Methadone</i>	10 mg	54	1000 ppm	54,58	5,7
<b>TOTAL analitos+MeOH</b>				952,06	

En la tabla 7, se muestran las concentraciones preparadas para las soluciones patrón (en H<sub>2</sub>O Milli-Q), así como el coste asociado a la preparación de éstas. Se han preparado una única vez, excepto el patrón de concentración 10 ppm, preparado cada dos semanas aproximadamente.

Tabla 7. Coste económico asociado a la preparación de las soluciones patrón en H<sub>2</sub>O Milli-Q para cada una de las drogas sintéticas.

Material /Reactivos	Concentración requerida	Volumen solución madre (volumen matraz)	Precio € (MeOH+analito)	% respecto al total gastado
<i>3,4-Dimethylmethcathinone</i>	10 ppm	10 $\mu$ L (1 mL)	0,10	0,9
	25 ppm	25 $\mu$ L (1 mL)	0,26	2,3
	100 ppm	100 $\mu$ L (1 mL)	1,04	9,3
<i>4-Methylethylcathinone</i>	10 ppm	10 $\mu$ L (1 mL)	0,18	1,6
	25 ppm	12,5 $\mu$ L (1 mL)	0,22	1,9
	50 ppm	25 $\mu$ L (1 mL)	0,45	4,0
	100 ppm	50 $\mu$ L (1 mL)	0,52	4,6
$\alpha$ -PVP	10 ppm	200 $\mu$ L (2 mL)	2,28	20,4
	10 ppm	100 $\mu$ L (1 mL)	1,14	10,2
	25 ppm	250 $\mu$ L (1 mL)	2,85	25,5
MDPV	10 ppm	10 $\mu$ L (1 mL)	0,18	1,6
	25 ppm	12,5 $\mu$ L (1 mL)	0,23	2,0
<i>Mephedrone</i>	10 ppm	5 $\mu$ L (1 mL)	0,11	0,9
	25 ppm	25 $\mu$ L (1 mL)	0,13	1,1
	50 ppm	50 $\mu$ L (1 mL)	0,27	2,4
<i>Methylone</i>	10 ppm	5 $\mu$ L (1 mL)	0,55	4,9
	25 ppm	25 $\mu$ L (1 mL)	0,69	6,2
<b>TOTAL €</b>			11,2	

En la tabla 8, se muestran el precio para el *solvent plug* utilizado en la técnica de preconcentración. La solución se preparó diariamente.

Tabla 8. Coste económico asociado a la preparación del *solvent plug* utilizado durante la investigación.

Solvente	Volumen inicial	Precio (€)	Volumen requerido	Precio según el volumen utilizado	% respecto al total gastado
Metanol	2,5L	144,25	250 µL	0,01	

A estos costes se le tiene que sumar el valor del instrumento de electroforesis capilar juntamente con el coste del tratamiento de residuos, mostrados en la Tabla 9.

En el caso del instrumento de electroforesis capilar, el tiempo de vida de éste sería de 15 años aproximadamente. Por lo que la amortización de éste por año sería de 3.000€/año aproximadamente. En mi caso, he estado trabajando con este durante cuatro meses por lo que supondría una amortización de 280€/mes. También resaltar que en este equipo las reparaciones tienen un coste añadido de 2500€/año, de manera que esto supondría un coste adicional, considerándose 208€/mes.

También es importante señalar que el coste que supondría el uso del capilar correspondería a la cantidad que es utilizada de éste. Teniendo en cuenta que se utilizan 80cm y que éste se cambiaría cada 2 meses aproximadamente (dependiendo de la degradación e inactividad de los grupos silanoles presentes en el interior de éste), el coste oscilaría a 0,5€ por capilar preparado, teniendo en cuenta el coste mostrado en la Tabla 9.

Tabla 9. Coste del instrumento CE y asociado al tratamiento de residuos.

<b>Coste instrumento CE</b>	<b>50.000/60.000€</b>
<b>Coste capilar CE</b>	<b>20€/30m</b>
<b>Disolventes halogenados</b>	<b>1010 €/Tn</b>
<b>Disolventes no halogenados</b>	<b>101 €/Tn</b>
<b>Soluciones acuosas</b>	<b>292,90 €/Tn</b>
<b>Aceites</b>	<b>50,50 €/Tn</b>
<b>Sólidos y absorbentes</b>	<b>303 €/Tn</b>
<b>Envases contaminados</b>	<b>606 Tn</b>

Si se hace un balance del coste total que tendría un análisis, éste sería la suma del coste económico que supondría la preparación de la solución electrolítica, el *solvent plug*, la solución patrón para los compuestos (suponiendo la concentración de 10 ppm), como los residuos generados (en este caso únicamente soluciones acuosas).

El coste del análisis sería de 5,00 € para la preparación de todos los productos y reactivos. A esto se le tendrían que añadir los residuos de soluciones acuosas generadas, siendo por cada análisis realizado para la técnica de preconcentración 150 µL de la solución patrón.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En el apartado 4 se comentarán los principales resultados que se han obtenido a lo largo de la investigación realizada. Concretamente se mostrarán los resultados que se han ido obteniendo en la optimización de la separación enantiomérica de las cationas tanto por inyección hidrodinámica, así como también los derivados de la aplicando la técnica de preconcentración FASI.

### 4.1. Separación electroforética aquiral.

En un principio este estudio se centró en cuatro de las seis cationas descritas en la introducción: *Mephedrone*, *Methylone*,  $\alpha$ -PVP y MDPV. Se escogieron éstas ya que, según la bibliografía consultada, son unas de las más ampliamente utilizadas.

Previamente a la separación enantiomérica, y con la finalidad de optimizar la separación de los analitos utilizando CZE, se estudió como afectaba la composición de la solución tampón (*buffer solution*) en la respuesta. Teniendo en cuenta el valor de pKa de cada una de las cationas sustituidas (mostrados en la tabla 2.), se ha utilizado una solución tampón con un pH inferior al pKa, con el objetivo de garantizar que los diferentes analitos estuviesen protonados y así la movilidad electroforética de los analitos fuesen en dirección al cátodo.

Teniendo en cuenta distintos estudios de la bibliografía en los que el pH del trabajo estaba dentro del intervalo entre 2 y 3<sup>[16]</sup> se optó por estudiar diferentes soluciones como tampón fosfato de sodio ( $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$  pKa 2,12; intervalo pH útil 1,5-3) y solución tampón acetato de amonio ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}/\text{CH}_3\text{CO}_2^-$  pKa 4,76; intervalo pH útil 3, 6-5, 8)<sup>[42]</sup>.

Los patrones se prepararon en una concentración de 50 ppm en H<sub>2</sub>O Milli-Q. La inyección de los analitos se llevó a cabo de forma hidrodinámica aplicando una presión de 50 mbar durante 5 segundos, con un voltaje inicial de +30 kV.

Teniendo en cuenta el espectro de absorción de los diferentes analitos se llegó al compromiso de utilizar una longitud de onda de 200 nm.<sup>[43-46]</sup>

Los mejores resultados, en cuanto a la separación, se han obtenido con la primera solución tampón fosfato a pH 2,5 aproximadamente, ya que con el buffer acetato la resolución disminuía y el ruido de fondo en el análisis aumentaba interfiriendo con las señales de los compuestos a estudiar.



No obstante en estos análisis, tal y como se esperaba, no se ha producido una separación enantiomérica para los diferentes compuestos. Es por ello que se plantea la adición de selectores quirales a la solución electrolítica.

## 4.2. Separación electroforética enantiomérica con ciclodextrinas.

Tal y como se muestra en la bibliografía uno de los tipos de selectores quirales más utilizados son las ciclodextrinas, utilizándose tanto ciclodextrinas nativas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ )<sup>[26]</sup>, ciclodextrinas neutras, como ejemplo la HP- $\beta$ -CD<sup>[22]</sup>, y ciclodextrinas cargadas, como la S- $\beta$ -CD<sup>[25]</sup>, para obtener una separación enantiomérica de las cationonas. Por ello se planteó evaluar el efecto de distintas CDs en la separación de las cationonas incluidas en este trabajo. Concretamente se evaluaron  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, una ciclodextrina cargada negativamente, S- $\beta$ -CD y *hydroxypropyl*- $\beta$ -CD. Cada una de las CDs se evaluó de forma individual y se consideraron concentraciones de 5 y 10 mM, valores escogidos en base a la solubilidad que los selectores quirales presentan. Las distintas CDs se adicionaron a la solución electrolítica optimizada con anterioridad (el tampón fosfato a pH= 2,5). La inyección se realizó de forma hidrodinámica a 50 mbar durante 5 segundos con un voltaje de separación a +30 kV y 25°C durante 35 minutos.

Los resultados obtenidos con las distintas CDs estudiadas se muestran en la Figura 5. En ella se muestran los electroferogramas para las ciclodextrinas con los que se ha observado una mejor separación enantiomérica para las cationonas en una concentración de 50 ppm. Los resultados óptimos se han observado para la  $\beta$ -CD (separándose enantioméricamente todos los compuestos) y la HP- $\beta$ -CD (separándose quiralmente tres de las cuatro cationonas, excepto MDPV) en una concentración de 5 mM. Esta concentración para los selectores quirales ha sido la escogida ya que se ha visto que al aumentar la concentración de éstos a 10 mM no se observaba mejora en la enantioseparación, si no que únicamente se producía un aumento del tiempo de migración de los analitos dando lugar a un aumento del tiempo de análisis, que podría estar producido porque al añadir más selector quiral es mayor la interacción que se produce con el analito.

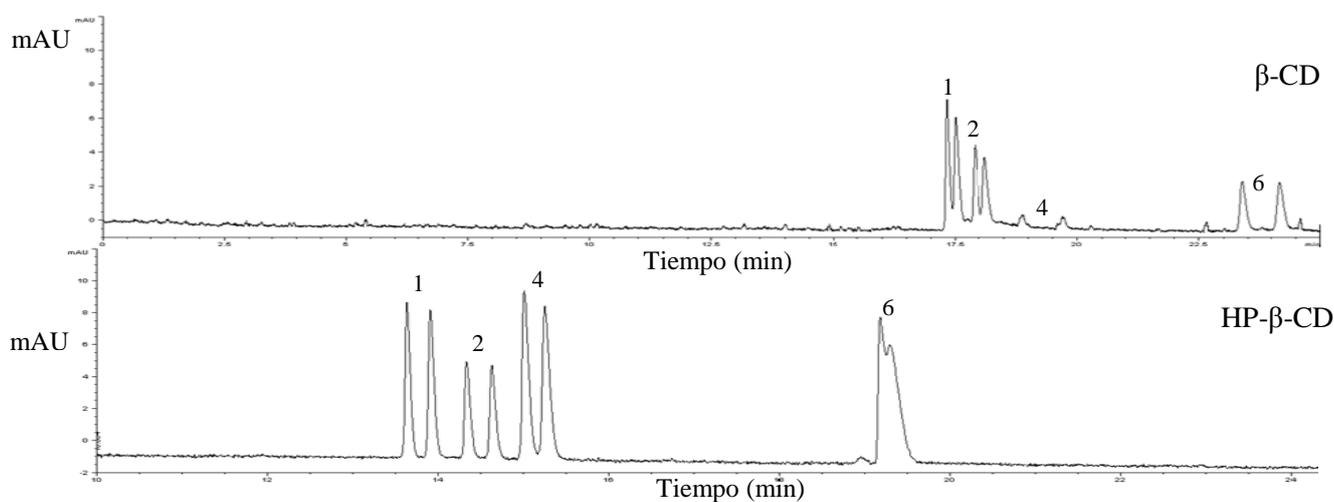


Figura 5. Electroferogramas obtenidos por inyección hidrodinámica a 50 mbar durante 5 segundos de la solución patrón que contenía una concentración de 50 ppm de las 4 cationonas de interés: *Mephedrone* (1), *Methylone* (2),  $\alpha$ -PVP (4) y MDPV(6) utilizando una solución electrolítica pH= 2,5 de tampón fosfato añadiendo de forma individual las CD como selectores quirales, todas ellas a una concentración de 5 mM.



Debido a que, como se ha observado en la Figura 5 ,para la  $\beta$ -CD se ha obtenido una separación enantiomérica para las cuatro cationas aunque esta no ha sido a nivel de la línea base y para la HP- $\beta$ -CD se han separado óptimamente tres de las cuatro se ha planteado utilizar una mezcla con aquellas que han dado mejores resultados. Cabe destacar que en algunos estudios de la bibliografía diversos autores artículos han realizado un método de estas características con resultados positivos. Como por ejemplo en el estudio de Klein, R. F.X. et al.<sup>[47]</sup> en que éste utiliza una mezcla de ciclodextrinas neutras y aniónicas siendo éstas: HP-  $\beta$ -CD y S- $\beta$ -CD, para la separación de una serie de drogas de abuso entre las que se encuentra la cationa, se ha considerado adicionar a la solución electrolítica una mezcla de las dos ciclodextrinas:  $\beta$ -CD y HP- $\beta$ -CD. Se han utilizado concentraciones de 5 y 10 mM para cada una de ellas (teniendo en cuenta los datos mostrados de solubilidad en la Tabla 2). Para realizar las diferentes pruebas se han preparado soluciones electrolíticas individuales que contenían concentraciones diversas de ambas ciclodextrinas concretamente: 5mM  $\beta$ -CD/ 5mM HP- $\beta$ -CD, 5mM  $\beta$ -CD/10 mM HP- $\beta$ -CD y 10mM  $\beta$ -CD/10 mM HP- $\beta$ -CD.

La separación enantiomérica óptima para las 4 cationas se ha observado con la solución electrolítica que presentaba una concentración de 5 mM para cada una de las dos ciclodextrinas. Se ha observado que al adicionar mayor concentración de cada uno de los selectores quirales a la solución electrolítica, únicamente se veían incrementados los tiempos de migración de las cationas y por consiguiente el tiempo de análisis debido a una mayor interacción hidrofóbica con el selector quiral por parte de las cationas.

Una vez separadas las 4 cationas de interés iniciales, se ha planteado la posibilidad de poder llegar a separar enantiomericamente un mayor número de cationas. Concretamente se han incluido dos cationas más; *3,4-DMMC* y *4-Methylethylcathinone*. En la Figura 6, se muestra el electroferograma correspondiente a la separación para las 6 cationas

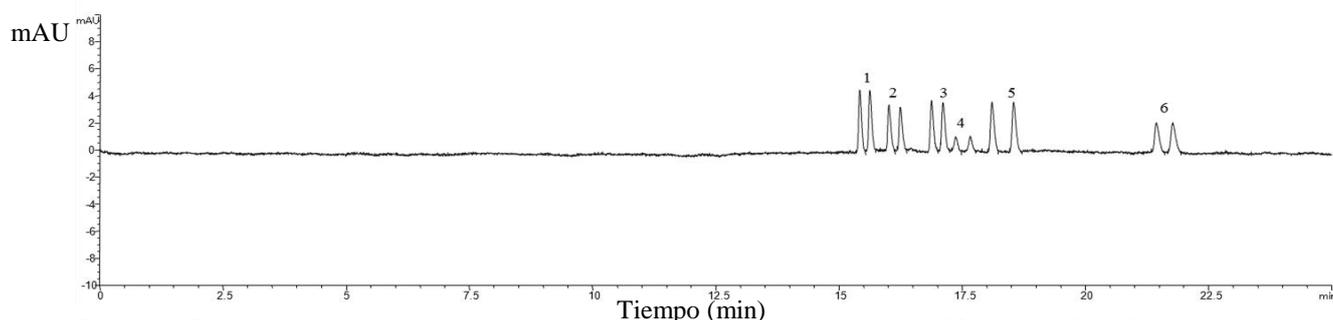


Figura 6. Separación enantiomérica de 6-cationas con una concentración de 50 ppm, utilizando como solución BGE un tampón fosfato a pH= 2,5, una mezcla de CDs como selectores quirales (5 mM  $\beta$ -CD y 5 mM HP- $\beta$ -CD). Condiciones análisis: inyección hidrodinámica a 50 mbar durante 5 segundo , aplicando una diferencia de potencial de +30 kV a una temperatura de 25 °C durante 35 minutos de análisis. Siendo los analitos (1) *Mephedrone*, (2) *Methylone*, (3) *4-Methylethylcathinone*, (4)  $\alpha$ -PVP, (5) *3,4-DMMC* y (6) *MDPV*.

Con las condiciones óptimas de separación enantiomérica obtenidas utilizando como selector quiral la mezcla de ciclodextrinas  $\beta$ -CD y HP- $\beta$ -CD en concentraciones de 5 mM para ambas, se han modificado diferentes parámetros concretamente el voltaje de separación y la temperatura del capilar con el objetivo de poder mejorar la enantioseparación.



Por un lado la temperatura del capilar se ha variado considerando 20, 25 y 30 °C. Estas temperaturas se han elegido teniendo en cuenta que por un lado, la temperatura superior no puede sobrepasar los 30 °C debido a que un excesivo aumento de ésta puede dar lugar a la formación de burbujas dentro del capilar alterando la estabilidad de la línea base. Por otro lado, por debajo de cierta temperatura tampoco se puede trabajar, concretamente por debajo de la temperatura ambiente del laboratorio que oscila entorno a los 20 °C. Teóricamente al aumentar la temperatura del capilar la viscosidad de la solución electrolítica disminuye por lo que la movilidad de los analitos aumenta dando lugar a un tiempo de análisis menor. Una vez obtenidos los electroferogramas se obtuvo lo descrito, así la temperatura de 30 °C se ha considerado excesiva para obtener una buena separación ya que se obtuvo una distorsión de la línea base, como también se ha creído límite la temperatura de 20 °C. La temperatura óptima ha sido a 25°C.

Por otro lado las diferencias de voltaje estudiadas han sido 20, 25 y 30 kV. Como era de esperar, se ha observado que al aumentar el voltaje aplicado durante la separación de las cationas, la velocidad de los analitos ha aumentado, disminuyendo el tiempo de análisis y no viéndose una mejora en la enantioseparación de las cationas. Finalmente se ha escogido un voltaje de 30 kV porque el tiempo de análisis era inferior que con los demás voltajes estudiados.

Una vez obtenida la separación enantiomérica de las 6 cationas óptima utilizando como selectores quirales la mezcla de CDs, se ha considerado evaluar otro tipo de selector quiral para obtener también una enantioseparación concretamente los líquidos iónicos quirales.

### **4.3. Separación electroforética enantiomérica con líquidos iónicos.**

La utilización de los líquidos iónicos quirales (CIL) como selectores se han considerado ya que en la bibliografía este tipo de selectores se han empleado para la determinación de algunos tipos de drogas de abuso. Los CIL con los que se ha trabajado, que han sido *1-octyl-3-methylimidazolium heptafluorophosphate* y *1-hexyl-3-methylimidazolium heptafluorophosphate*.

Inicialmente se han adicionado los líquidos iónicos quirales de forma independiente y por otra parte también se ha evaluado su respuesta en combinación con alguna CD previamente evaluada.

Las concentraciones con las que se ha trabajado para cada uno de los líquidos iónicos de forma individual han sido: 5, 10 y 15 mM. Con estas condiciones no se ha obtenido una separación enantiomérica con ninguno de los dos CIL para ninguna de las 6 cationas. A modo de ejemplo se muestran los electroferogramas obtenidos de la Figura 7 para el líquido iónico *1-octyl-3-methylimidazolium heptafluorophosphate* (7A) y *1-hexyl-3-methylimidazolium heptafluorophosphate* (7B) en concentraciones ambos de 5mM. Se ha observado que al aumentar la concentración de estos se ha empeorado la resolución de los picos y se han disminuido los tiempos de retención para los compuestos, aumentando también el ruido de fondo y distorsionándose la línea base (diversos autores citan que esto puede estar causado por un aumento en la viscosidad del sistema de separación y una peor interacción de los analitos en el capilar<sup>[32,33]</sup>).



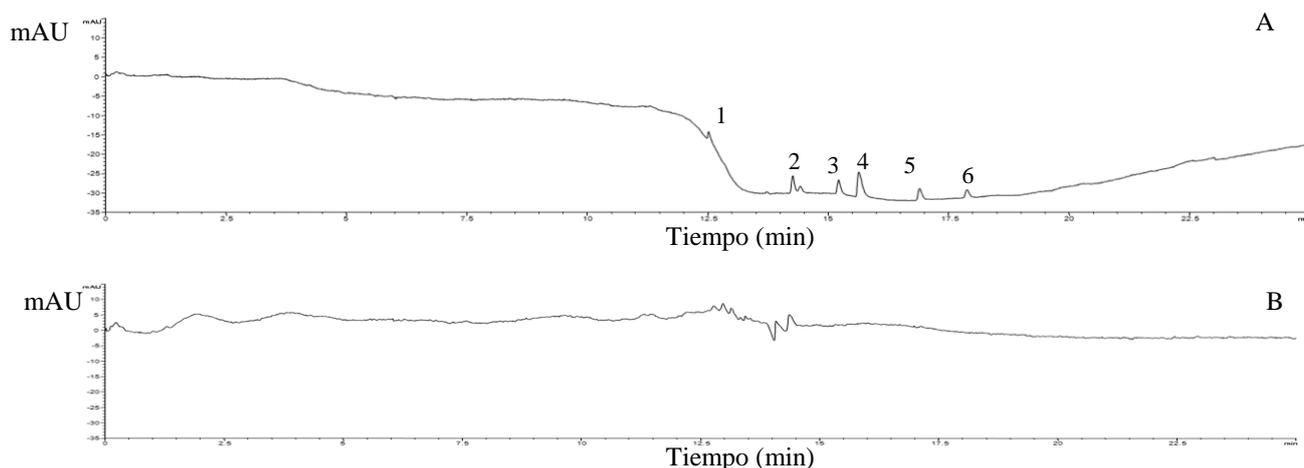


Figura 7. Separación enantiomérica para las 6 cationonas de interés utilizando una solución electrolítica de tampón fosfato a pH= 2,5, añadiendo como selector quiral líquidos iónicos en diferentes concentraciones. A) Corresponde a la adición de 5 mM de *1-octyl-3-methylimidazolium hezafluorophosphate* B) Corresponde a la adición de 5 mM de *1-hexyl-3-methylimidazolium hezafluorophosphate*. Siendo la identificación de los picos la descrita en las figuras anteriores

Con la adición de una mezcla de ambos CIL en diferentes concentraciones 5, 10 y 15 mM, tampoco se obtuvo una separación enantiomérica para las cationonas.

Teniendo en cuenta que con la adición de la mezcla de dos ciclodextrinas ( $\beta$ -CD y HP- $\beta$ -CD) a la solución electrolítica se ha obtenido una buena enantioseparación se ha optado por usar como selectores quirales ambos compuestos, CDs y CIL. Las concentraciones a las que se han realizado las pruebas han sido 5 mM y 20 mM para ambos líquidos iónicos quirales, junto con 5 y 10 mM  $\beta$ -CD ó 5, 10 y 20 mM HP-  $\beta$ -CD con una solución tampón fosfato a pH= 2,5.

La inyección hidrodinámica se ha realizado en las mismas condiciones que las especificadas en los apartados anteriores.

En este estudio combinando CDs con CIL, no se ha obtenido una separación quiral para los compuestos, únicamente utilizando una concentración de 5 mM para HP- $\beta$ -CD y 5 mM *1-octyl-3-methylimidazolium hezafluorophosphate*, ha tenido lugar una óptima separación para algunos compuestos tal y como se muestra en la Figura 8.

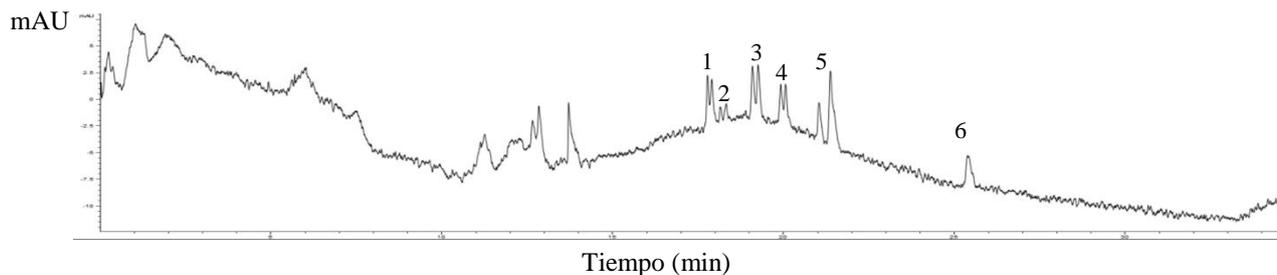


Figura 8. Separación enantiomérica para las 6 cationonas de interés utilizando una solución electrolítica de tampón fosfato a pH= 2,5, añadiendo como selector quiral una mezcla de CDs y CIL en diferentes concentraciones. Corresponde a la adición de 5 mM de *1-octyl-3-methylimidazolium hezafluorophosphate* y de 5 mM HP- $\beta$ -CD. Siendo la identificación de los picos la descrita en las figuras anteriores.



En general, para las demás concentraciones estudiadas, tal y como se muestra en la Figura 9 y 10 a modo de ejemplo donde para los electroferogramas obtenidos con algunas soluciones electrolíticas con concentraciones diversas de los selectores quirales y las CDs, tenía lugar el empeoramiento de la línea base, como también la eficacia de los picos.

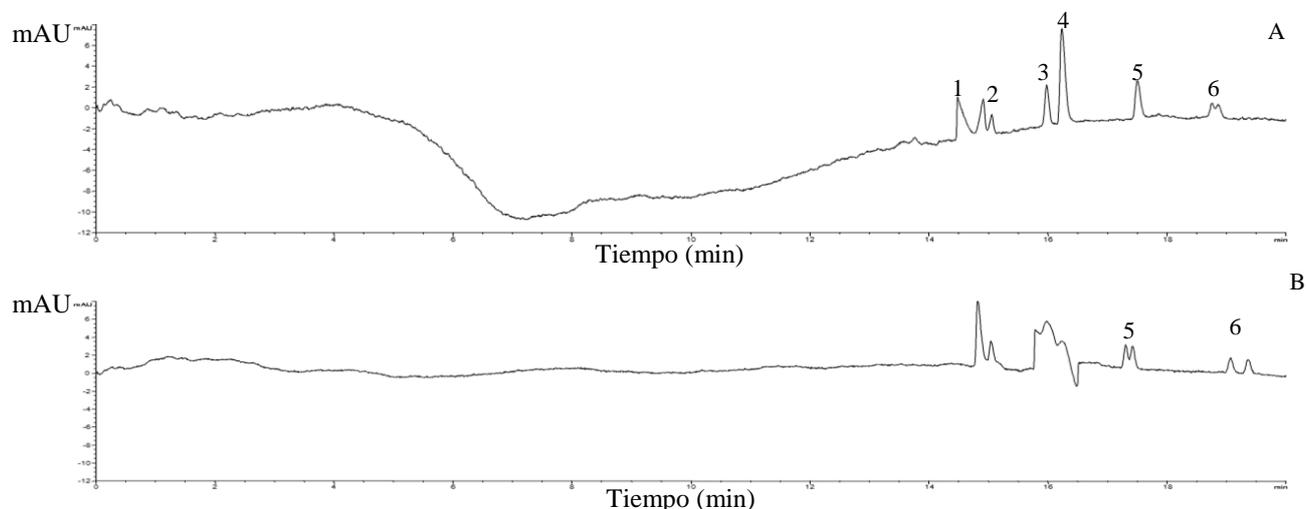


Figura 9. Separación enantiomérica para las 6 cationonas de interés utilizando una solución electrolítica de tampón fosfato a pH= 2,5, añadiendo como selector quiral una mezcla de líquidos iónicos y ciclodextrinas en diferentes concentraciones. A) Corresponde a 5 mM  $\beta$ -CD y 20 mM 1-octyl-3-methylimidazolium hezafluorophosphate. B) Corresponde a 10 mM  $\beta$ -CD 5 mM 1-octyl-3-methylimidazolium hezafluorophosphate. Siendo la identificación de las cationonas la misma que la realizada en las demás figuras.

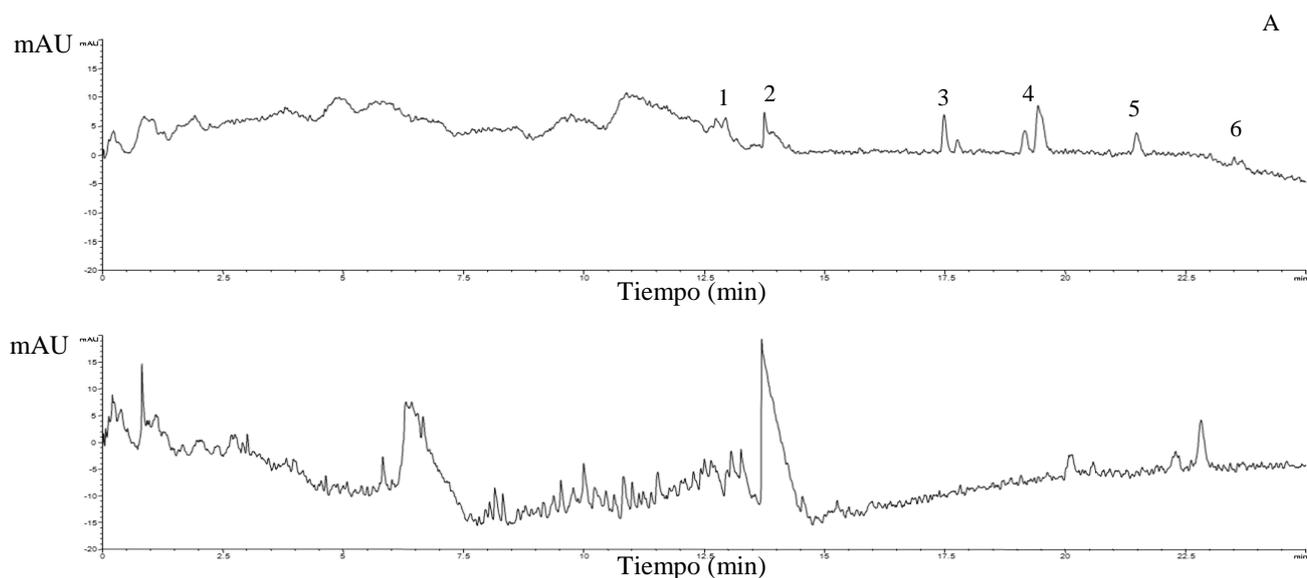


Figura 10. Separación enantiomérica para las 6 cationonas de interés utilizando una solución electrolítica de tampón fosfato a pH= 2,5, añadiendo como selector quiral una mezcla de líquidos iónicos y ciclodextrinas en diferentes concentraciones. A) Corresponde a 5 mM  $\beta$ -CD y 5 mM 1-hexyl-3-methylimidazolium hezafluorophosphate. B) Corresponde a 5 mM  $\beta$ -CD 20 mM 1-hexyl-3-methylimidazolium hezafluorophosphate. La asignación para las diferentes cationonas es la misma que la realizada en las demás figuras.

Después de probar los diferentes selectores quirales a la solución electrolítica se ha optado como solución óptima la formada por una solución tampón fosfato a pH= 2,5 y una mezcla de



dos ciclodextrinas en concentraciones de 5 mM cada una de ellas, siendo estas:  $\beta$ -CD y HP- $\beta$ -CD.

#### 4.4. Estudio de la técnica de preconcentración electroforética: FASI.

Una vez optimizada la separación enantiomérica utilizando una inyección hidrodinámica de la solución patrón se ha continuado el trabajo acoplado la técnica de preconcentración electroforética FASI, con el objetivo de alcanzar unos límites de detección más bajos.

Los parámetros a optimizar han sido: la composición del *solvent plug* (apartado 4.4.1), la composición de la muestra (4.4.2), el tiempo de inyección del *solvent plug* (apartado 4.4.3.) y el voltaje y tiempo de inyección de la muestra (apartado 4.4.4).

##### 4.4.1. *Solvent plug*.

Como se ha comentado con anterioridad, el *solvent plug*, es una solución que presenta una baja conductividad para favorecer la movilidad de los analitos en ella. Para poder estudiar este parámetro teniendo en cuenta que el objetivo era obtener una máxima respuesta en área, una alta precisión (bajo %RSD) y una elevada eficacia para los picos, se han considerando tres solventes de baja conductividad; concretamente H<sub>2</sub>O Milli-Q, HCOOH 0,1M y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M. Estos solventes se han escogido teniendo en cuenta que son los más ampliamente utilizados en la bibliografía<sup>[48]</sup>. Por ejemplo cabe señalar el estudio de Tagliaro, F. et al, en el que se optimiza este parámetro utilizando una inyección hidrodinámica un *solvent plug* de ácido fosfórico 0,1 M a 50 mbar durante 10 segundos obteniendo unos óptimos resultados para la separación enantiomérica de diferentes drogas de abuso tales como la cocaína y la catinona.

La técnica de preconcentración, teniendo en cuenta la bibliografía, se ha realizado partiendo de las siguientes condiciones experimentales: una inyección hidrodinámica del *solvent plug* a 50 mbar durante 10 segundos y una posterior inyección electrocinética del patrón a 10 kV durante 5 segundos, y finalmente se ha aplicado un voltaje de +30 kV a una temperatura de 25°C para la separación.

B

En la Figura 11 se muestran, a modo de ejemplo asumiendo que los gráficos obtenidos para dos de las catinonas incluidas en el estudio, concretamente *Mephedrone* y *Methylone*. Para las otras catinonas los resultados han sido similares. Según los resultados reflejados en el Figura 10, las áreas para los analitos son mayores y el %RSD (que marca la precisión del método, en este caso la repetitividad (mismo día)) es más bajo, cuando se utiliza un *solvent plug* de H<sub>2</sub>O. Se ha observado también por un lado que el factor de preconcentración para el *solvent plug* de ácido fórmico es menor que para el de H<sub>2</sub>O, y por otro lado que utilizado el *solvent plug* de ácido fosfórico los analitos no se han preconcentrado ya que la respuesta ha sido similar a la obtenida en el caso de no aplicar la técnica de preconcentración.



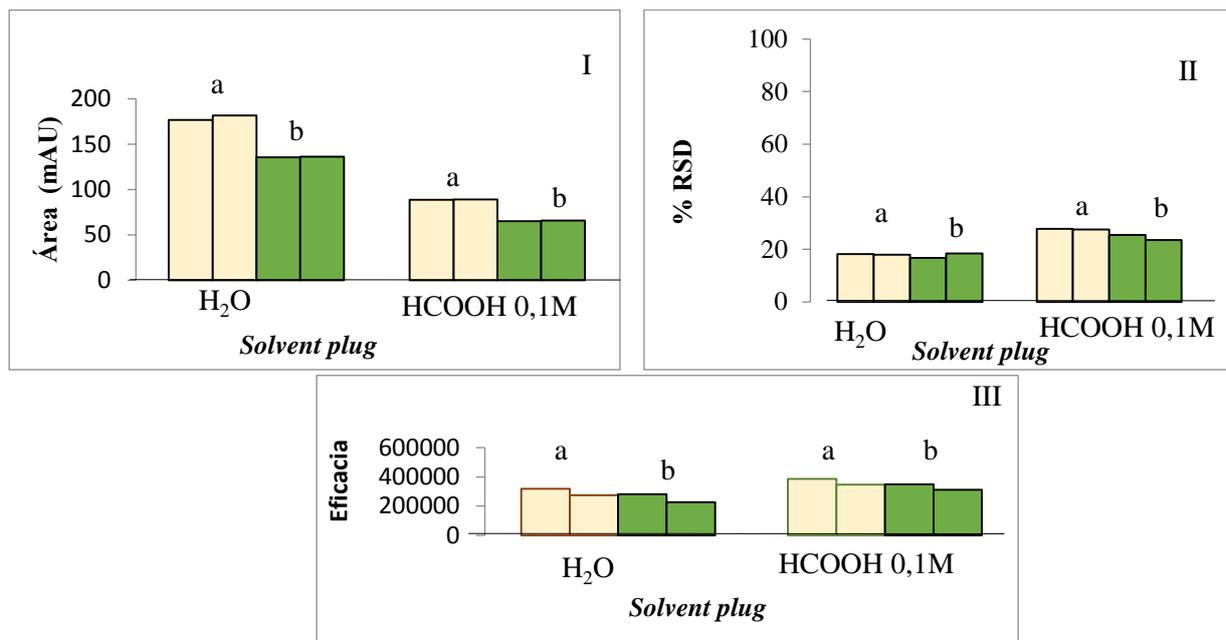


Figura 11. Área (I), % en desviación estándar relativa (II) y eficacia (III) para dos de los compuestos de interés utilizando como *solvent plug* para la técnica de preconcentración FASI; agua y ácido fórmico 0,1 M. Siendo a y b las cationonas *Mephedrone* y *Methylone* respectivamente.

Teóricamente estos resultados son tal como era de esperar, ya que si seguimos el concepto en el que se describe que la conductividad, donde ésta es inversamente proporcional a la velocidad que tendrá el ión en el *solvent plug* (directamente relacionada con la movilidad de la solución, siendo esta inversamente proporcional a la viscosidad de la solución y al radio del compuesto), se puede concluir que la movilidad de la solución de ácido fórmico tendría que ser la más baja ya que este es el solvente que presenta mayor viscosidad ( $\eta=2,5-9,4$ ). Así pues si la conductividad es mayor, ésta será más parecida a la conductividad de la solución BGE, haciendo que no esté tan favorecido el fenómeno de la preconcentración. Si seguimos este razonamiento entre H<sub>2</sub>O y HCOOH ( $\eta=1,57$ ; 25 °C) los resultados obtenidos son los esperados, siendo H<sub>2</sub>O el *solvent plug* con mayor respuesta.

Una vez probados H<sub>2</sub>O Milli-Q y los ácidos débiles en bajas concentraciones como *solvent plug* para la técnica de preconcentración, se han probado algunos compuestos orgánicos, que también se ha observado en la bibliografía<sup>[49]</sup> que incrementaban el factor de preconcentración. El razonamiento que se plantea en la bibliografía citada es que los solventes orgánicos al contener enlaces covalentes, no se ionizan en la solución y no dan una elevada conducción, siendo así óptimos para la técnica de preconcentración electroforética, presentando una baja conductividad. Estas pruebas se han realizado para cada uno de los solventes orgánicos puros y a diferentes porcentajes teniendo como solvente regulador H<sub>2</sub>O. Éstas han sido: MeOH y relaciones de MeOH/H<sub>2</sub>O 50/50, 25/75, ACN y relaciones de ACN/H<sub>2</sub>O 50/50, 25/75.

Los resultados para cada uno de los *solvent plug* comparados con el *solvent plug* de H<sub>2</sub>O, en valores de relaciones de áreas o de %RSD y de eficacia entre picos enantiómeros, se muestran en



los gráficos de la Figura 12 a modo de ejemplo para uno de los seis compuestos: *Mephedrone*, teniendo en cuenta que la tendencia se mantenía para el resto de los analitos.

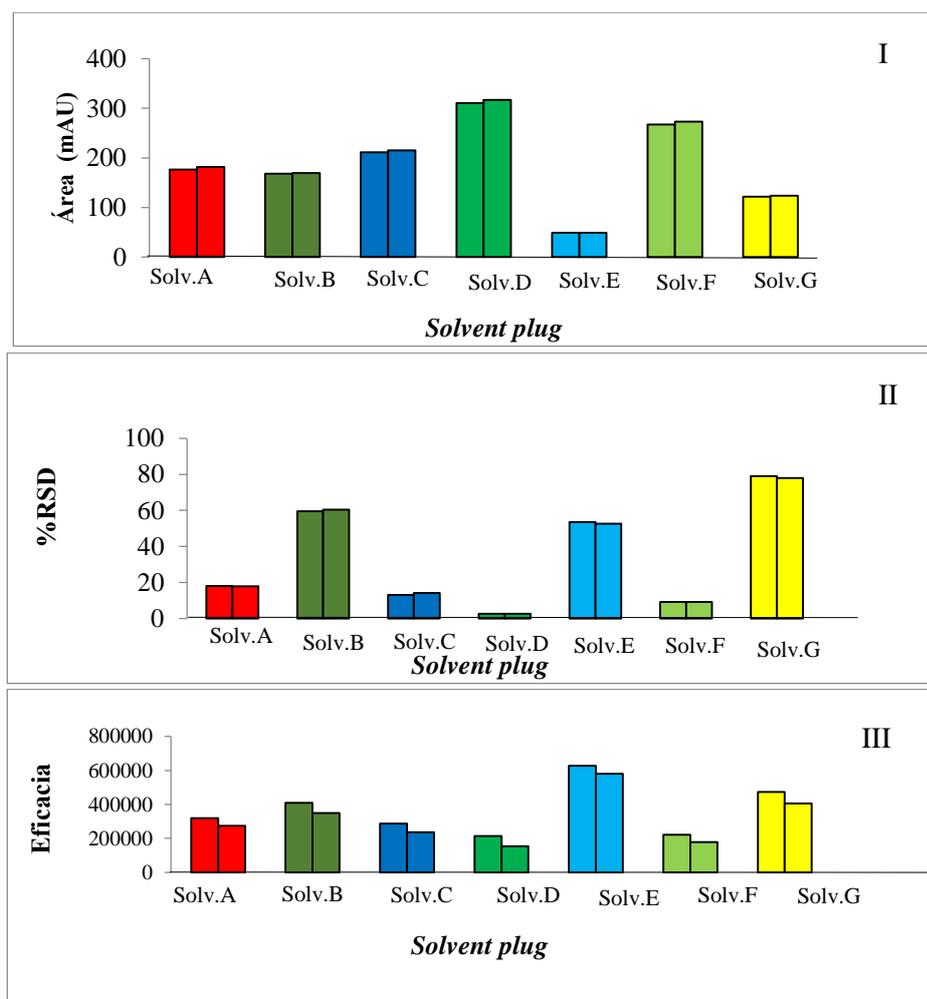


Figura 12. Áreas (I) , % desviación estándar relativa (II) y eficacia (III) para el compuesto *Mephedrone* utilizando como *solvent plug* en la técnica de preconcentración FASI. Solv. (A) H<sub>2</sub>O, (B) MeOH, (C) MeOH/H<sub>2</sub>O 50/50, (D) MeOH/H<sub>2</sub>O 25/75, (E) ACN, (F) ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 y (G) ACN/H<sub>2</sub>O 25/75 respectivamente, utilizando para los solventes orgánicos H<sub>2</sub>O como solvente regulador.

En la selección del mejor *solvent plug* se ha implementado el criterio de eliminar aquellos que presentaban un valor de RSD superior a 15. Con este criterio, se ha considerado como *solvent plug* óptimo debido a una mayor respuesta y a una baja desviación estándar relativa, el *solvent plug* orgánico MeOH/H<sub>2</sub>O 25/75 H<sub>2</sub>O.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, para poder mejorar la precisión en la inyección hidrodinámica del *solvent plug* se han considerado dos opciones. Por un lado, teniendo en cuenta la bibliografía<sup>[50]</sup>, se ha estudiado la introducción de un patrón interno a la solución patrón que contiene las 6 cationas (un compuesto con características parecidas a los analitos de trabajo). El compuesto elegido fue la R-*Methadone*, ya que se vio que el tiempo de migración de éste era similar a los demás analitos y preconcentraba en las condiciones optimizadas. Como los cálculos en respuesta de áreas, %RSD y eficacia no mejoraban con la adición del PI, éste no se consideró. Por otro lado se ha planteado, habiendo sido estudiado antes por otros grupos de investigación,



tal y como se muestra en la bibliografía<sup>[49]</sup>, la introducción de una pequeña cantidad de *solvent plug* por diferencia de presión eliminando la inyección hidrodinámica. Para poder llevar esto a cabo se sumergieron los extremos del capilar en los viales en posición *inlet* que contenía H<sub>2</sub>O (1,5mL), y *oulet* que contenía la solución BGE (1mL), durante 30 segundos. Seguidamente realizando la inyección electrocinética a 10 kV durante 5 segundos, con una separación a +30 kV a 25 °C durante 35 minutos. Los resultados obtenidos no han mejorado la precisión de la inyección hidrodinámica.

De este modo ninguna de estas dos consideraciones se ha tenido en cuenta, utilizando finalmente para las posteriores pruebas de optimización, el *solvent plug* orgánico MeOH/H<sub>2</sub>O 25/75 inyectado a 50 mbar durante 5 segundos.

Una vez optimizado este parámetro otro de gran importancia, ha sido el estudio de la composición de la muestra, ya que ésta tiene una gran influencia en la preconcentración de los compuestos.

#### **4.4.2. Composición de la muestra.**

La composición de la muestra tiene una gran influencia en el factor de preconcentración de la técnica FASI debido a la conductividad que ésta puede presentar y por lo tanto a la movilidad que pueden tener los analitos en dicha solución.

Teniendo en cuenta diversos artículos<sup>[51]</sup>, para facilitar y mejorar el proceso de preconcentración teniendo como objetivo obtener así la máxima respuesta para los 6 compuestos, se ha planteado la adición de solventes orgánicos en la muestra. Estos debido a la baja conductividad que presentan tendrían que aumentar la respuesta para los analitos debido a que haría aumentar la movilidad de éstos en la solución permitiendo así un efecto de mayor preconcentración para los compuestos.

Para llevar a cabo las pruebas se han considerado tres solventes orgánicos en diferentes concentraciones utilizando como solvente referente H<sub>2</sub>O, ya que este había sido el disolvente de trabajo hasta el momento. Los disolventes orgánicos han sido: MeOH, MeOH/H<sub>2</sub>O 50/50, MeOH/H<sub>2</sub>O 75/25 y MeOH/H<sub>2</sub>O 25/75, como también para el ACN y para el isopropanol.

En este caso, para realizar experimentalmente la técnica de preconcentración FASI, se realizó con las condiciones optimizadas hasta el momento.

Los resultados obtenidos se muestran en los gráficos de la Figura 13, en la que se puede observar las áreas y la eficacia para una de las catinonas, *Mephedrone*, ya que la tendencia que se obtiene para este compuesto es similar a la obtenida para el resto de analitos estudiados. Los resultados se compararon con la respuesta obtenida inicialmente disolviendo la muestra en H<sub>2</sub>O. Tal y como se puede ver en la Figura 12, los solventes orgánicos que mejor respuesta han dado son MeOH/H<sub>2</sub>O 25/75, MeOH/H<sub>2</sub>O 75/25 y ACN/H<sub>2</sub>O 50/50. De estos el que mayor respuesta y menor %RSD ha presentado es MeOH/H<sub>2</sub>O 25/75%. Aún así el solvente orgánico MeOH/H<sub>2</sub>O



25/75, no supera en respuesta de áreas y %RSD a la obtenida usando como disolvente de los compuestos H<sub>2</sub>O.

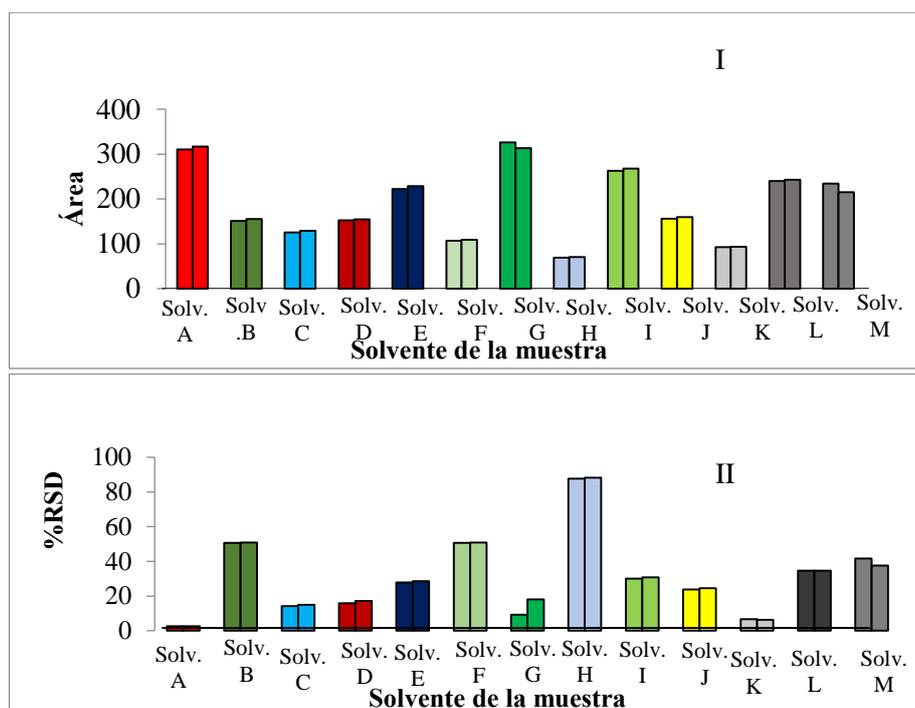


Figura 13. Áreas (I) y % desviación estándar relativa (II) para el compuesto *Mephedrone* utilizando como *solvent plug* para la técnica de preconcentración MeOH/H<sub>2</sub>O 25/75 variando la composición de la muestra utilizando diferentes solventes orgánicos siendo estos: Solv. (A) H<sub>2</sub>O, (B) MeOH, (C) ACN, (D) isopropanol, (E) MeOH/H<sub>2</sub>O 75/25, (F) MeOH/H<sub>2</sub>O 50/50, (G) MeOH/H<sub>2</sub>O 25/75, (H) ACN/ H<sub>2</sub>O 75/25, (I) ACN/H<sub>2</sub>O 50/50, (J) ACN/H<sub>2</sub>O 25/75 e (K) isopropanol/H<sub>2</sub>O 75/25, (L) isopropanol/H<sub>2</sub>O 50/50, (M) isopropanol/H<sub>2</sub>O 25/75 respectivamente

Teniendo en cuenta estos resultados finalmente se ha concluido que el disolvente que mejor respuesta da para la separación enantiomérica de las 6 cationas es H<sub>2</sub>O en las condiciones de trabajo descritas con anterioridad. Y por ello las pruebas posteriores se llevan a cabo en estas condiciones.

#### 4.4.3. Tiempo de inyección del *solvent plug*.

El tiempo de inyección del *solvent plug* es otra de las variables a optimizar ya que un aumento de éste podría suponer un aumento de la cantidad de muestra inyectada y consecuentemente de los factores de preconcentración. No obstante también cabe tener en cuenta que, si la cantidad de *solvent plug* inyectada es muy elevada esto puede suponer un efecto negativo ya que la distancia de capilar que quedaría disponible para que tuviese lugar la enantioseparación podría no ser suficiente y no se llegaría a obtener una óptima resolución entre picos enantioméricos.

Los valores de tiempo de inyección que se han considerado en este estudio, teniendo en cuenta la bibliografía<sup>[48]</sup>, concretamente los valores de tiempos de inyección estudiados han sido 5, 10 y 15 segundos.

Para los tiempos descritos se muestran los electroferogramas incluidos en la Figura 14. Se ha observado que al aumentar el tiempo de 5 a 10 segundos se produce un aumento de la señal



obtenida en valores de área, pero tiene lugar un leve empeoramiento de la separación quiral para las cationas. Esto puede verse influenciado porque al aumentar la cantidad de *solvent plug* inyectado queda un menor espacio disponible en el capilar pudiéndose solapar los picos de los diferentes enantiómeros y pudiendo llevar a una disminución de los tiempos de migración. Cuando el tiempo se aumenta hasta 15 segundos la respuesta ha disminuido. Este hecho se podría atribuir a un posible efecto de dilución de la muestra por parte del solvente, produciendo así el efecto contrario a la preconcentración.

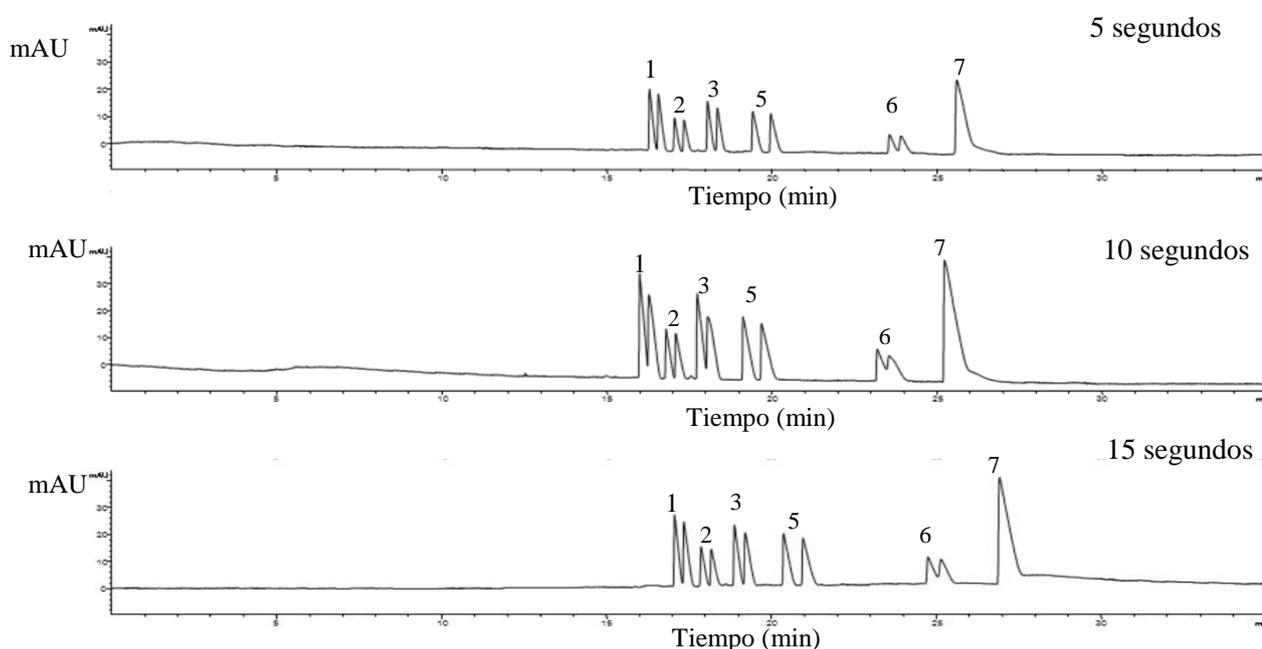


Figura 14. Electroferogramas obtenidos para la variación del tiempo de inyección hidrodinámica a 50 mbar del *solvent plug*. A) 5 segundos, B) 10 segundos y C) 15 segundos. La identificación de las cationas es la misma que la de la Figura 13.

Teniendo en cuenta las razones explicadas en los párrafos anteriores se ha considerado como óptimo el tiempo de inyección de 5 segundos.

#### 4.4.4. Voltaje y el tiempo de inyección para la muestra.

El voltaje y el tiempo con el que se inyecta electrocinéticamente la muestra, son parámetros que afectan a la cantidad de ésta inyectada y por lo tanto pueden afectar al factor de preconcentración.

En el estudio de ambos parámetros se ha considerado inicialmente fijar 5 segundos como tiempo de inyección de la muestra y variar el voltaje dentro del rango 10-20 kV.

Tal y como se muestra en los electroferogramas de la Figura 15, un aumento del voltaje, en las condiciones de trabajo ha aumentado la preconcentración de los analitos pero ha disminuido la enantioseparación para los analitos, ya que como se puede observar se produce un ensanchamiento de bandas debido a una introducción mayor en el capilar de muestra. Se ha observado que este efecto se agrava a partir de los 15 kV (15 C), es por ello que se ha



considerado un valor intermedio para poder obtener así una respuesta mayor que con 10 kV y mantener la separación enantiomérica de las cationonas. Éste ha sido el valor de 13 kV (15 B).

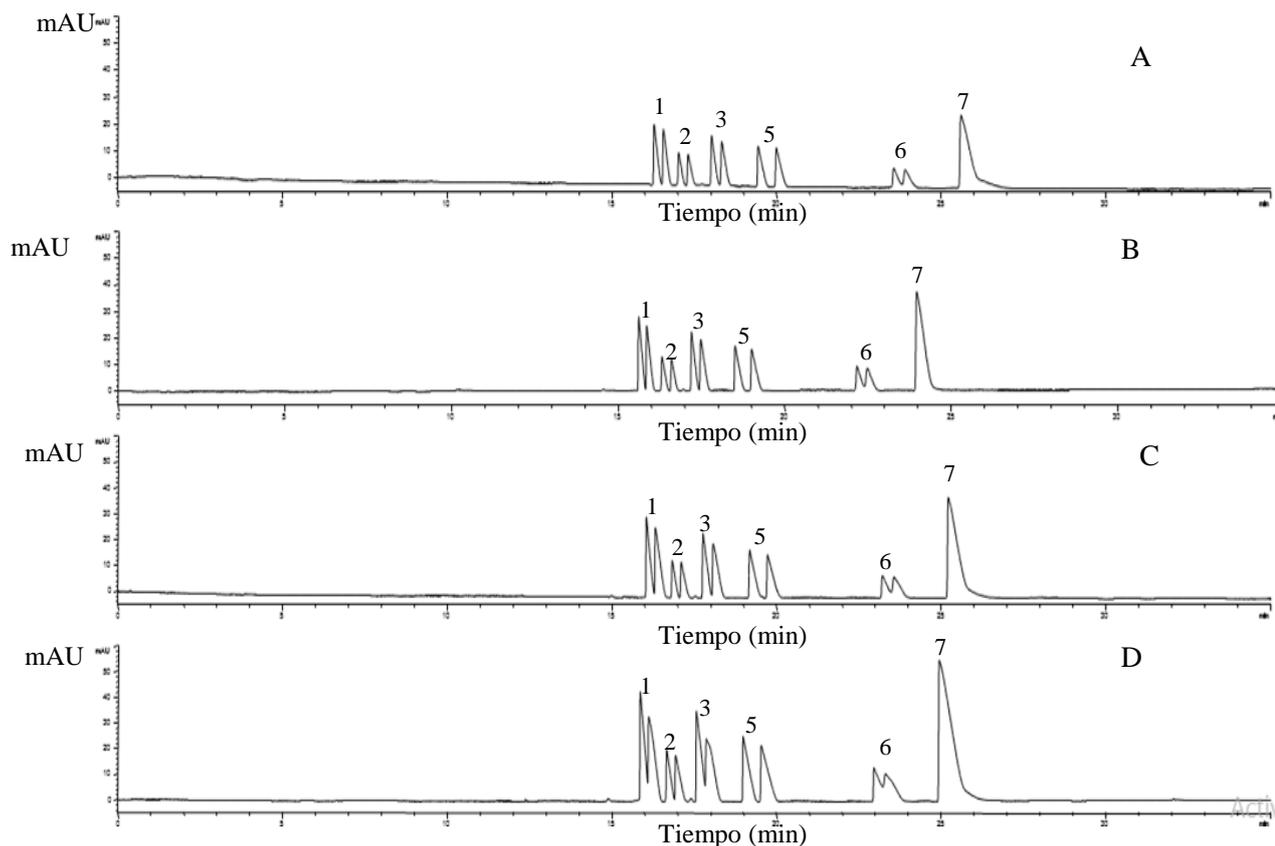


Figura 15. Electroferogramas obtenidos con la variación del voltaje en la inyección electrocinética de la muestra. A) 10 kV, B) 13 kV, C) 15 kV y D) 20 kV. Condiciones de análisis las optimizadas hasta el momento. Los analitos (1) Mephedrone, (2) Methylone, (3) 4-MEC, (5) 3,4-DMMC, y (6) MDPV. El número 7 corresponde al patrón interno.

Teniendo en cuenta resultados mostrados, se ha considerado que el voltaje óptimo para la inyección electrocinética son 13 kV, ya que corresponde a las condiciones en que todavía la enantioseparación tiene lugar y la respuesta es elevada.

Una vez optimizado el voltaje para la inyección electrocinética de la muestra, se ha estudiado como afecta en la respuesta tiempo de inyección de ésta. Se evaluaron diferentes tiempos en el rango de 5 a 20 segundos. Tal y como se puede observar en los electroferogramas obtenidos para estos tiempos en la Figura 16, al aumentar el tiempo de inyección a partir de 10 segundos se producía una distorsión de los picos, disminuyendo la resolución entre picos enantiómeros. Este hecho se puede atribuir a un exceso de muestra en el capilar.



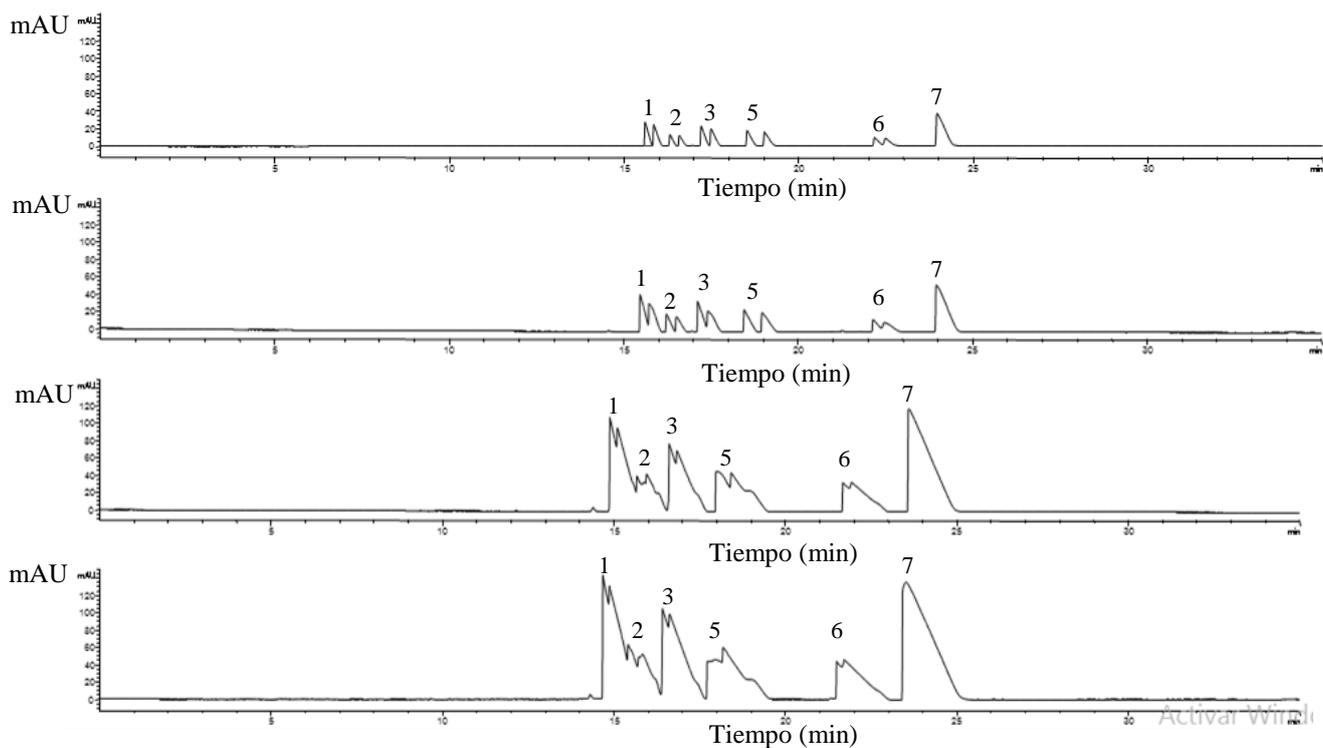


Figura 16. Electroferogramas obtenidos con la variación del tiempo de inyección electrocinética de la muestra. A) 5 segundos, B) 10 segundos, C) 15 segundos y D) 20 segundos, a un voltaje de 13 kV. Las condiciones de análisis son las optimizadas en los apartados anteriores. Los analitos Mephedrone, Methylone, 4-MEC, 3,4-DMMC, y MDPV quedan identificados como en las demás Figuras de este apartado.

Para poder obtener una mayor preconcentración de los analitos, y teniendo en cuenta los resultados descritos sobre la Figura 16 siendo el factor de preconcentración mayor para 5 segundos, se ha considerado la aplicación de un tiempo de inyección intermedio entre 5 y 10 segundos. Éstos han sido de 5 a 9 segundos. Aún y con estas pequeñas variaciones también se ha observado una distorsión en los picos de los analitos.

Como conclusión los valores óptimos para la inyección electrocinética han sido 13 kV durante 5 segundos.

Una vez optimizado este parámetro se ha estudiado en un mismo tiempo de inyección de la muestra que efecto tenía más importancia sobre la preconcentración de esta si el voltaje o el tiempo de inyección, obteniendo una mayor respuesta con una óptima enantioseparación. Para llevar a cabo se han considerado como óptimas la inyección electrocinética realizada durante 65 segundos, 13 kV durante 5 segundos. Los resultados obtenidos se han comparado con la inyección electrocinética realizada a un voltaje de 10 kV durante 6,5 segundos (debido a que este voltaje también daba una separación quiral óptima para las cationas). Ambas inyecciones de la solución patrón se realizaron con las condiciones de preconcentración optimizadas en los apartados anteriores.

Tal y como se muestra en los electroferogramas representados en la Figura 17, se ha observado que el efecto del tiempo de inyección con un menor voltaje era mayor sobre la preconcentración de

los analitos, pero este creaba una mayor distorsión y una menor resolución en los picos obtenidos para los diferentes enantiómeros.

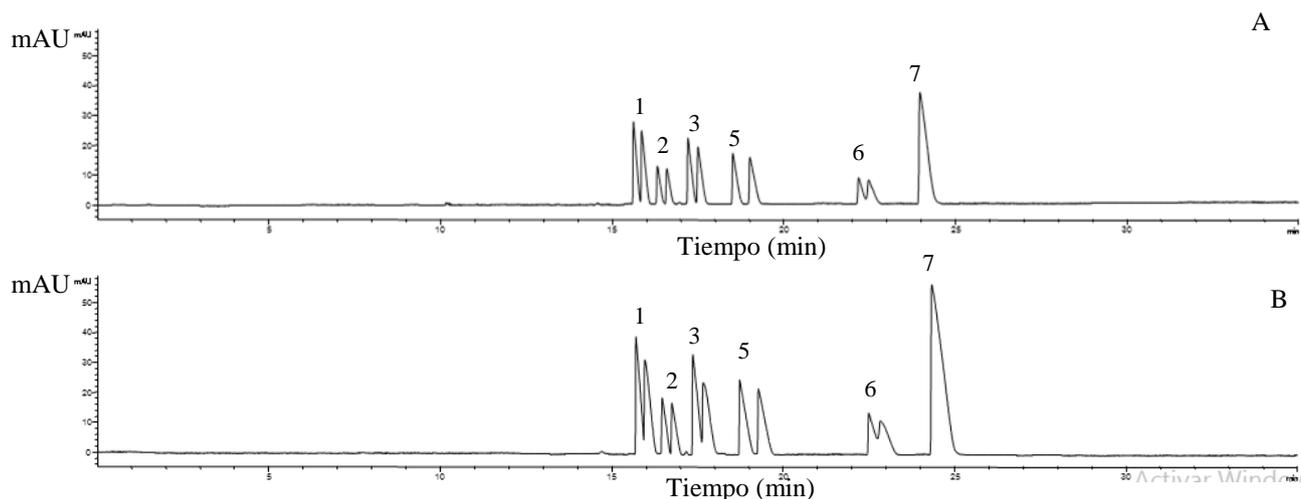


Figura 17. Electroferogramas obtenidos para las variaciones de volumen y voltaje en la inyección electrocinética de la solución patrón. Siendo A) 13 kV durante 5 segundos y B) 10 kV durante 6,5 segundos. Los analitos Mephedrone, Methylone, 4-MEC, 3,4-DMMC, y MDPV y el patrón interno quedan referenciados como en las anteriores figuras.

Finalmente se ha considerado como óptima la inyección electrocinética a 13 kV durante 5 segundos para las seis cationas.

#### 4.4.5. Factor de preconcentración.

Para calcular el factor de preconcentración (SEF) se han considerado las repuestas obtenidas para la inyección hidrodinámica de la solución patrón de 50 ppm y la inyección de la misma aplicando la técnica de preconcentración electroforética FASI. Estos valores se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Factor de preconcentración para las cationas con la técnica de preconcentración FASI.

Compuestos	SEF
Mephedrone	7,5
Methylone	10,6
4-MEC	8
$\alpha$ -PVP	7
3,4-DMMC	7
MDPV	4

#### 4.5. Estudio de la linealidad del método.

El estudio de la linealidad del método se ha realizado solo con tres puntos debido a la falta de tiempo. Se han analizado soluciones patrón de 3, 10 y 15 ppm de las diferentes cationas. A modo de ejemplo se muestran los resultados obtenidos para el compuesto *Mephedrone* en el gráfico de la Figura 18.

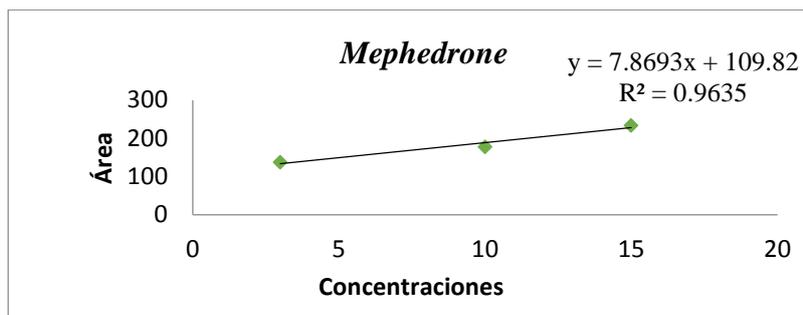


Figura 18. Línea de tendencia para el compuesto *Mephedrone* en las concentraciones de 3,10 y 15 ppm. En las conciones de inyección hidrodinámica y electrocinéticas optimizadas

## 5. CONCLUSIONES.

In this work, the enantioseparation of six cathinone derivates by capillary zone electrophoretic using a separation electrolyte containing a mixture of  $\beta$ -CD and HP- $\beta$ -CD as chirals selectors has been achieved in a short analysis time.

FASI-CE has been used as in-line as electrophoretic precncentration technique, optimizing the differets factors that can affect on the technique.

The developed method has shown important advantages as the reduced consumption of reagents and it can be considered as an ecofriendly strategy and also cost-effective.

Further studies will be carried out to get high preconcentration factors in order to be able to determine these compounds at low levels in real samples as biological fluids.

## 6. REFERÉNCIAS.

[1] Kelly, J. P., “Cathinone derivatives: A review of their chemistry, pharmacology and toxicology”, *Drug Test Anal.*, vol. 3, p. 439–453, 2011.

[2] Aturki, Z., Schmid, M. G., Chankvetad, B., Fanali, S., “Enantiomeric separation of new cathinone derivatives designer drugs by capillary electrochromatography using a chiral stationary phase, based on amylose *tris*(5-chloro-2-methylphenylcarbamate)”, *Electrophoresis*, vol.35, p.3242–3249, 2014.

[3] Kolanos, R., Solis, E.J., Sakloth, F., De Felice, L.J., Glennon, R.A., ““Deconstruction” of the Abused Synthetic Cathinone Methylenedioxypyrovalerone (MDPV) and an Examination of Effects at the Human Dopamine Transporter”, *ACS Chem Neurosci*, vol.12, p.1524-1529, 2013.

[4] Baumann, M.H., Partilla, J.S., Lehener, K.R., “Psychoactive “bath salts”: Not so soothing”, *European Journal of Pharmacology*, vol.11, p.1-5, 2013.



[5] Zaitso, K., Katagi, M., Tsuchihashi, H., Ishii, A., “Recently abused synthetic cathinones, alpha-pyrrolidinophenone derivatives: a review of their pharmacology, acute toxicity, and metabolism”, *Forensic Toxicology*, vol. 32, p.1-8, 2012.

[6] <http://www.lgcstandards.com> (2/06/2016).

[7] Kehr, J., Ichinose, F., Yoshitake, S., “Mephedrone, compared to MDMA (ecstasy) and amphetamine, rapidly increases both dopamine and serotonin levels in nucleus accumbens of awake rats.”, *Journal of Pharmacology*, vol. 164, p.1949-1958, 2011.

[8] Prosser, J.M., Nelson, L.S., “The Toxicology of Bath Salts: A Review of Synthetic Cathinones.”, *J Med Toxicol.*, vol.8, p.33-42, 2012.

[9] Jane, M., Prosser, Lewis, S., Nelson, “The Toxicology of Bath Salts: A Review of Synthetic Cathinones”, *J. Mel. Toxicol.*, vol.8, p.33-42, 2012.

[10] Mohor, S., Pilaj, S., Schmid, M.G., “Chiral separation of cathinone derivatives used as recreational drugs by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis.”, *Electrophoresis*, 2012, vol.33, p.1624-1625.

[11] De Castro, A., Lendoiro, E., Fernández-Vega, H., Steinmeyer, S., López-Rivadulla, M., Cruz, A., “Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of selected synthetic cathinones and two piperazines in oral fluid. Crossreactivity study with an on-site immunoassay device”, *J.Chromatogr. A*, vol.1374, p.93–101, 2014.

[12] Durden, D.A., Davis, B.A., Boulton, A.A., “Identification of amino acids by capillary gas chromatography. Application to martian samples”, *J.Chromatogr. B*, vol. 689, p. 165–173, 1997.

[13] Maruszak, W., Trojanowicz, M., Margasinska, M., Engelhardt, H., “Application of carboxymethyl-β-cyclodextrin as a chiral selector in capillary electrophoresis for enantiomer separation of selected neurotransmitters. , *J. Chromatogr. A*, vol. 926, p. 327–336, 2001.

[14] Singh, A. K., Kedor-Hackmann, É. R. M., Santoro, M. I. R. M., “Cromatografia líquida com fase quiral aplicada na separação enantiomérica de fármacos cardiovasculares,” *Bras. Ciências Farm.*, vol.42, no.4, p.553–566, 2006.

[15] Švidrnoch, M., Lněničková, L., Válka, I., Ondra, P., Maier, V., “Utilization of micellar electrokinetic chromatography–tandem mass spectrometry employed volatile micellar phase in the analysis of cathinone designer drugs,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1356, p. 258–265, 2014.

[16] Mohr, S., Pilaj, S., Schmid, M. G., “Chiral separation of cathinone derivatives used as recreational drugs by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis,” *Electrophoresis*, vol. 33, no.11, p. 1624–1630, 2012.

[17] Kumihiko, C., Otsuka, K., “Recent applications of on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis.”, *J. Chromatogr. A*, vol. 1335, p. 43-60, 2014.



[18]Švidrnoch, M., Lněničková, L., Válka, I., Ondra, P., Maier, V., “Utilization of micellar electrokinetic chromatography–tandem mass spectrometry employed volatile micellar phase in the analysis of cathinone designer drugs”, *J. Chromatogr. A*, vol.1356, p.258–265, 2014.

[19] Huang, L., Lin, Q., Chen, Y., Chen, G., “Transient isotachopheresis with field-amplified sample injection for on-line preconcentration and enantioseparation of some  $\beta$ -agonists”. *Anal Methods*, vol.3, p.248-294, 2011.

[20] Aturki, Z., Schmid, M. G., Chankvetadze, B., Fanali, S., “Enantiomeric separation of new cathinone derivatives designer drugs by capillary electrochromatography using a chiral stationary phase, based on amylose tris (5-chloro-2-methylphenylcarbamate),” *Electrophoresis*, vol. 35, no.21–22, pp. 3242–3249, 2014.

[21]François, Y. Varenne, A. Juillerat, E. Villemin, D. Gareil, P., “Evaluation of chiral ionic liquids as additives to cyclodextrins for enantiomeric separations by capillary electrophoresis.”, *Journal of Chromatography A*, vol.1155, p.134-141, 2007.

[22] Cui, M., Yu, Y., Xu, J., Guo, S., Zhao J., “Combined use of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and ionic liquids for the simultaneous enantioseparation of four azole antifungals by CE and a study of the synergistic effect”, *Sep. Sci.*, vol.37, p.151-157, 2014.

[23]Morteza. G. K (Ed), “High Performance Capillary Electrophoresis. Theory, Techniques, and Application.”, WILEY, 1998, p.796-797

[24]Scriba, G.K.E., “Cyclodextrins in capillary electrophoresis enantioseparations – Recent developments and applications”, *J. Sep. Sci.*, vol.31, p.1991-2011, 2008.

[25]Mohr,S., Pilaj, S., Martin,G., Schmid., “Chiral separation of cathinone derivatives used as recreational drugs by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis”, *Electrophoresis*, vol.33, p.1624–1630, 2012.

[26] Merola, H., Tagliaro, F., Macchia, T., Bruce, R., McCord., “Chiral separation of 12 cathinone analogs by cyclodextrin-assisted capillary electrophoresis with UV and massspectrometry detection”, *Electrophoresis*, vol. 35, p. 3231–3241, 2014.

[27]Shamsi, S.A., and Danielson, N.D., “Ionic Liquids as Modifiers of Chromatographic and Electrophoretic Systems”, *J. Sep. Sci.*, vol. 30, p. 1729, 2003.

[28]Ho, T.D., Zhang, C., Hantao, L.M., Anderson, J.L., “Ionic liquids in analytical chemistry: fundamentals, advances, and perspectives”, *Anal. Chem*, vol. 86, p. 262, 2013.

[29]L.M. Yuan, Y. Han, Y. Zhou, X. Meng, Z. Li, M. Zi, Y. Chang, “Application of ionic liquids as mobile phase additives and surface-bonded stationary phase in liquid chromatography”, *Anal. Lett.*, vol.39, p.1439, 2006.

[30]J.Ding,T. Welton, D.W. Armstrong, “Chiral ionic liquids as stationary phases in gas chromatography”, *Anal. Chem.*, vol.76, p.6819, 2004.

- [31] X. Mu, L. Qi, H. Zhang, Y. Shen, J. Qiao, H. Ma, Talanta, "Ionic liquids with amino acids as cations: novel chiral ligands in chiral ligand-exchange capillary electrophoresis". 97 (2012) 349
- [32] François, Y., Varenne, A., Juillerat, E., Villemin, D., Gareil, P., "Evaluation of chiral ionic liquids as additives to cyclodextrins for enantiomeric separation by capillary electrophoresis.", *Journal of Chromatography A*, vol. 1155, p. 134-141, 2007.
- [33] Liu, R., Du, Y., Chen, J., Zhang, Q., Du, S., and Feng, Z., *Chirality*, 2015, vol.27, p. 58.
- [34] Tagliaro, F., Manetto, G., Crivellente, F., Scarcella, D., Marigo, M., "Hair analysis for abused drugs by capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking", *Forensic Science International*, vol.92, p. 201-211, 1998.
- [35] Kawai, T., Koino, H., Sueyoshi, K., Kitagawa, F., Otsuka, K., "Highly sensitive chiral analysis in capillary electrophoresis with large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump", *Journal of Chromatography A*, vol.1246, p. 28-34, 2012.
- [36] Hernandez, M., Aguilar, C., Borrull, F., Calull, M., Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and flumequine in pig plasma samples by capillary isotachopheresis–capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography B*, vol.772, p.163-172, 2002.
- [37] R. Taylor, S. Toasaksiri, R.G. Reid, "A literature assessment of sample pretreatments and limits of detection for capillary electrophoresis of drugs in biological fluids and practical investigation with some antimalarials in plasma", *J. Chromatogr. A*, vol.19, p. 2791, 1998.
- [38] Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Verheggen, T. P. E. M., "High-performance zone electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, vol.169, p. 11–20, 1979.
- [39] Sigma Aldrich. Obtenida el 14 de Julio de 2016. <https://www.sigmaaldrich.com/>
- [40] Acros organics. Obtenida el 14 de Julio de 2016. <http://www.acros.com/>.
- [41] LGC standards. Obtenida el 14 de Julio de 2016. <http://www.lgcstandards.com/>.
- [42] Cousins, S.M., Haddad, S.P., Buchberger, W., "Evaluation of carrier electrolytes for capillary zone electrophoresis of low-molecular-mass anions with indirect UV detection", *J. Chromatogr. A*, vol.671, p.397, 1994.
- [43] S. Mohr, S. Pilaj, and M. G. Schmid, "Chiral separation of cathinone derivatives used as recreational drugs by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 33, no. 11, p.1624–1630, 2012.
- [44] S. Fanali, "Identification of chiral drug isomers by capillary electrophoresis," vol. 735, pp. 77–121, 1996.
- [45] F. Sporkert, F. Pragst, R. Bachus, F. Masuhr, and L. Harms, "Determination of cathinone, cathine and norephedrine in hair of Yemenite khat chewers," *Forensic Sci. Int.*, vol. 133, no. 1–2, p. 39–46, 2003.

[46]L. Zhou, B. D. Johnson, C. Miller, and J. M. Wyvratt, “Chiral capillary electrophoretic analysis of the enantiomeric purity of a pharmaceutical compound using sulfated  $\beta$ -cyclodextrin,” *J. Chromatogr. A*, vol. 875, no. 1–2, pp. 389–401, 2000.

[47]Ira, S., Lurle, Robert, K., “Chiral Resolution of Cationic Drugs of Forensic Interest Capillary Electrophoresis with Mixtures of Neutral and Anionic Cyclodextrins.” , *Anal. Chem*, vol. 66, p. 4019-4026, 1994.

[48]Tagliaro, F., Manetto, G., Crivellente, F., Scarcella, D., Marigo, M., “Hair analysis for abused drugs by capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking.” , *Forensic Science International*, vol. 92, p. 201-211, 1998.

[49]Airado-Rodríguez, D., Cruces-Blanco, C., García-Campaña, A.M., “Dispersive liquid–liquid microextraction prior to field-amplified sample injection for the sensitive analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine, phencyclidine and lysergic acid diethylamide by capillary electrophoresis in human urine”, *Journal of Chromatography A*, vol. 1267, p. 189-197, 2012.

[50]Macià, A., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M., “Application of capillary electrophoresis with different sample stacking strategies for the determination of a group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the low  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  concentration range”, *Electrophoresis*, vol. 25, p. 428-436, 2014.

[51] Sarmini, K., Kenndler, E., “Influence of organic solvents on the separation selectivity in capillary electrophoresis”, *J.Chromatography A*, vol. 792, p. 3-11, 1997.



## 7. COMPETENCIAS SUPERADAS.

### Autoevaluación de las competencias superadas en el grado en Química.

Nom: Desirèe Moya Rodríguez

Curs:2015-2016

B1	Saber aprender de forma autónoma y crítica, es uno de los objetivos principales de esta competencia. Esto es fundamental para un mejor futuro profesional y personal. Personalmente esta competencia ha sido aplicable a la hora de realizar proyectos, informes, donde se ha tenido que poner en práctica la teoría aprendida. Considero que si ha sido superada.
B2	Tener la capacidad para identificar y resolver un problema es un punto clave en esta competencia. Durante el grado esta ha sido una tarea a realizar tanto en equipo, aportando cada uno sus conocimientos, como individualmente, para así superarte y conseguir la solución correcta. Considero que si ha estado superada.
B3	A medida que ha transcurrido el curso la dificultad ha aumentado y se han teniendo que aplicar nuevos conceptos para así poder solucionar problemas, como también para innovar en el campo de estudio. Esta competencia ha sido aplicada sobre todo durante el trabajo final de carrera, teniendo la capacidad de buscar información y saberla aplicar en el campo de estudio para así obtener resultados completamente nuevos. Considero que ha sido superada.
B4	Uno de los puntos más importantes cuando se trata de futuro profesional es la capacidad para realizar tareas de forma autónoma. En el transcurso de la realización del trabajo final es cuando más se aplica esta competencia, ya que la capacidad para la organización, la resolución de problemas y la capacidad de razonar se ven reflejadas. Considero que ha sido superada.
B5	Una de las maneras de trabajo más utilizadas durante el grado es el trabajo en equipo, la capacidad de aportar conocimientos e ideas en común y así poder llegar a solventar el problema planteado. La capacidad para contribuir a la consolidación del equipo, favoreciendo en la comunicación y en un reparto equilibrado de tareas. Esta es una de las competencias que considero más complicada ya que tienes que saberte amoldar a cualquier situación y persona con la que se realice el trabajo, aún así al poderla aplicar durante cuatro años considero que ha sido superada.
B6	Transmitir las ideas y conocimientos adquiridos en una de las tareas fundamentales para un buen aprendizaje. A través de las exposiciones orales, como también en los trabajos en equipo he podido expresar los conocimientos. Considero que ha estado superada.
B7	Estudiando una carrera como química una de las preocupaciones principales es el medio ambiente. A través de conferencias como las realizadas durante las jornadas en química verde, pero sobre todo durante la realización de mi trabajo de investigación, debido a la importancia que tienen los compuestos actualmente, he podido concienciarme más en el aspecto medioambiental.

B8	Esta ha sido una de las competencias, que aún y trabajadas durante el grado con el diseño de proyectos, ha sido óptima para desarrollarla durante la elaboración del TFG. Considero que ha estado superada.
C1	Esta competencia ha sido superada gracias a la obtención de un certificado oficial del nivel B1 en inglés.
C2	Durante los cuatro años de grado para cada una de las asignaturas realizadas he tenido que consultar documentos externos para así tener una visión más amplia del temario dado en clase. Los buscadores de artículos (proporcionados por la universidad), paginas especializadas en química o en ciencia han sido claves para acabar de entender conceptos.
C3	Para poder dar un buen resultado también ha sido necesario aplicar la capacidad para gestionar la información como los conocimientos adquiridos. Esta competencia considero que también ha sido clave para un buen desarrollo del trabajo final de carrera, y que considero que se ha logrado.
C4	Aprender a expresarse y a corregir errores a la hora de hacerlo también ha sido una tarea aprendida durante el grado en cada una de las asignaturas realizadas. Aplicado tanto a la realización de proyectos como a la hora de expresar conocimientos en exámenes
C5	Tener compromiso como ciudadana y profesional es uno de los puntos más importantes. Durante la realización de cursos como <i>Coaching</i> y PNL se ha podido asentar esta competencia.
C6	Durante el transcurso del grado, me he ido definiendo y encontrando el área en el que me puedo sentir más cómoda profesionalmente.

### **Autoevaluación general.**

En términos generales considero que las competencias han estado superadas con éxito pudiendo crecer más tanto profesional como personalmente.



