



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

## **DETERMINACIÓN DE NUEVAS SUSTANCIAS PSICOACTIVAS (NSP) EN FLUÍDOS BIOLÓGICOS MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN Y CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ULTRA RESOLUCIÓN**

Facultad de Medicina. Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias Forenses. Servicio de Toxicología.

Facultad de Química. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología.

Trabajo final de grado

Grado en Química

**Autora:** Elisabet Domingo Griñó

**Dirigido por:** Maria Elena Fernández Gutiérrez

6 de Junio de 2019



## **LISTA DE ACRÓNIMOS:**

$\alpha$ -PVP=  $\alpha$ -Pirrolidinovalerofenona

3-FMC = 3-Fluorometcatinona

4-MEC = 4-Metilmetcatinona

CV= Coeficiente de variación

DLLME= Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva

EMCDDA= Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías

FDA= Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos

FE = Factor de enriquecimiento

GC = Cromatografía de gases

HPLC = Cromatografía líquida de alta resolución

ICH= Conferencia Internacional de Armonización

IS= Patrón interno

LC = Cromatografía de líquidos

LLE = Extracción Líquido-Líquido

LOD= Límite de detección

LOQ= Límite de cuantificación

MDMA= 3,4-Metilendioximetanfetamina

MEPS= Microextracción con Sorbentes Empaquetados

MIP-SPE= Extracciones de polímeros impresos en fase sólida

MS= Espectrometría de masas

NSP = Nuevas sustancias psicoactivas

PDA = Detector de red de fotodiodos

PRAC= Comité de Evaluación de Riesgos en Farmacovigilancia

SLE= Extracción de líquidos con soporte

SPE = Extracción en fase sólida

SPME = Microextracción en fase sólida

UPLC = Cromatografía líquida de ultra resolución

US = Ultrasonidos

## LISTA DE FIGURAS

- 1-Incautación de catinonas sintéticas notificadas al sistema de alerta temprana de la UE: tendencias en número de incautaciones y cantidades incautadas (2).
- 2-Estructura química de las anfetaminas y las catinonas.
- 3-Estructura química de la catinona sustituida.
- 4-Estructura química de la 3-Fluorometcatinona.
- 5-Estructura química de la 4-Metilmecatinona.
- 6-Estructura química de la  $\alpha$ -Pirrolidinovalerofenona.
- 7-Estructura química de la Pentilona.
- 8-Localización anatómica de las tres glándulas salivales mayores. Glándula parótida (a), glándulas submandibulares (2), y glándula sublingual (3).
- 9-Representación gráfica del procedimiento de SPE.
- 10-Representación gráfica del procedimiento de DLLME.
- 11-Partes de un cromatógrafo de líquidos.
- 12-Eschema del funcionamiento de un detector de red de diodos.
- 13-Número y categorías de nuevas sustancias psicoactivas notificadas por primera vez al Sistema de alerta temprana de la UE.
- 14-Etapas para la toma de muestra de fluido oral mediante el dispositivo Salivette®.
- 15-Eschema del procedimiento de microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME).
- 16-Cromatograma de una disolución patrón de mezcla de los analitos (1 $\mu$ g/mL) y sus correspondientes tiempos de retención (min).
- 17-Espectros de absorción de las distintas catinonas.
- 18-Resultados de distintas separaciones cromatográficas realizadas a diferentes temperaturas.
- 19-Recta de calibrado del 3-Fluorometcatinona en fase móvil.
- 20-Recta de calibrado del 4-Metilmecatinona en fase móvil.
- 21-Recta de calibrado de la Pentilona en fase móvil.
- 22-Recta de calibrado del  $\alpha$ -Pirrolidinovalerofenona en fase móvil.
- 23-Representación gráfica de los valores %CV obtenidos de la precisión intradía.
- 24-Representación gráfica de los valores %CV obtenidos de la precisión interdía.
- 25-Cromatograma de fluido oral blanco en UPLC.
- 26-Cromatograma de fluido oral con adición de 0.5  $\mu$ g/mL de cada catinona y 0.1  $\mu$ g/mL de patrón interno en UPLC-PDA.
- 27-Recta de calibrado matrix-matched a nivel alto para 3-Fluorometcatinona.

- 28-Recta de calibrado matrix-matched a nivel alto para 4-Metilmetcatinona.
- 29-Recta de calibrado matrix-matched a nivel alto para la Pentilona.
- 30-Recta de calibrado matrix-matched a nivel alto para la  $\alpha$ -Pirrolidinovalerofenona.
- 31-Recta de calibrado matrix-matched a nivel bajo para 3-Fluorometcatinona.
- 32-Recta de calibrado matrix-matched a nivel bajo para 4-Metilmetcatinona.
- 33-Recta de calibrado matrix-matched a nivel bajo para la Pentilona.
- 34-Recta de calibrado matrix-matched a nivel bajo para  $\alpha$ -Pirrolidinovalerofenona.
- 35-Presición intradía evaluada en el extracto de fluido oral con adición postextracción (n=6).
- 36-Presición interdía evaluada en el extracto de fluido oral con adición postextracción (n=10).
- 37-Presición intradía para dos niveles de concentración adicionados al fluido oral antes de la DLLME (n=4).

## **LISTA DE TABLAS:**

- 1-Principales diferencias entre un HPLC y un UPLC.
- 2-Técnicas de extracción de diferentes cationas y otras drogas.
- 3-Técnicas de separación de diferentes cationas y otras drogas.
- 4-Condiciones gradiente columna UPLC en fase móvil. (A: 0.1% ácido fórmico en agua; B: 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo).
- 5-Tiempos de retención de los compuestos y longitudes de onda de máxima absorción.
- 6-Análisis de regresión en fase móvil.
- 7-Límites de detección y de cuantificación de las distintas cationas.
- 8-Valores de %CV obtenidos de la precisión intradía.
- 9-Valores de %CV obtenidos para la precisión interdía.
- 10-Análisis de regresión en fluido oral.

# ÍNDICE

## RESUMEN/ABSTRACT

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Propiedades de los compuestos a analizar</b>	<b>4</b>
1.1.1 3-Fluorometcatinona	6
1.1.2 4-Metilmecatinona	6
1.1.3 Pentilona	7
1.1.4 $\alpha$ -Pirrolidinovalerofenona	7
<b>1.2 Matriz biológica</b>	<b>8</b>
<b>1.3 Métodos analíticos</b>	<b>9</b>
1.3.1 Técnicas de extracción	9
1.3.1.1 Extracción líquido-líquido (LLE)	9
1.3.1.2 Extracción en fase sólida (SPE)	10
1.3.1.3 Microextracción líquido-líquido (DLLME) dispersiva	10
1.3.2 Técnicas de separación	12
1.3.2.1 UPLC-PDA	13
<b>1.4 Antecedentes bibliográficos</b>	<b>14</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Patrones comerciales</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Reactivos y disolventes</b>	<b>23</b>
<b>3.3 Instrumentación</b>	<b>23</b>
<b>3.4 Material</b>	<b>23</b>
<b>3.5 Preparación de disoluciones</b>	<b>24</b>
<b>3.6 Condiciones cromatográficas</b>	<b>25</b>
<b>3.7 Toma de muestra de fluido oral</b>	<b>25</b>
<b>3.8 Proceso de extracción</b>	<b>26</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Identificación de los compuestos</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Optimización de la temperatura</b>	<b>30</b>
<b>4.3 Validación instrumental del método</b>	<b>31</b>
4.3.1 Linealidad y análisis de regresión	31
4.3.2 Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)	34
4.3.3 Precisión	34
<b>4.4 Aplicación de la DLLME-UPLC-PDA para la determinación de catinonas en fluido oral</b>	<b>36</b>
4.4.1 Selectividad	36
4.4.2 Estudio del efecto matriz	37
4.4.3 Precisión	41
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>44</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>46</b>

## RESUMEN

En los últimos años ha habido un aumento en la comercialización y consumo de nuevas drogas de diseño que no están reguladas por la Convención Nacional de Drogas Psicotrópicas de los Estados Unidos. Dentro de este grupo ha adquirido importancia las catinonas sintéticas. Estas sustancias pueden llegar a ser más potentes y peligrosas que las drogas existentes. Además, se han convertido en la principal causa de muchas muertes por sobredosis.

La determinación de manera individual de las catinonas sintéticas no es una tarea fácil, debido a las distintas modificaciones en los sustituyentes de la molécula base. Por eso se requieren nuevos métodos analíticos para la extracción de estos compuestos en muestras biológicas complejas y su posterior determinación.

En este proyecto, se ha validado y optimizado un nuevo método analítico para la determinación de cuatro catinonas (3-Fluorometcatinona, 4-Metilmecatinona,  $\alpha$ -Pirrolidinovalerofenona y la Pentilona) en fluido oral, utilizando una DLLME como técnica de extracción, seguida de una cromatografía de ultra resolución (UPLC), acoplada a un detector de red de diodos (UPLC-PDA).

Se escogió fluido oral como matriz biológica porque es una muestra no invasiva, fácil de obtener, almacenar y de transportar. Además, la mayoría de los analitos son estables.

## ABSTRACT

In the recent years there has been an increase in the commercialization and consumption of the new designer drugs. They are not regulated by the United National Psychotropic Drugs Convention. In the new designer drugs, synthetic cathinones have become important. This can be more potent and toxic than existing drugs. In addition, they have become the first cause of many deaths from overdose.

The determination of synthetic cathinones is not a simple task because the base structure of cathinone can be suffering many alterations. Therefore, new analytical methods are required for the extraction of these compounds in the biological samples and their detection.

In this project, a new analytical method has been validated and optimized for the determination of 4 different cathinones (3-Fluoromethcathinone, 4-Methylethcathinone, Pentylone and  $\alpha$ -Pyrrolidinovalerophenone) in oral fluid, using a DLLME as a extraction technique, followed by ultra-performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (UPLC-PDA).

The oral fluid was chosen as the biological sample and no other matrices because it is a no invasive sample, easy to obtain, stock up and transport. In addition, most analytes are stable.

## **1- INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

Se denominan nuevas sustancias psicoactivas (NSP) aquellos estupefacientes que no están regulados por la Convención de drogas Psicotrópicas de las Naciones Unidas <sup>(1)</sup>. Se trata de compuestos que intentan imitar los efectos de las drogas ilegales. No solo se trata de nuevas sustancias de síntesis, sino también de otras ya conocidas que se consumen fuera de los contextos tradicionales, así como nuevas vías de distribución para las mismas, en donde Internet tiene un papel fundamental.

La naturaleza de estas sustancias puede ser muy variada: desde productos naturales, a sustancias químicas, sintéticas y semisintéticas, farmacéuticas (intermediarios químicos para la obtención de fármacos) o mezcla de los anteriores <sup>(1)</sup>.

Según el Informe Europeo sobre drogas, el consumo de drogas cada vez es mayor debido a la aparición de estas NSP. En total, se conocen unas 670 sustancias, y cada año se notifica la presencia de alrededor de unas 400 sustancias nuevas. La lista de estas nuevas drogas en el mercado sigue aumentando progresivamente. Estos compuestos se han convertido en la principal causa de muchas muertes por sobredosis <sup>(2)</sup>.

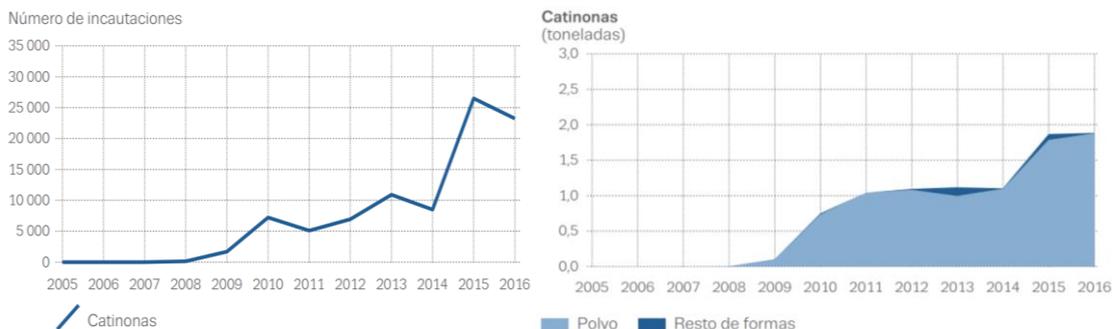
### 1.1 Propiedades de los compuestos a analizar

Las catinonas sintéticas son drogas artificiales que derivan de la catinona, un alcaloide natural que se encuentra en las hojas de khat (*Catha edulis*) y, que produce efectos estimulantes. Khat es un arbusto que crece en el este de África y el Sur de Arabia. Las variantes sintéticas de esta catinona natural, pueden tener efectos más potentes y pueden llegar a ser más peligrosas que las drogas existentes.

Las catinonas sintéticas son un amplio grupo dentro de las sustancias psicoactivas. La primera catinona sintetizada fue la metcatinona, análogo metilado de la catinona, en 1928, aunque fue reconocida como droga de abuso a principios del 1990 <sup>(3)</sup>. Estas han tenido un aumento de consumo rápido y extenso.

Estas sustancias al igual que las drogas de abuso pueden ser adictivas. Sus efectos son similares a los de drogas estimulantes ilegales como anfetamina, cocaína y 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA). Los efectos adversos más comunes causados por su ingesta son cardíacos, psiquiátricos y neurológicos. En general pueden producir euforia, incremento del estado de alerta, taquicardia, hipertensión, alucinaciones e hipertermia, además de conducta violenta, tendencia suicida, ansiedad y depresión <sup>(4)</sup>.

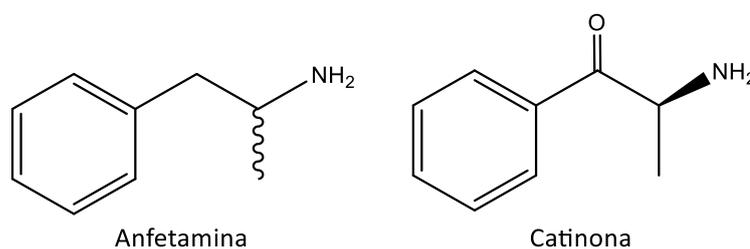
No es sencilla la identificación de manera individual de las catinonas sintéticas, debido a las distintas modificaciones en los sustituyentes de la molécula base, que continuamente van surgiendo en el mercado. Las catinonas sintéticas constituyen el segundo grupo de NSP



**Figura 1**-Incautación de catinonas sintéticas notificadas al sistema de alerta temprana de la UE: tendencias en número de incautaciones y cantidades incautadas (2).

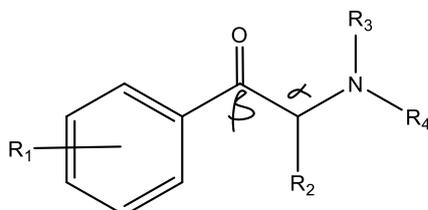
vigiladas por el Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA) y se han detectado un total de 130, de ellas 12 por primera vez en 2017 (2). De los distintos análogos de la catinona natural, en este trabajo se han seleccionado cuatro: 3-Fluorometcatinona, 4-Metilmecatínona,  $\alpha$ -Pirrolidinovalerofenona y la Pentilona, siendo la  $\alpha$ -PVP una de las más incautadas en 2016 (2).

En la figura 2, se muestra la estructura de la catinona, análogo  $\beta$ -cetónico de la anfetamina (5).



**Figura 2**-Estructura química de las anfetaminas y las catinonas.

Las catinonas sustituidas poseen un núcleo de fenetilamina, con un grupo alquilo unido al carbono  $\alpha$  y un grupo cetona unido al carbono  $\beta$ , junto con sustituciones adicionales (figura 3).



**Figura 3**-Estructura química de la catinona sustituida.

Los derivados se pueden obtener por sustitución en cuatro lugares de la molécula de la catinona:

**R<sub>1</sub>**= H o grupos -R, -OR, -X, alquilendioxi o haloalquilo.

**R<sub>2</sub>**= H o cualquier grupo -R.

**R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub>**= H o cualquier grupo -R (o la incorporación en una estructura cíclica).

### 1.1.1 3-Fluorometcatinona

Información del compuesto<sup>(6,7)</sup>:

**Nombre:** 3-Fluorometcatinona

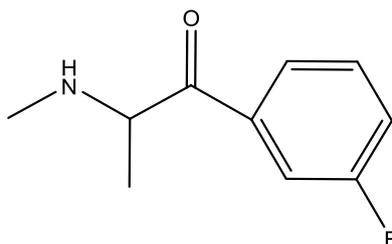
**Nombre IUPAC:** 1-(3-fluorofenil)-2-(metilamino) propan-1-ona

**Abreviatura:** 3-FMC

**Fórmula molecular:** C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>FNO

**Numero CAS:** 1346600-40-5

**Peso molecular:** 181.21 g/mol



*Figura 4-Estructura química del 3-Fluorometcatinona.*

### 1.1.2 4-Metilmecatnina

Información del compuesto<sup>(6,7,8)</sup>:

**Nombre:** 4-Metilmecatnina

**Nombre IUPAC:** 2-(etilamino)-1-(4-metilfenil)propan-1-ona

**Abreviatura:** 4-MEC

**Nombre comercial:** Mefedrona

**Fórmula molecular:** C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>NO

**Numero CAS:** 1225617-18-4

**Peso molecular:** 191.273 g/mol

**Punto de fusión:** 296.8 ± 23°C

**pKa:** 7.43 ± 0.19

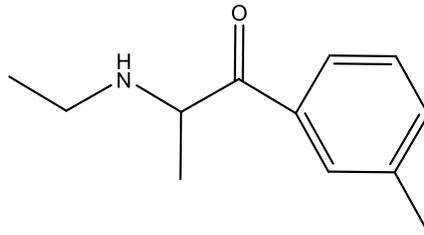


Figura 5-Estructura química de la 4-Metilmecatínona.

### 1.1.3 $\alpha$ -Pirrolidinovalerofenona

Información del compuesto <sup>(6,7,8)</sup>:

**Nombre:**  $\alpha$ -Pirrolidinovalerofenona

**Nombre IUPAC:** 1-fenil-2- (pirrolidin-1-il) pentan-1-ona

**Abreviatura:**  $\alpha$ -PVP

**Nombre comercial:** Fencafemina

**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>NO

**Numero CAS:** 14530-33-7

**Peso molecular:** 231.339 g/mol

**Punto de fusión:** 113°C

**pKa:** 8.49  $\pm$  0.20

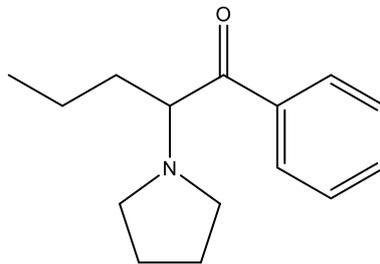


Figura 6-Estructura química de  $\alpha$ -Pirrolidinovalerofenona.

### 1.1.4 Pentilona

Información del compuesto <sup>(6,7,8)</sup>:

**Nombre:** Pentilona

**Nombre IUPAC:** 1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-(metilamino)pentan-1-ona

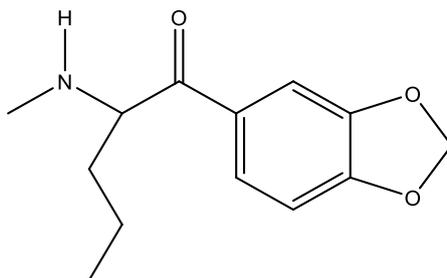
**Fórmula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>

**Numero CAS:** 698963-77-8

**Peso molecular:** 253.283 g/mol

**Punto de fusión:**  $374.7 \pm 42 \text{ }^\circ\text{C}$

**pKa:**  $7.81 \pm 0.20$



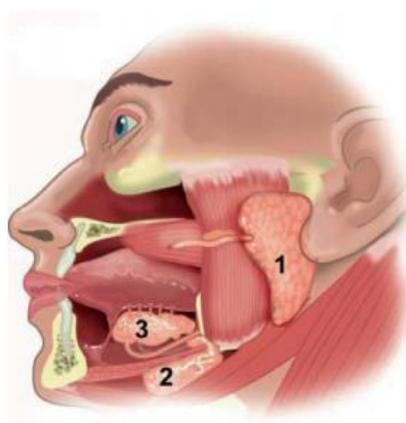
*Figura 7-Estructura química de la Pentilona.*

## 1.2 Matriz biológica

La selección correcta de la muestra, así como su transporte y almacenamiento son algunas de las principales consideraciones en la investigación toxicológica. Las muestras más utilizadas son las de sangre total, plasma, suero, orina, fluido oral y pelo.

La saliva es el producto de excreción originado por tres glándulas salivales principales, la parótida, la submandibular y la sublingual (como se muestra en la figura 8), un número importante de glándulas salivales menores, la mucosa oral y las encías. Como la excreción de este producto es una mezcla de líquidos, el término “fluido oral” es más adecuado<sup>(9)</sup>.

El fluido oral está formado básicamente por agua, que constituye hasta un 99%, además de proteínas y una pequeña proporción de sales minerales. La saliva también puede contener moléculas que han sido transportadas a las glándulas salivales desde los vasos sanguíneos y moléculas producidas por las propias glándulas. Su pH es de 6.0 – 7.0.



*Figura 8-Localización anatómica de las tres glándulas salivales mayores. Glándula parótida (1), glándulas submandibulares (2), y glándula sublingual (3).*

Las principales funciones de la saliva son (10):

- Función digestiva por la insalivación del bolo alimenticio.
- Actúa como capa protectora de las mucosas de la cavidad oral y de las vías respiratorias superiores. También actúa como protectora de los dientes frente al crecimiento bacteriano.

- Facilita la excreción de sustancias propias y extrañas.

Las ventajas del uso del fluido oral en relación con otras muestras biológicas es que es una muestra no invasiva, fácil de obtener, de almacenar y de transportar. La mayoría de los analitos son excepcionalmente estables y es mucho más fácil de manejar para los distintos análisis posteriores<sup>(10)</sup>. Además, la probabilidad de adulteración es baja comparado con las muestras de orina, el riesgo de infección es inferior al de la sangre y se puede reflejar mejor el consumo reciente de drogas. Como desventaja están la posibilidad de contaminación debido a la ingesta de alimentos. El método de recogida de la muestra puede afectar al pH de la saliva y al poco volumen de muestra recolectada<sup>(11)</sup>.

### **1.3 Técnicas analíticas**

#### **1.3.1 Técnicas de extracción**

En toxicología analítica forense, la necesidad de la determinación de varios analitos y sus metabolitos a nivel de trazas en matrices complejas ha hecho de la preparación de muestra el paso más importante y exigente en el análisis<sup>(12)</sup>. A pesar de los avances tecnológicos en el campo analítico, la mayoría de los instrumentos aún no pueden manejar directamente muestras complejas. Por tanto, previamente se necesita un paso de preparación de muestra, cuyo objetivo principal es la separación de los compuestos de interés de la muestra y la concentración de éstos.

Algunas de las técnicas en el tratamiento de la muestra son la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE), pero éstas son lentas y necesitan una gran cantidad de disolvente. Actualmente se han desarrollado nuevos procedimientos de microextracción como la DLLME y los MEPS, considerados como la miniaturización de esas técnicas<sup>(13)</sup>.

##### **1.3.1.1 Extracción líquido-líquido (LLE)**

La extracción líquido-líquido (LLE) es la técnica más utilizada para la extracción de analitos en muestras acuosas. El fundamento de esta técnica se basa en la distribución de la muestra entre dos fases inmiscibles en las cuales el analito y la matriz tienen solubilidades diferentes. Normalmente, una de las fases es un medio acuoso y la otra un disolvente orgánico. Eso implica que los analitos más hidrofílicos quedarán en la fase acuosa, mientras que los hidrofóbicos en la fase orgánica.

Esta técnica permite llevar a cabo extracciones rápidas y generalmente aplicables tanto a la separación de componentes trazas como de concentraciones elevadas.

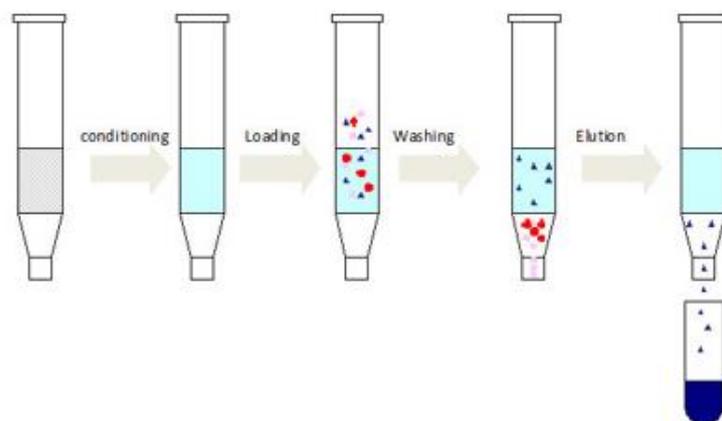
La selectividad y la eficacia del proceso de extracción depende de la elección de los dos disolventes inmiscibles. Pero la selectividad también depende de otros factores como el pH, la adición de un agente complejante, la utilización de sales en la fase acuosa para reducir la solubilidad del analito y la utilización de reactivos formadores de pares iónicos<sup>(14)</sup>.

### 1.3.1.2 Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica de preparación de muestra que se utiliza mucho en laboratorios analíticos y toxicológicos, para la extracción de los analitos de interés de una matriz compleja en estado líquido. Se basa en la diferencia de afinidad que presenta el compuesto por una fase sólida o por la propia muestra líquida. De esta manera, al pasar una muestra acuosa a través de una fase sólida o adsorbente, el analito de interés queda retenido mientras que los otros quedarán inalterados. Dependiendo de la naturaleza de la fase sólida se podrán retener un tipo de compuestos u otros <sup>(14)</sup>.

La SPE implica cuatro pasos principales <sup>(15)</sup>:

- 1- Acondicionamiento: el cartucho, donde se encuentra la fase sólida, se debe acondicionar con un disolvente con propiedades similares a la muestra.
- 2- Carga: se pasa un determinado volumen de muestra por el cartucho a través del adsorbente. Ésta es la etapa en la que los analitos quedan retenidos.
- 3- Lavado: se lava la fase sólida para eliminar posibles impurezas que hayan podido quedar retenidas.
- 4- Elución: se pasa un disolvente que tenga afinidad con los analitos para eluirlos del adsorbente.



*Figura 9-Representación gráfica del procedimiento de SPE.*

Las variables que se deben tener en cuenta en esta técnica son la elección del tipo de fase adsorbente y del disolvente para la concentración previa y/o la limpieza de la fase sólida <sup>(14)</sup>. Esta elección dependerá de los analitos a separar, de su concentración y de la matriz en la que se encuentren.

### 1.3.1.3 Microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME)

La técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) fue desarrollada por Rezaee y sus colaboradores para la extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de agua <sup>(16)</sup>. La DLLME, a diferencia de otras técnicas, se caracteriza por su rapidez, simplicidad y bajo coste. La separación de los analitos se realiza mediante la dispersión de un

solvente, el extractante, en una muestra acuosa. Para lograr la dispersión, se necesita otro disolvente, el dispersante.

Normalmente el extractante es un disolvente orgánico como el clorobenceno, cloroformo o cualquier disolvente con alta densidad, mientras que el dispersante podría ser el metanol acetonitrilo o acetona; disolventes con alta miscibilidad entre la fase extractante y acuosa<sup>(17)</sup>.

La DLLME consta de dos etapas principales:

- 1) Inyección de volúmenes adecuados de los disolventes, tanto extractante como dispersante, en una muestra acuosa. A continuación, se forma una dispersión en forma de gotas muy finas que, facilita la extracción de los analitos de interés de la muestra. La mezcla de los dos disolventes produce una alta turbulencia. Este régimen turbulento da lugar a la formación de pequeñas gotas, que se dispersan por toda la muestra acuosa. El área de superficie entre el solvente de extracción y la muestra acuosa se vuelve muy grande, por lo que el estado de equilibrio se alcanza muy rápidamente y, por tanto, el tiempo de extracción es muy corto.
- 2) La dispersión se elimina mediante una centrifugación y el disolvente de extracción se concentra en una microgota que contiene los analitos, y se recoge para su análisis con una microjeringa.

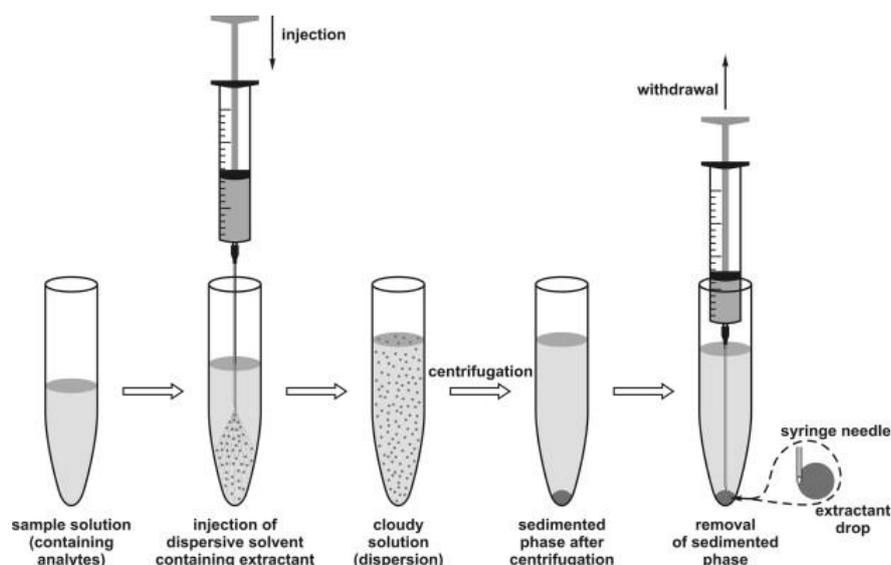


Figura 10-Representación gráfica del procedimiento de DLLME.

Los factores que pueden afectar a esta técnica son la elección adecuada del:

- Disolvente de extracción.
- Disolvente que actúa como dispersante.
- Volumen del disolvente de extracción y dispersión.

En general, se deben cumplir varios requisitos para realizar el aislamiento de los analitos de una muestra utilizando una DLLME. El disolvente dispersante debe ser completamente soluble con la fase acuosa, y el disolvente de extracción debe tener un alto potencial para extraer los analitos de interés. Además, el extractante tiene que ser soluble en el disolvente dispersante. Finalmente, la densidad del solvente de extracción tiene que diferir mucho de la densidad del agua para permitir la separación de las dos fases<sup>(17,18)</sup>.

La selección de los disolventes es importante para obtener un alto factor de enriquecimiento (FE), definido como la relación de la concentración de analito en la fase sedimentada con respecto a la concentración inicial de analito en la muestra<sup>(18)</sup>. Al aumentar el volumen del disolvente de extracción aumenta el volumen de la fase sedimentada obtenida por centrifugación.

Otros parámetros que pueden afectar en la DLLME y que se tienen que optimizar son la cantidad de sal agregada en la muestra y el pH. Este último es particularmente importante en la extracción de analitos polares, para que sean menos soluble en la fase acuosa<sup>(18)</sup>.

### 1.3.2 Técnicas de separación

La separación es un proceso físico, pero a menudo implica procesos químicos. La cromatografía es una técnica analítica que permite la separación, identificación y purificación de los componentes de una mezcla. Esta técnica consiste en la separación de los analitos de una muestra mediante la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos que se establece al ser arrastrados por una fase móvil a través de un lecho que contiene la fase estacionaria (puede ser sólida o líquida)<sup>(14)</sup>.

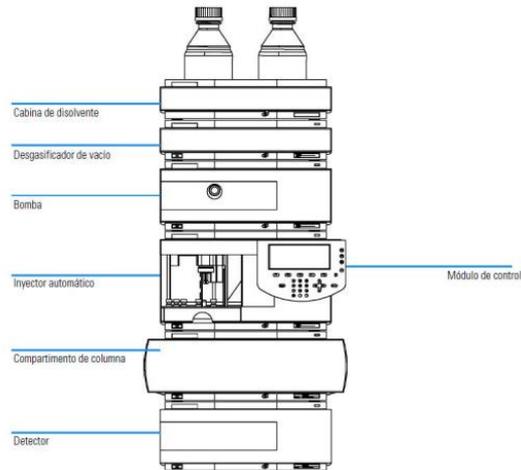
A la hora de elegir la técnica cromatográfica adecuada se debe tener información sobre los compuestos que se quieren separar, ya que dependiendo de sus propiedades se escogerá un tipo u otro. Los distintos tipos de cromatografía que se encuentran son<sup>(14)</sup>:

- Cromatografía de gases (GC): se utiliza cuando los compuestos a separar son volátiles.
- Cromatografía de líquidos (LC): en este caso se utiliza en compuestos no volátiles. Dentro de la LC se encuentran distintos métodos.
  - Cromatografía de intercambio iónico. Principalmente se usa cuando los compuestos a separar son iónicos.
  - Cromatografía de exclusión. Separación mediante el tamaño de los distintos componentes de la muestra. La fase estacionaria normalmente es un polímero.
  - Cromatografía de adsorción. La fase estacionaria adsorbe los analitos de la fase móvil mediante fuerzas de Van der Waals.
  - Cromatografía de afinidad. Es una técnica cromatográfica muy utilizada en análisis bioquímicos. En este caso la molécula se une mediante interacciones no covalentes selectivas con la fase estacionaria, como una enzima a su receptor.
  - Cromatografía de partición. Se utilizan para la separación de moléculas mediante la diferencia de solubilidad entre la fase estacionaria y la muestra. Se encuentran dos tipos distintos: fase normal (se utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, y se usa principalmente cuando la muestra a analizar es de naturaleza apolar) y fase inversa (el contrario de la fase normal).

En cromatografía líquida, un cromatógrafo está formado por las siguientes partes:

- Recipiente para la fase móvil.
- Sistema de inyección: permite la inyección de la muestra. Puede ser automático o manual, mediante una jeringa.

- Bomba: impulsa la fase móvil hacia la columna a una velocidad determinada.
- Horno: para una mejor sensibilidad en la separación cromatográfica. No siempre se utiliza.
- Columna cromatográfica: contiene la fase estacionaria y permite la separación de los distintos compuestos de la muestra.
- Sistema de detección o detector: permite la detección de los compuestos a medida que se eluyen de la columna.
- Sistema de procesamiento de datos: la información obtenida por el detector es enviada a un ordenador donde se procesa para obtener datos cualitativos y cuantitativos.



*Figura 11-Partes de un cromatógrafo de líquidos.*

Estas técnicas han ido evolucionando y mejorando hasta llegar a cromatografías con una elevada selectividad y sensibilidad, HPLC y UPLC, en la que se utiliza básicamente la fase inversa. En este trabajo se ha utilizado un equipo de UPLC-PDA.

### 1.3.2.1 UPLC-PDA

La cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC) es una técnica que evolucionó a partir de la HPLC <sup>(19)</sup>. La principal diferencia entre estas dos es que la UPLC utiliza una fase estacionaria que contenga partículas de menos de 2  $\mu\text{m}$ , mientras que las columnas del HPLC contienen partículas de 3-5  $\mu\text{m}$  <sup>(20)</sup>. El uso de partículas más pequeñas permite obtener una mejor resolución, mayor eficiencia y sensibilidad debido a picos más intensos y altos. También un análisis cromatográfico más rápido.

El uso de partículas más pequeñas en las columnas requiere presiones de operación mayores, lo que implica la necesidad de equipos capaces de soportar estas presiones. Las columnas de HPLC pueden alcanzar una presión máxima de 600 bar, mientras que los sistemas UPLC pueden alcanzar 1200 bar ó más. La capacidad de soportar presiones mayores permite lograr una eficiencia de separación casi 3 veces mayor. La eficiencia es proporcional a la longitud de la columna e inversamente proporcional al tamaño de la partícula <sup>(20)</sup>.

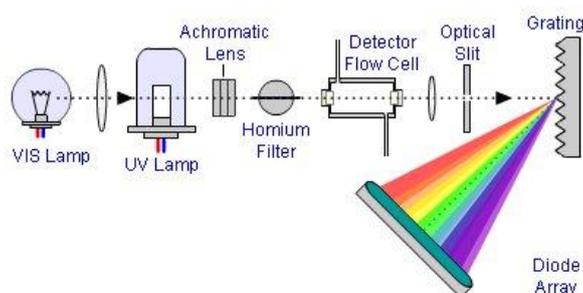
En la tabla 1 se observan algunas de las diferencias más notables entre un HPLC y UPLC <sup>(19)</sup>.

*Tabla 1- Principales diferencias entre un HPLC y un UPLC.*

Características	HPLC	UPLC
Tamaño de partícula	3 a 5 $\mu\text{m}$	Menor a 2 $\mu\text{m}$
Dimensiones de la columna	150 x 3.2 mm	150 x 2.1 mm
Temperatura de la columna	30 $^{\circ}\text{C}$	65 $^{\circ}\text{C}$
Volumen de inyección	5-100 $\mu\text{L}$	2-5 $\mu\text{L}$
Presiones de la columna	Máximo 600 bar	1200 bar o superior

En este trabajo, el detector utilizado es un detector de red de fotodiodos (PDA). El PDA está formado por una serie de fotodiodos, de 500 hasta 1000 <sup>(21)</sup>, colocados en línea recta, capaces de detectar la absorbancia de regiones espectrales desde UV hasta el visible.

La luz, procedente de una lámpara de deuterio, pasa a través de la muestra. A continuación, esta se refleja sobre la ranura de entrada del policromador. El policromador es capaz de dispersar la banda estrecha del espectro en la matriz de diodos de silicio. El fotodiodo convierte la luz en señales eléctricas y las almacena temporalmente. Luego, estas señales son traducidas como absorbancias espectrales <sup>(21)</sup>.



*Figura 12-Esquema del funcionamiento de un detector de red de diodos.*

La gran ventaja de la utilización de un PDA como detector es que se puede obtener el espectro de una misma sustancia a muchas longitudes de onda. Además, se puede realizar la detección de la longitud de onda de máxima absorción de cada analito y la cuantificación de impurezas trazas con una relación señal-ruido baja <sup>(22)</sup>.

#### 1.4 Antecedentes bibliográficos

En las siguientes tablas se recoge un resumen de la revisión bibliográfica realizada sobre las técnicas de extracción (Tabla 2) y de determinación (Tabla 3), más utilizadas para el análisis de diferentes catinonas y otras drogas en distintas matrices biológicas.

Tabla 2-Técnicas de extracción de diferentes catinonas y otras drogas.

Analitos	Matriz	Técnica de extracción	Disolventes de elución	Referencia
18 catinonas distintas	Orina	LLE	10 mL de metil tert-butil éter	(23) 2019
Catinonas sintéticas (Pentilona 4-MEC)	Orina	SPME	50 µL de MeOH	(24) 2018
Catinonas (3-FMC, 4-MEC, α-PVP)	Pelo	Hidrólisis en medio ácido e incubación de la muestra a 40°C	Para la hidrólisis se utiliza 0.1M de HCl en MeOH.	(25) 2017
Catinonas (pentilona, 4-MEC, α-PVP), análogos de la queratina, fenetilaminas y anfetaminas.	Orina y sangre	DLLME	Para la sangre: 200 µL cloroformo como extratante y 500 µL metanol como dispersivo. Para la orina: 100 µL cloroformo como extratante y 250 µL metanol como dispersivo.	(26) 2017
Catinonas (pentilona)	Orina	SPE	3 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /IPA/NH <sub>4</sub> OH (78:20:2)	(27) 2018
Catinonas sintéticas (pentilona, 4-MEC, α-PVP), aminoindanos, fenetilaminas, piperazinas, pipradroles, Sustancias de tipo fenciclidina y triptaminas.	Suero	SPE	Tetrahidrofurano/metanol/agua/hidróxido de amonio (4:3:3:0.5)	(28) 2017
Catinonas sintéticas (4-MEC, α-PVP, 3-FMC)	Orina y sangre	SPE	2% de hidróxido de amonio concentrado en 95:5 diclorometano/isopropílico (v/v).	(29) 2016
Distintas catinonas (pentilona).	Orina	MIP-µ-SPE	2 mL de 75:20:5 heptano/2-propanol/hidróxido de amino.	(30) 2018

<b>Distintas cationonas</b>	Orina	MIP-SPE	1 mL ácido fórmico en metanol (1:99; v/v) dos veces.	(31) 2018
<b>Drogas de abuso y NSP</b>	Fuido oral	US-DLLME	200 µL cloroformo como extratante y 1.4 mL metanol como dispersivo	(32) 2018
<b>Drogas de abuso y NSP</b>	Fluido oral	MEPS	90 µL diclorometano/2-propanol/hidróxido de amonio (78:20:2, v:v:v)	(33) 2017
<b>21 drogas de abuso distintas</b>	Fluido oral	SLE automático	2x 30 µL 0.1% HNO <sub>3</sub> en metanol	(34) 2017

*Tabla 3-Técnicas de separación de diferentes cationonas y otras drogas.*

analito	matriz	Técnica analítica	Columna	Fase móvil	LOD	LOQ	Referencia
<b>Distintas cationonas (3-FMC, 4-MEC) y fenetilamina</b>	Orina	UHPLC-MS UHPSFC-MS	Fenilo (100 x 2.1 mm, 1.7 µm tamaño de partícula)	H <sub>2</sub> O con MeOH (ambos contienen 0.1% ácido fórmico)	-	-	(35) 2018
<b>Pentylone 4-MEC</b>	Orina	GC-MS	DB-5ms (5% fenilo/95% metilpolisiloxano) (30 m x 0.25mm x 0.25 µm espesor de partícula)	He como gas portador	5-25 ng·mL <sup>-1</sup>	25-100 ng· mL <sup>-1</sup> <sup>1</sup>	(24) 2018
<b>Cationonas (3-FMC, 4-MEC, α-PVP)</b>	Pelo	LC-MS/MS	C18 (4.6 mm x 50 mm, 2.6 µm tamaño de partícula).	50nM de formiato de amonio acuoso con agua a un pH = 3.5 (A) y acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico (B)	0.001-0.1 ng/mg pelo	0.1 ng/mg pelo	(25) 2017
<b>Cationonas (pentilona, 4-</b>	Orina y sangre	GC-MS	Columna capilar al 5% fenilo-metilsilicon (30 m x	He como gas portador a 1 mL/min	1-10 ng/mL Para las	1000 ng/mL	(26) 2017

<b>MEC, <math>\alpha</math>-PVP), análogos de la queratina, fenetilaminas y anfetaminas.</b>			0.25 mm y 0.25 $\mu$ m espesor de partícula)		anfetaminas es de 1-50 ng/mL		
<b>Catinonas (pentilona)</b>	Orina	GC-MS	Columna capilar ultra inerte HP-5MS (60 m, 0.25 mm y 0.25 $\mu$ m espesor de partícula)	He como gas portador a 0.8 mL/min	0.26-0.76 $\mu$ g/L	0.86-2.34 $\mu$ g/L	(27) 2018
<b>Catinonas (pentilona)</b>	Plasma	GC-MS	Columna capilar ultra inerte HP-5MS (60 m, 0.25 mm y 0.25 $\mu$ m espesor de partícula)	He como gas portador a 0.8 mL/min	0.26-0.34 $\mu$ g/L	0.89-1.12 $\mu$ g/L	(27) 2018
<b>catinonas sintéticas (pentilona, 4- MEC, <math>\alpha</math>-PVP), aminoindanos, fenetilaminas, piperazinas, pipradroles, Sustancias de tipo fenciclidina y triptaminas.</b>	Suero	LC-MS/MS	C18 (50 mm x 2.1 mm, 1.8 $\mu$ m tamaño de partícula)	2 mM formiato de amonio en agua con ácido fórmico al 0.1% (A) y acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico (B)	0.2-4 $\mu$ g/L	5 $\mu$ g/L	(28) 2017
<b>Catinonas sintéticas (4- MEC, <math>\alpha</math>-PVP, 3- FMC)</b>	Orina y sangre	LC-G/TOF MS	EC-C18 (2.1 mm, 100 mm, 2.7 $\mu$ m tamaño de partícula)	0.1% ácido fórmico en agua (A) y 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo (B)	-	0.25-5 ng/mL	(29) 2016
<b>18 catinonas distintas</b>	Orina	GC-MS	Columna capilar de sílice fundida (17m x 0.2 mm x 0.33 mm de espesor de	He como gas portador	10-30 ng/mL	30-100 ng/mL	(23) 2019

partícula)							
<b>Distintas catinonas (pentilona)</b>	Orina	HPLC-MS/MS	Fase inversa C18 (100 mm x 2.10 mm x 2.6 µm tamaño de partícula)	0.1% de ácido fórmico y formiato de amonio 5 mM en agua ultrapura (A) y 0.1% ácido fórmico en metanol (B).	0.14-1.51 µg/L Dependiendo compuesto	LLOQ= 0.24-2.52 µg/L LOQ= 0.48-5.04 µg/L	(30) 2018
<b>Distintas catinonas</b>	Orina	LC-MS/MS	Columna de fenilo (150 mm x 3 mm x 3.0 µm tamaño de partícula)	10 mM acetato de amonio en agua destilada (A) y metanol (B)	0.011-0.13 ng/mL	-	(31) 2018
<b>Drogas de abuso y NSP</b>	Fluido oral	UPLC-MS/MS	Columna C18 (100 mm x 2.1 mm x 1.7 µm tamaño de partícula)	0.1% ácido fórmico en agua (A) y 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (B)	0.1-25 ng/mL dependiendo compuesto	0.25-50 ng/mL dependiendo compuesto	(32) 2018
<b>Drogas de abuso y NSP</b>	Fluido oral	UPLC-MS/MS	Columna C18 (100 mm x 2.1 mm x 1.7 µm tamaño de partícula)	0.1% ácido fórmico en agua (A) o acetonitrilo (B), 90:10 (v:v)	-	0.5-1 ng/mL, excepto morfina 10 ng/mL	(33) 2017
<b>21 drogas de abuso distintas</b>	Fluido oral	UHPLC-MS/MS	Columna C18 (50 mm x 2.1 mm x 1.7 µm tamaño de partícula)	5 mM formiato de amonio a pH 10.2 (A) y metanol (B)	0.013-0.623 ng/mL dependiendo compuesto	LLOQ= 0.014-1.246 ng/mL dependiendo compuesto	(34) 2017

## **2- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

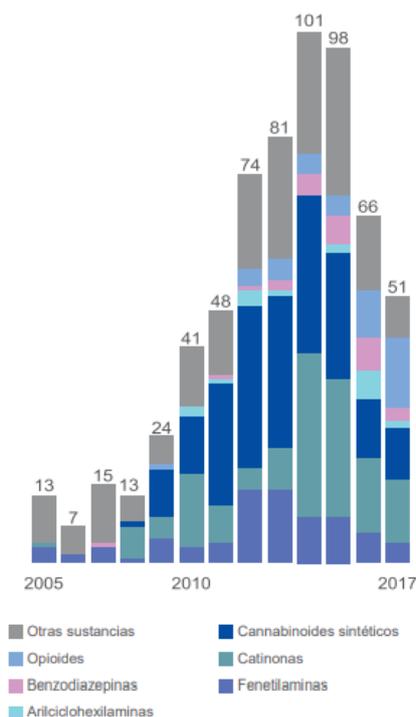
En los últimos años se ha detectado un aumento en la comercialización y consumo de nuevas drogas de diseño, cuya expansión se debe fundamentalmente a la falta de regulación, la facilidad de adquisición a través de internet y la dificultad en su detección. Son las denominadas “drogas emergentes”, que constituyen un amplio grupo de sustancias, de rápida expansión en el mercado <sup>(36)</sup>.

Una característica común a la mayoría de estas sustancias es que no hay muchos datos relativos de los riesgos para la salud humana que puede llevar su consumo. Muchas veces la información obtenida sobre esas sustancias procede, mayoritariamente, de las experiencias de autoconsumo que testimonios escriben por internet.

En el amplio grupo de drogas emergentes han adquirido importancia las catinonas sintéticas, cuyo uso se debe a sus efectos estimulantes y euforizantes, similares a los producidos por la cocaína y las anfetaminas <sup>(2)</sup>. Muchas veces se pueden encontrar mezcladas con otras drogas.

Dado el gran número de modificaciones que puede sufrir la estructura base de la catinona, no es sencilla la identificación de manera individual de las catinonas que continuamente aparecen en el mercado por vía electrónica o en pequeños comercios de manera abierta, aprovechando un vacío legal <sup>(2)</sup>. En la figura 13 se muestran diferentes sustancias que no están siendo objeto de control por los mecanismos internacionales de fiscalización, como las catinonas, los cannabinoides sintéticos, los estimulantes, los opioides y las benzodiazepinas.

La toxicidad y las muertes relacionadas a estas sustancias sintéticas es un motivo de preocupación internacional <sup>(37)</sup>. Por lo tanto, se requieren nuevos métodos analíticos para la extracción de estos compuestos en muestras biológicas complejas y su posterior determinación.



**Figura 13-**Número y categorías de nuevas sustancias psicoactivas notificadas por primera vez al Sistema de alerta temprana de la UE.

Por todo ello, los objetivos de este trabajo son:

- 1- Llevar a cabo una amplia revisión bibliográfica para conocer las características de la matriz biológica seleccionada (fluido oral) y su utilidad en Toxicología, así como las técnicas analíticas de microextracción aplicadas a diversas muestras biológicas.
- 2- Desarrollar un método analítico para identificar y cuantificar cuatro catinonas sintéticas, 3-FMC, 4-MEC, pentilona y  $\alpha$ -PVP, utilizando cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC), acoplada a un detector de red de diodos (PDA), evaluando diferentes componentes de la fase móvil, gradiente, flujo y temperatura de la columna.
- 3- Realizar la validación del método analítico estudiando parámetros como la linealidad y coeficientes de determinación, los límites de detección y cuantificación, selectividad y precisión.
- 4- Evaluar la idoneidad de un procedimiento de microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) para extraer las cuatro catinonas sintéticas a partir de muestras de fluido oral. Evaluación del efecto matriz.



## 3- PARTE EXPERIMENTAL

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Patrones comerciales

- 3-Fluorometcatinona HCl a 1 mg/mL en 1 mL de MeOH (CERILLIANT SIGMA-ALDRICH®).
- 4-metilmecatinona HCl a 1 mg/mL en 1 mL MeOH (CERILLIAMT SIGMA-ALDRICH®).
- $\alpha$ -pirrolidinovalerofenona HCl a 1 mg/mL en 1 mL de MeOH (CERILLIANT SIGMA-ALDRICH®).
- Pentilona HCl a 1 mg/mL en 1 mL de MeOH (CERILLIANT SIGMA-ALDRICH®).
- Trazepam (Laboratorio Sanofi-Synthelabo, Barcelona).

#### 3.2 Reactivos y disolventes

- ACN para LC-MS, LiChrosolv® (MERCK®).
- MeOH grado gradiente para UPLC, CHROMASOLV® (Sigma-Aldrich).
- Ácido fórmico 99% (MERCK®).
- Agua ultrapura, obtenida con un sistema Milli-Q (MILLIPORE®).
- Cloroformo para cromatografía líquida, LiChrosolv® (MERCK®).
- Agua destilada a pH = 8.
- NaCl (MERCK®).

#### 3.3 Instrumentación

- Agitador para tubos de ensayo Reax Control (HEIDOLPH®).

- Balanza SI-234, max 230g, d= 0.1 mg (DENVER INSTRUMENT®).
- Cromatógrafo de líquidos (UPLC) Waters®, modelo Acquity H-Class.
- Detector de fotodiodos Waters®, modelo Acquity UPLC PDA.
- Columna cromatográfica: Acquity UPLC® BEH Shield RP18 (100 x 2.1 mm, 1.7 µm).
- Ordenador con Software Empower Pro 2.
- Paquete informático Microsoft Office Excel 2010.
- Ultracentrífuga (MINICEN).
- pH-metro Basic 20 (CRISON®).
- Baño de ultrasonidos sin calefacción de 5L (PSELECTA).
- Evaporador para muestras con N<sub>2</sub> con baño seco 40°C (VLM EC 1).

### 3.4 Material

- Barras agitadoras.
- Vidrios de reloj.
- Espátulas.
- Embudo cónico.
- Frascos de vidrio color topacio de 5 y 10 mL para disoluciones patrón.
- Frascos lavadores.
- Gradillas.
- Matraces aforados de 1, 2, 5, 10, 500 y 1000 mL.
- Micropipetas de 0,5-100 µL, 100-1000 µL, 20-200 µL, 1000-5000, 1000-5000 (EPPENDORF RESEARCH®).
- Pipetas Pasteur, 15 mm (MARIENFELD®).
- Tubos de fondo cónico (PIREX®15).
- Muestreadores de fluido oral Salivette® (SARSTEDT).
- Tubos cónicos de cristal para evaporar.
- Tubos de plástico para la centrifuga.
- Vasos de precipitados de 25, 50, 100, 250, 600 mL.
- Viales UPLC.
- Tapas PTFE/silicona con Septum para viales (SUPELCO®).
- Microjeringa de 100 µL (HAMILTON BONADUZ SCHWEIZ).

### 3.5 Preparación de disoluciones

- Preparación de la fase móvil, 0.1% de ácido fórmico en agua y 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (90:10 v/v):

Primero se preparan las dos disoluciones por separado, para finalmente obtener una única mezcla de concentración 90:10 v/v. Para cada una se tomó 1 mL de HCOOH en matraces aforados de 1L ó 0.5 mL para 0.5L y se enrasa con agua milliQ o con acetonitrilo. A continuación, se tomaron 900 mL de la disolución 0.1% de ácido fórmico en agua y 100 mL de 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo, para preparar 1 L de fase móvil.

La fase móvil es utilizada para la separación cromatográfica de los patrones de las distintas cationas y para la preparación de algunos patrones.

- Agua a pH 8:

En un vaso de precipitados, con unos 400 mL de agua destilada, se añadió gota a gota una disolución de NaOH 0.5M. El pH se determinó de forma continua mediante un pH-metro.

- Disoluciones madre (100 µg/mL) de cationas:

Las disoluciones madre de las cationas estudiadas se prepararon a partir de los correspondientes patrones comerciales individuales (1000 µg/mL) y se llevaron a 10 mL con MeOH en un matraz aforado, y una concentración final de 100 µg/mL. Posteriormente se pasaron a un frasco de color topacio etiquetado con el nombre, la fecha y la concentración del compuesto. Se almacenaron en el congelador (-20°C) para su mejor conservación.

- Disoluciones de las cationas a distinta concentración:

Se preparan a partir de las disoluciones madre de los compuestos, por dilución con fase móvil (0.1% de ácido fórmico en agua y 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (90:10 v/v)), con unas concentraciones de 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2.5 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.25 µg/mL, 0.1 µg/mL, 0.05 µg/mL y 0.025 µg/mL.

- Disoluciones de control de las cationas en la muestra a distintas concentraciones:

Se preparan a partir de las disoluciones madre de las cationas, por dilución con la muestra, con unas concentraciones de 1 µg/mL, 0.25 µg/mL y 0.1 µg/mL.

### 3.6 Condiciones cromatográficas

La determinación y separación de los distintos compuestos se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (UPLC) Waters, modelo Acquity H-Class. La columna utilizada fue Acquity UPLC™ BEH Shield RP18, de dimensiones 100 mm de largo x 2.1 mm de diámetro interno y 1.7 µm de tamaño de partícula. El detector, acoplado al UPLC, es un detector de fotodiodos Waters®, modelo Acquity UPLC-PDA. El PDA permite obtener un mismo espectro a distintas longitudes de onda, de las cuales se trabajó con 248 nm, 264 nm, 235nm y 254 nm.

Todos los pasos de adquisición y procesado de datos se realizaron con el software Empower Pro 2.

Se utilizó como fase móvil 0.1% de ácido fórmico en agua y 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (90:10 v/v), con un flujo de 0.4 mL/min. La temperatura de la columna para realizar las distintas separaciones fue de 35°C.

Se trabajó en modo gradiente, como se recoge en la tabla 4.

**Tabla 4**-Condiciones gradiente columna UPLC en fase móvil. (A: 0.1% ácido fórmico en agua; B:0.1% ácido fórmico en acetonitrilo).

T (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B
0	0.4	90	10
2.00	0.4	30	70
2.10	0.4	10	90

4.20	0.4	30	70
4.30	0.4	90	10

### 3.7 Toma de muestra de fluido oral

El uso de muestras de fluido oral para el control de drogas se ha convertido en una opción muy interesante puesto que evita realizar pruebas invasivas como es la extracción de sangre. En la figura 14 se muestran las etapas seguidas para la toma de fluido oral utilizando el dispositivo Salivette®. El paciente o sujeto quita la torunda o hisopo de dentro del tubo (ver 1 y 2), la coloca en la boca y mastica durante 45 segundos para estimular la salivación (ver 3). A continuación, el sujeto devuelve la torunda con la saliva absorbida al dispositivo (ver 4) y coloca nuevamente la tapa al tubo (ver 5). El dispositivo es sometido a centrifugación durante 2 minutos a 3000 rpm (aproximadamente), produciendo una muestra clara de saliva en el fondo cónico del tubo (ver 6). Las partículas y los filamentos de moco se recogen en la punta extendida especialmente diseñada del tubo Salivette® (ver 7). El inserto cerrado que contiene el hisopo se desecha higiénicamente. La saliva recuperada ya puede utilizarse para el análisis (ver 8).



Figura 14-Etapas para la toma de muestra de fluido oral mediante el dispositivo Salivette®.

### 3.8 Proceso de extracción

La extracción de las distintas catinonas en el fluido oral se realizó mediante una microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME). Antes de la extracción se necesita un paso previo para precipitar las proteínas presentes en la muestra, y así evitar que éstas interfieran en la extracción y posterior separación.

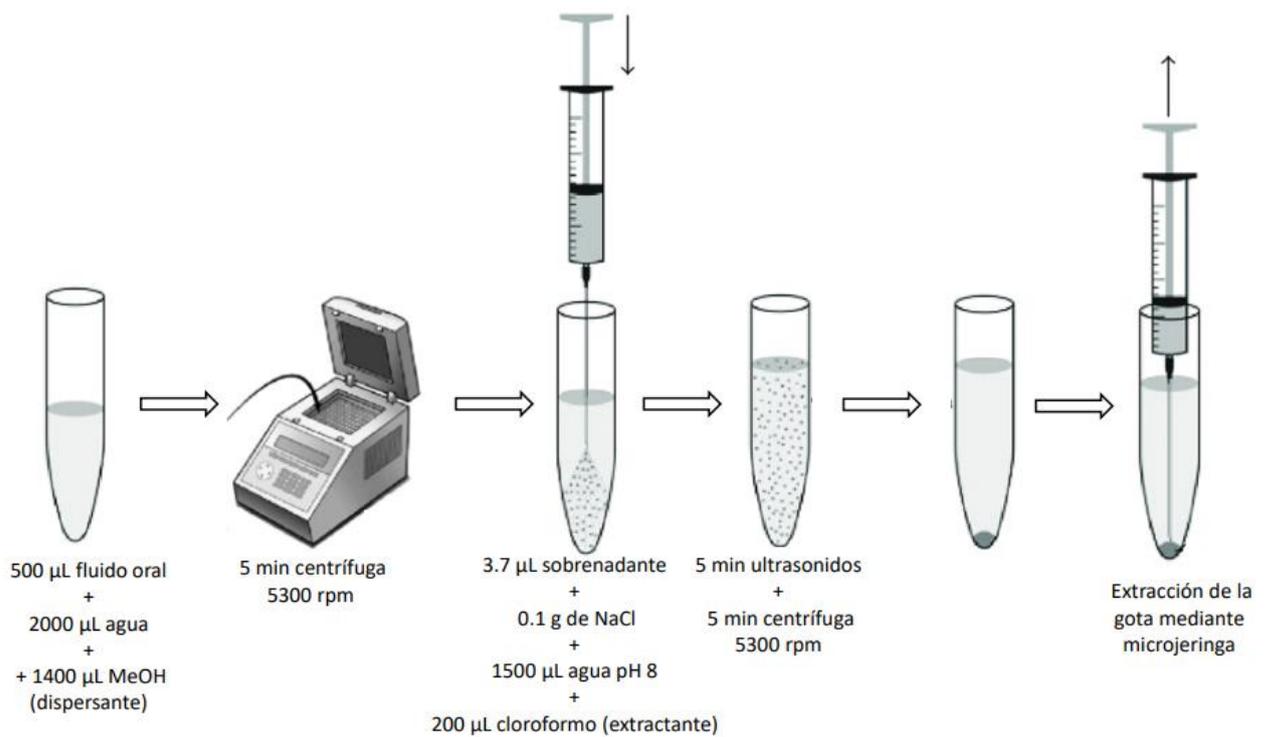
El procedimiento de la extracción es el que se describe a continuación:

- 1) Se añaden 500  $\mu\text{L}$  de muestra y se diluyen con  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ (1:4) en un tubo de centrífuga. Se añaden 1.4 mL de MeOH y se centrifuga durante 5 minutos a 3500 rpm. En este caso el MeOH facilita la precipitación de proteínas y actúa también como disolvente dispersante.
- 2) Se toman 3.7 mL del sobrenadante y se añaden a un tubo de fondo cónico para la DLLME. También se adiciona 1.5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  a pH 8, 0.1 g de NaCl y 200  $\mu\text{L}$  de

cloroformo que actúa como disolvente extractante. Se somete 5 minutos al baño de ultrasonidos, para generar la fase dispersiva y posteriormente se centrifuga 5 minutos a 3500 rpm.

- 3) Se recoge una gota conteniendo el disolvente de extracción, con los analitos, mediante una microjeringa y se deposita a un tubo cónico para la posterior evaporación.
- 4) Se elimina el disolvente mediante un evaporador para muestras con  $N_2$  a  $40^\circ C$ .
- 5) Se reconstituye con 50  $\mu L$  de fase móvil y se inyectan 5  $\mu L$  en el sistema UPLC-PDA.

El procedimiento, descrito anteriormente, ha sido previamente optimizado en el laboratorio para drogas de abuso en fluido oral (incluidas otras cationas) (32), y se muestra esquematizado en la figura 15.



**Figura 15**-Esquema del procedimiento de microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME).

## **4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Identificación de los compuestos.

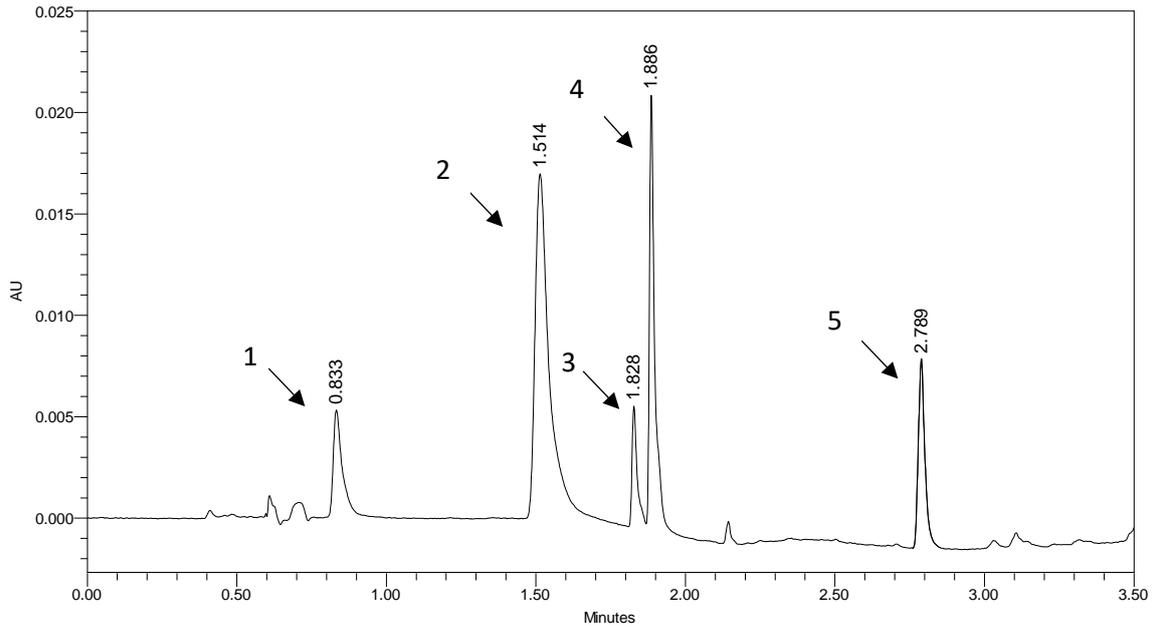
La identificación de los compuestos se ha realizado inyectando cada uno de ellos por separado en el sistema UPLC-PDA.

Al utilizar como detector una red de fotodiodos, el espectro obtenido de cada analito servirá de ayuda para su posterior identificación en mezclas y muestras (figuras 16 y 17), al igual que sus tiempos de retención, como se muestra en la tabla 5 y en el cromatograma de la figura 16.

Como patrón interno (IS) se ha utilizado la benzodiazepina tetracepam. Se escogió esa sustancia porque actúa de forma similar a las catinonas en estudio, pero es suficientemente distintas para poderlas diferenciar. Además, el Comité Europeo para la Evaluación de Riesgos en Farmacovigilancia (PRAC) ha recomendado la suspensión de comercialización de los medicamentos que contienen tetracepam, por lo que no es probable encontrarla en las muestras.

*Tabla 5-Tiempos de retención de los compuestos y longitudes de onda de máxima absorción.*

Número	Compuesto	T <sub>retención</sub> (min)	λ (nm)
1	3-FMC	0.83	248
2	4-MEC	1.51	264
3	Pentilona	1.83	235
4	α-PVP	1.89	254
5	Tetracepam (IS)	2.79	235



**Figura 16-** Cromatograma de una disolución patrón de mezcla de los analitos (1 µg/mL) y sus correspondientes tiempos de retención (min).

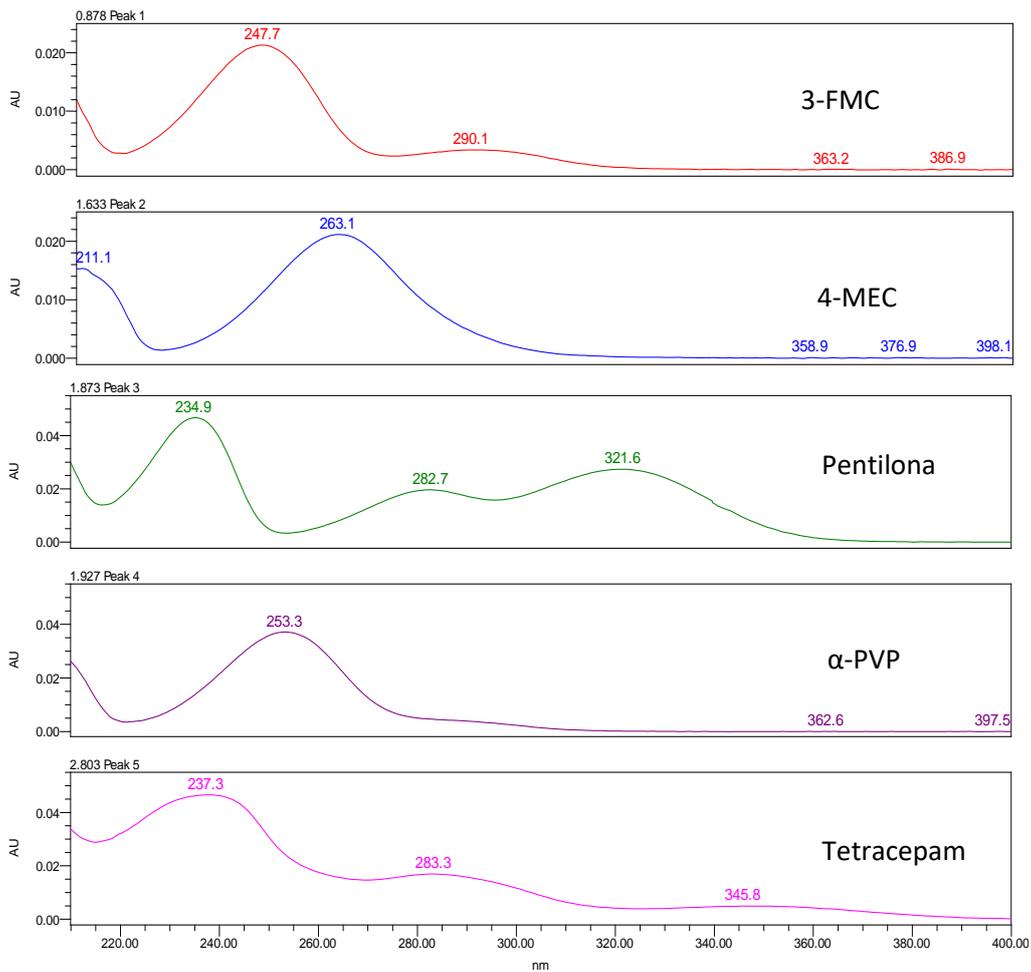


Figura 17-Espectros de absorción de las distintas catinonas.

## 4.2 Optimización de la temperatura

Es necesario determinar a qué temperatura se produce la mejor separación cromatográfica. Para ello se inyecta una disolución de trabajo de 0.5 µg/mL, de las catinonas con el patrón interno, y se realizan distintos experimentos a 55 °C, 45 °C y 35°C. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 18.

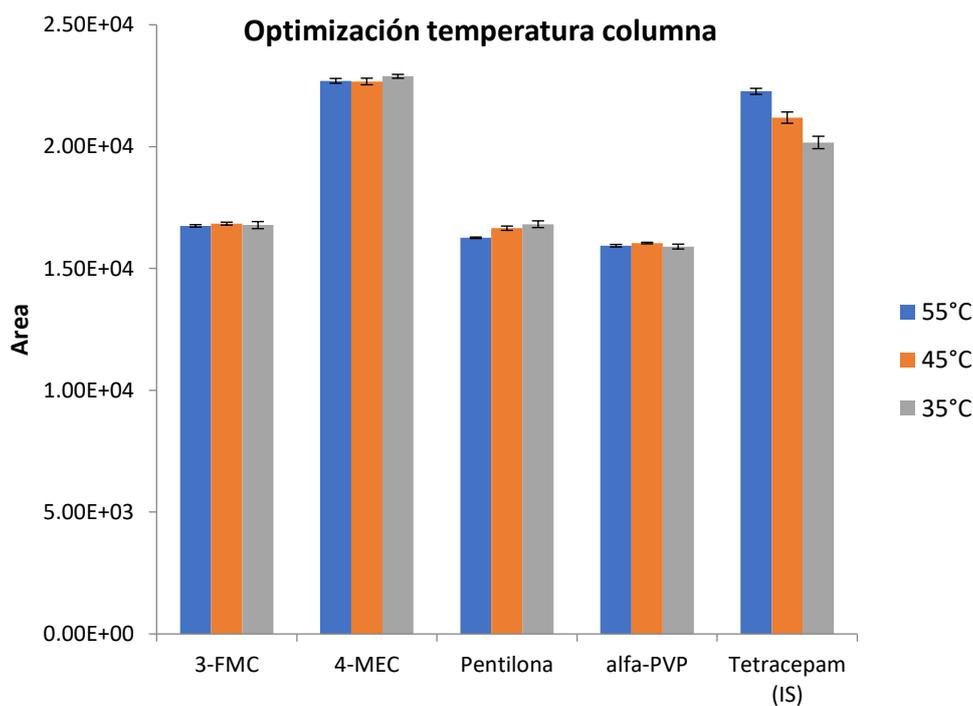


Figura 18-Resultados de distintas separaciones cromatográficas realizadas a diferentes temperaturas.

Tal y como se muestra en la figura 18, la influencia de la temperatura no es muy relevante en la separación cromatográfica. Debido a la poca diferencia que se aprecia entre los valores de área de pico cromatográfico, se selecciona la temperatura menor (35°C). De esta forma se contribuye al aumento de vida media de la columna cromatográfica que no es sometida a temperaturas altas.

## 4.3 Validación instrumental del método

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es apto para el propósito indicado<sup>(38)</sup>. En este trabajo se realizó una validación instrumental, para poner a punto el método cromatográfico, UPLC-PDA utilizado.

En la práctica, los parámetros a evaluar durante el desarrollo de un método son el rango de linealidad y el análisis de regresión, los límites de detención y cuantificación y la precisión<sup>(39)</sup>.

La validación se llevó a cabo siguiendo el protocolo que recoge la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) <sup>(40)</sup> y la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) <sup>(38)</sup>.

#### 4.3.1 Linealidad y análisis de regresión

La linealidad es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad de analito en un rango definido. Si existe una relación lineal entre la concentración y la relación de áreas, los resultados de los distintos experimentos deben evaluarse mediante métodos estadísticos apropiados, por ejemplo, mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de mínimos cuadrados <sup>(38)</sup>.

Para estudiar la linealidad se realizó la calibración del patrón interno, estableciendo seis niveles de concentraciones dentro del rango de 0.025-1 µg/mL (0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 y 1 µg/mL), realizando seis replicados para cada nivel de concentración preparados en fase móvil y con el patrón interno a un nivel de 0.1 µg/mL. A partir de los resultados obtenidos se elaboraron las rectas de calibrado, para cada compuesto, representando la relación de áreas entre el analito y el patrón interno, frente la concentración.

Los datos obtenidos en los distintos experimentos permiten realizar un análisis de regresión que se ajusta a una ecuación del tipo,  $y = b x + a$ , donde “y” es la relación de las áreas, “x” la concentración del analito a estudiar, “a” es la ordenada en el origen y “b” la pendiente de la recta. Además, se puede obtener el coeficiente de determinación, R<sup>2</sup>, que proporciona información sobre la bondad del ajuste ya que mide el porcentaje de la variabilidad total de la variable dependiente “y” que es explicada por la variable dependiente “x”, con la recta de regresión. Su valor será tanto más satisfactorio cuanto más se acerca a la unidad. En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en el estudio sobre la linealidad. Las figuras 19-22 se puede observar que la respuesta es lineal. El coeficiente R<sup>2</sup> es en todos los casos mayor de 0.9914.

*Tabla 6-Análisis de regresión en fase móvil.*

Compuesto	Rango de linealidad (µg/mL)	Ordenada en el origen (a)	Pendiente (b)	R <sup>2</sup>
3-FMC	0.025-1	0.0449	4.7319	0.9928
4-MEC	0.025-1	-0.1105	10.966	0.9917
Pentilona	0.025-1	-0.1627	8.1825	0.9914
α-PVP	0.025-1	-0.0616	7.5625	0.9935

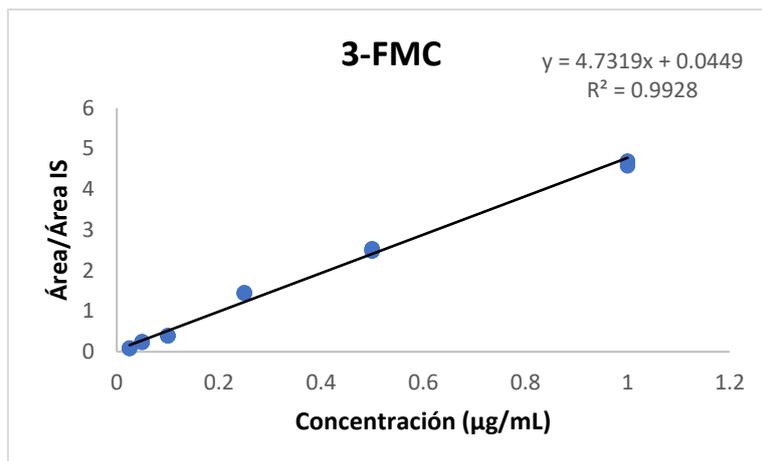


Figura 19-Recta de calibrado del 3-Fluorometcatinona en fase móvil.

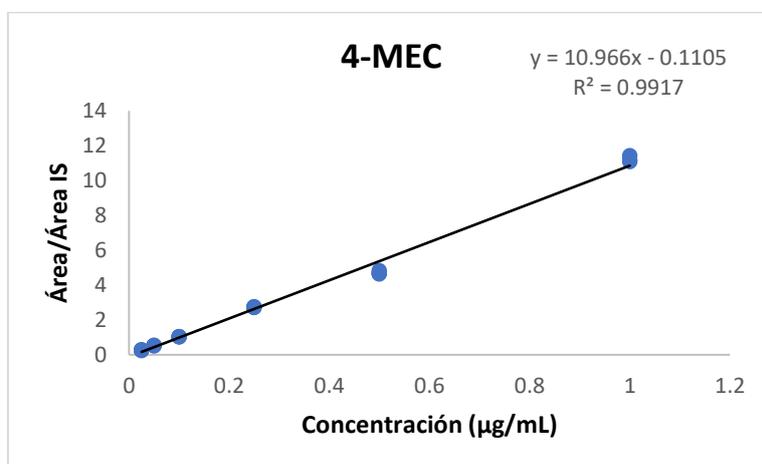


Figura 1-Recta de calibrado del 4-Metilmecatinona en fase móvil.

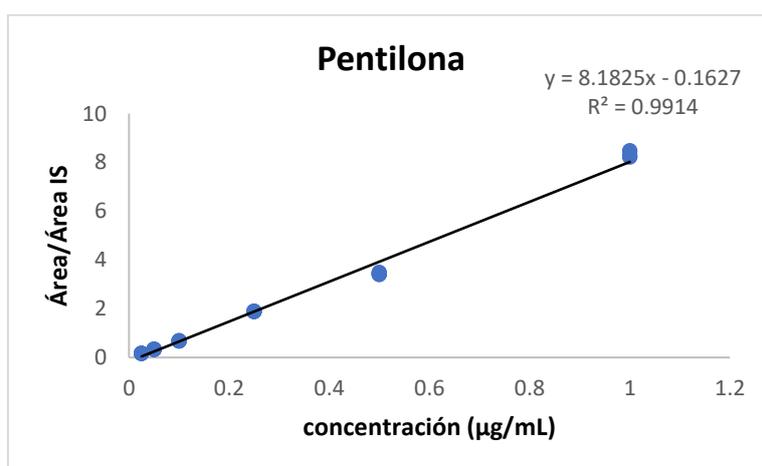


Figura 21-Recta de calibrado de la Pentilona en fase móvil.

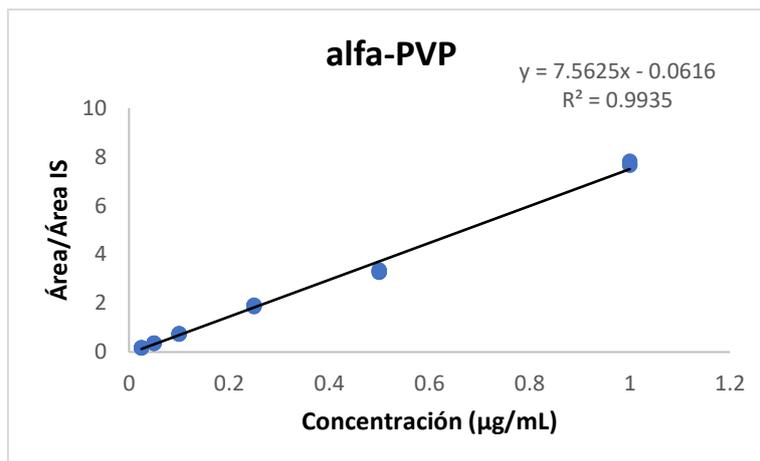


Figura 22-Recta de calibrado del  $\alpha$ -Pirrolidinovalerofenona en fase móvil.

#### 4.3.2 Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) se establecieron de forma experimental con disolución de concentraciones muy bajas de los analitos.

**Límite de detección:** se define como la concentración más baja de un analito que puede diferenciarse del blanco. Se obtiene mediante la determinación de una relación señal/ruido de patrones a concentraciones bajas de analito relacionándolas con el blanco y, estableciendo la concentración mínima a la cual el analito se puede detectar de forma fiable. Una relación señal/ruido de 3 se considera aceptable para estimar el límite de detección<sup>(38)</sup>.

**Límite de cuantificación:** se define como la concentración más baja de un analito que se puede determinar cuantitativamente con la precisión y exactitud adecuadas. Se determina de la misma forma que el LOD, pero en este caso se considera una relación señal/ruido de 10<sup>(38)</sup>.

Los resultados para los LOD y LOQ se muestran en la tabla 6.

Tabla 7-Límites de detección y de cuantificación de las distintas catinonas.

Compuesto	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
3-FMC	0.025	0.05
4-MEC	0.025	0.05
Pentilona	0.025	0.05
$\alpha$ -PVP	0.025	0.05

#### 4.3.3 Precisión

La precisión se calcula realizando medidas repetidas en condiciones específicas. Demuestra la habilidad de un método analítico para producir resultados consistentes. Se pueden distinguir dos tipos<sup>(39)</sup>:

**Precisión intradía:** Proporciona información sobre la repetibilidad de distintas mediciones realizadas por el mismo analista, con el mismo instrumento en un corto plazo de tiempo (mismo día).

**Precisión interdía:** Proporciona información sobre la precisión media de distintas mediciones realizadas en el mismo laboratorio, pero en condiciones que son más variables (diferentes analistas, diferentes días, diferentes instrumentos analíticos, etc.). En este caso se realizaron medidas repetidas en 3 días consecutivos. También se puede denominar reproducibilidad.

Con los datos que se obtienen se calcula la media aritmética, la desviación estándar y finalmente el coeficiente de variación (CV) experimental. El CV se puede definir como:

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$$

Donde s es la desviación estándar y  $\bar{X}$  la media aritmética.

El CV no debe superar el 15% para las distintas concentraciones, excepto para el LOQ, que puede tener un valor como máximo del 20%<sup>(41)</sup>, como se recoge en las Guías de Validación, FDA.

Para la determinación de la precisión se ha utilizado disoluciones control a tres niveles de concentración 0.05 µg/mL, 0.25 µg/mL y 0.5 µg/mL para las distintas catinonas y con el patrón interno a un nivel de 0.1 µg/mL.

Para la precisión intradía, se realizaron 5 replicados de cada nivel de concentración (n=5). En el caso de la precisión interdía, se realizaron 15 replicados (n=15). Los valores de %CV obtenidos se reflejan en las tablas 8 y 9 y en las figuras 23 y 24.

*Tabla 8-Valores de %CV obtenidos de la precisión intradía.*

Compuesto	0.05 µg/mL (LOQ)	0.25 µg/mL	0.5 µg/mL
3-FMC	1.124	0.581	0.208
4-MEC	0.686	0.642	0.247
Pentilona	1.238	0.242	0.415
α-PVP	0.937	0.496	0.256

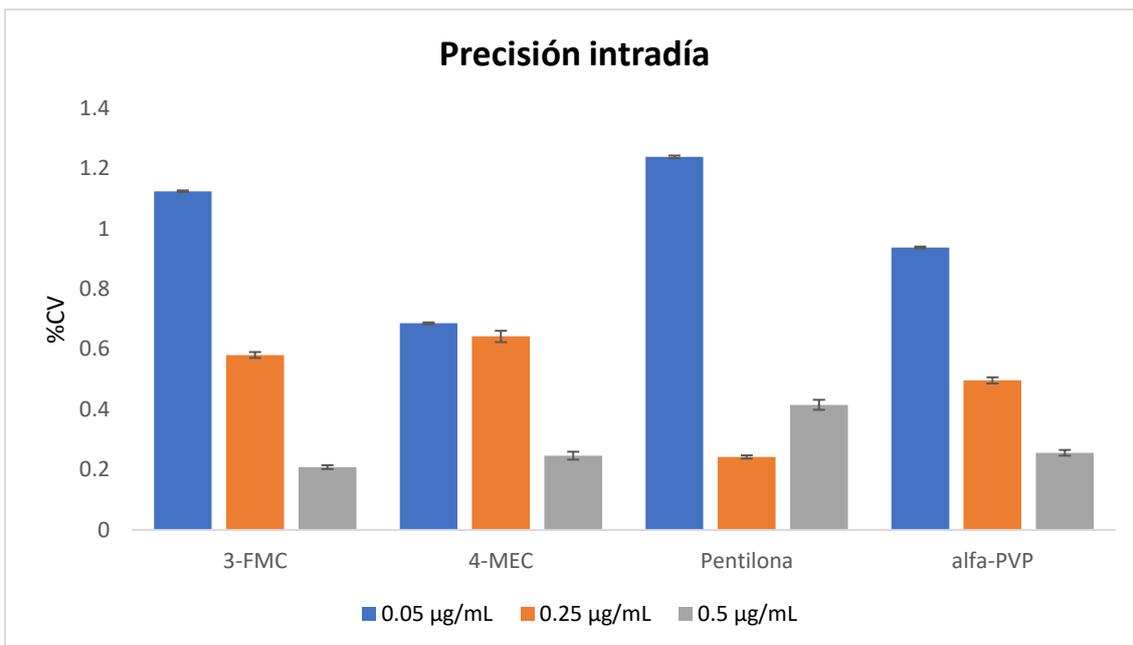


Figura 23-Representación gráfica de los valores %CV obtenidos de la precisión intradía.

Tabla 9-Valores de %CV obtenidos para la precisión interdía.

Compuesto	0.05 µg/mL (LOQ)	0.25 µg/mL	0.5 µg/mL
3-FMC	2.705	9.060	8.177
4-MEC	7.483	2.763	5.670
Pentilona	3.267	5.299	6.911
α-PVP	4.591	3.710	5.471

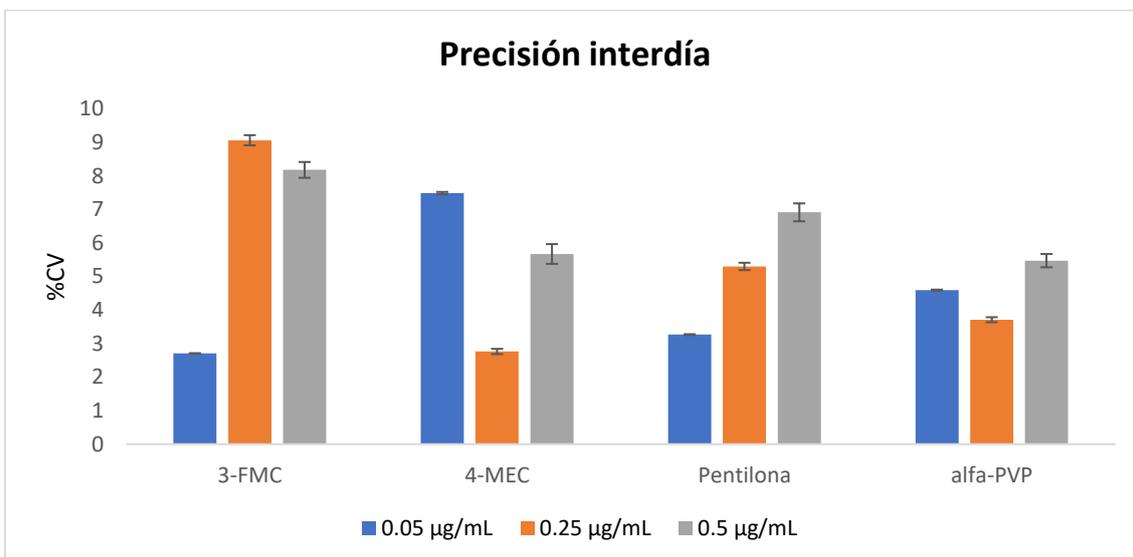


Figura 24-Representación gráfica de los valores %CV obtenidos de la precisión interdía.

#### 4.4 Aplicación de la DLLME-UPLC-PDA a la determinación de catinonas en fluido oral.

#### 4.4.1 Selectividad

La selectividad es la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en presencia de otros componentes en la muestra. Existen diferentes métodos para evaluar la selectividad, el más sencillo es demostrar la ausencia de respuesta en un blanco de la matriz biológica en estudio.

Se realiza un análisis de 5 muestras blanco de distinta procedencia y posteriormente, se examinan los cromatogramas en los tiempos de retención de los analitos de interés como se muestra en las figuras 25 y 26.

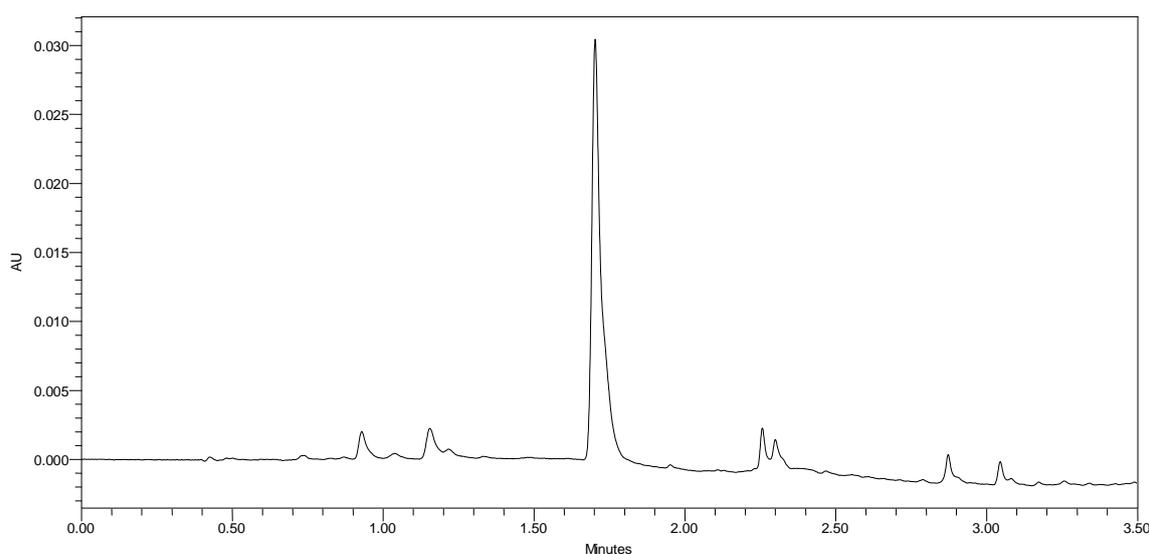


Figura 25-Cromatograma de fluido oral blanco en UPLC.

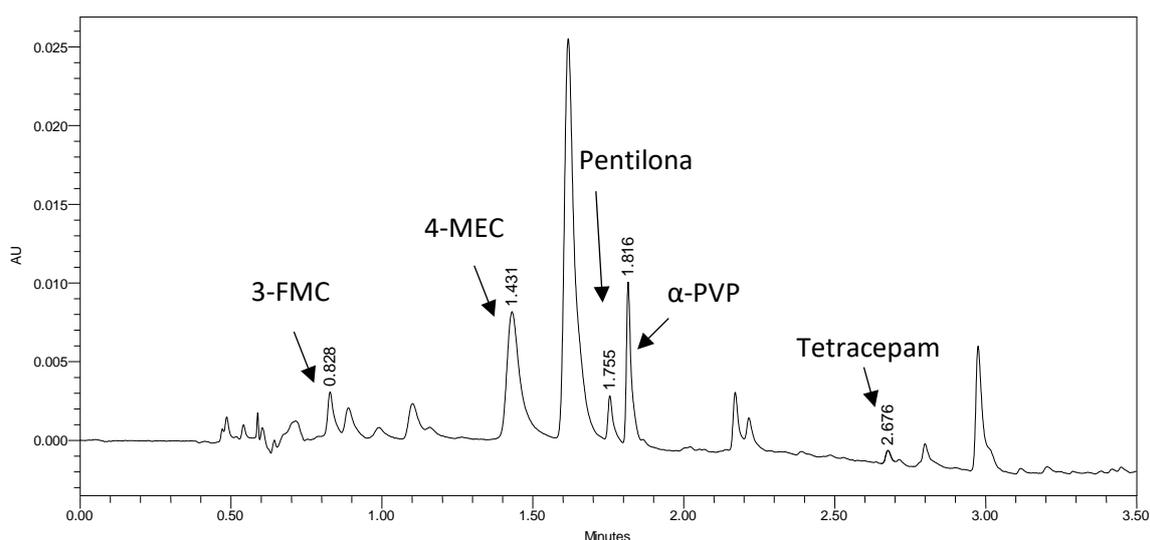


Figura 26-Cromatograma de fluido oral con adición de 0.5  $\mu\text{g/mL}$  de cada catinona y 0.1  $\mu\text{g/mL}$  de patrón interno en UPLC-PDA.

Como se observa en las figuras 25 y 26, se trata de un método selectivo, al no aparecer compuestos interferentes en los tiempos de retención de las catinonas estudiadas.

#### 4.4.2 Estudio del efecto matriz

El efecto matriz consiste en una disminución o aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otros componentes. Para la misma concentración de analito, el análisis de una muestra real o de una disolución estándar no proporciona la misma respuesta instrumental. Para evaluar el efecto matriz se recomienda construir una recta de calibrado en matriz, tomando una muestra lo más parecida posible a la muestra problema, pero libre de analitos. Sin embargo, el efecto matriz puede variar de una muestra a otra y, además, a veces no se puede disponer del volumen suficiente de muestras o que la muestra esté libre de los analitos de interés<sup>(42)</sup>. Existen distintas técnicas que permiten un estudio del efecto matriz.

En este trabajo se utilizó la calibración denominada matrix-matched, que consiste en la adición de concentraciones conocidas de analitos en el extracto de muestra obtenida tras la DLLME. Se consideraron cuatro/cinco (tres replicados por nivel) niveles de concentración en un rango bajo de concentración y en un rango alto. A partir de los resultados obtenidos se elaboraron distintas rectas de calibrado, una para cada compuesto, representando la relación de áreas entre el analito y el patrón interno, frente a la concentración (tabla 10 y figuras de la 27 a la 34). El patrón interno (tetracepam) fue adicionado a un nivel de concentración de 0.1 µg/mL para el calibrado de rango bajo y de 1 µg/mL para el calibrado de rango alto.

*Tabla 10-Análisis de regresión en fluido oral.*

Compuesto	Rango de linealidad (µg/mL)	Ordenada en el origen (a)	Pendiente (b)	R <sup>2</sup>
3-FMC	0.5-5.0	0.004	0.0643	0.9940
	0.05-0.5	-0.0136	12.767	0.9923
4-MEC	0.5-5.0	-0.0278	0.1137	0.9966
	0.05-1.0	-0.0327	16.33	0.9963
Pentilona	0.5-10	-0.2516	1.2674	0.9992
	0.05-1.0	-0.2490	14.642	0.9928
α-PVP	0.5-10	-0.0756	1.0326	0.9993
	0.05-1.0	-0.0657	13.78	0.9952

La presencia del efecto matriz se evaluó comparando la pendiente del calibrado matrix-matched de rango bajo con las pendientes del calibrado realizado en fase móvil para cada una de las catinonas. Se ha calculado el porcentaje de efecto matriz en fluido oral, obteniendo los siguientes valores: 269% para 3-FMC; 149% para 4-MEC; 178% para pentilona y 182% para α-PVP. Se observa un marcado efecto matriz para todos los compuestos.

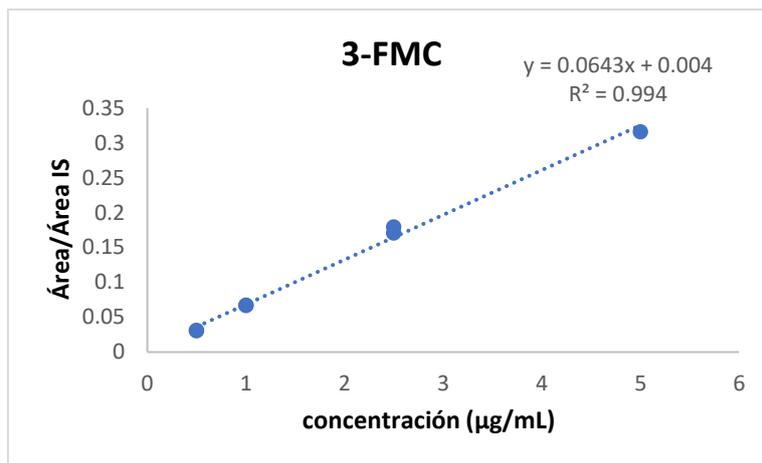


Figura 27-Recta de calibrado matrix-matched a nivel alto para 3-Fluorometcatinona.

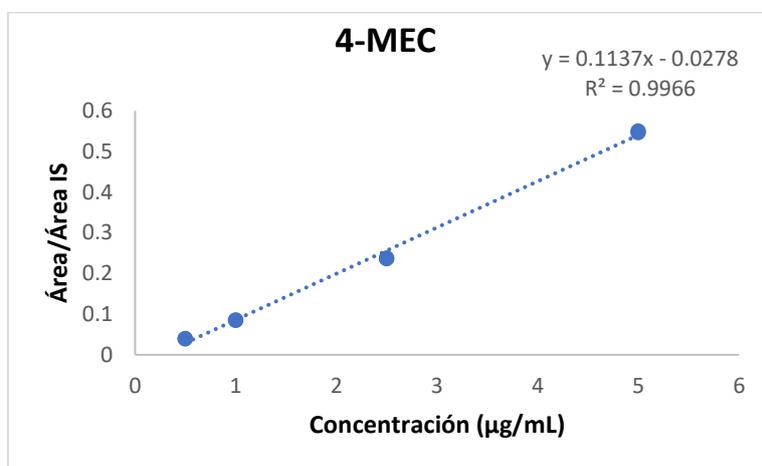


Figura 28-Recta de calibrado matrix-matched a nivel alto para 4-Metilmecatnina.

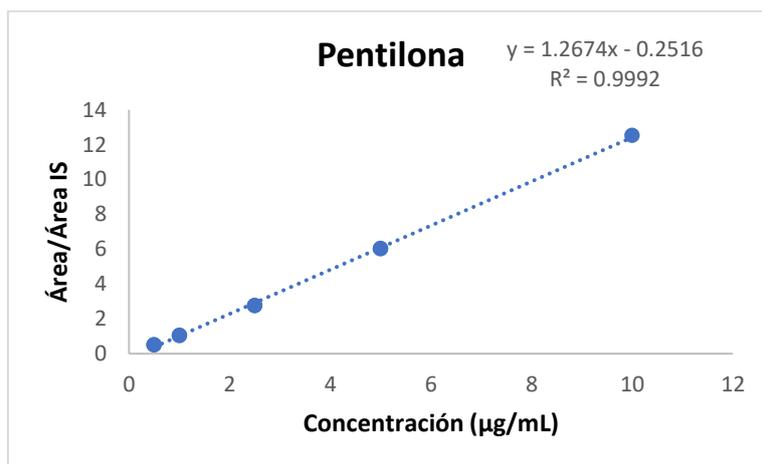


Figura 29-Recta de calibrado matrix-matched a nivel alto para la Pentilona.

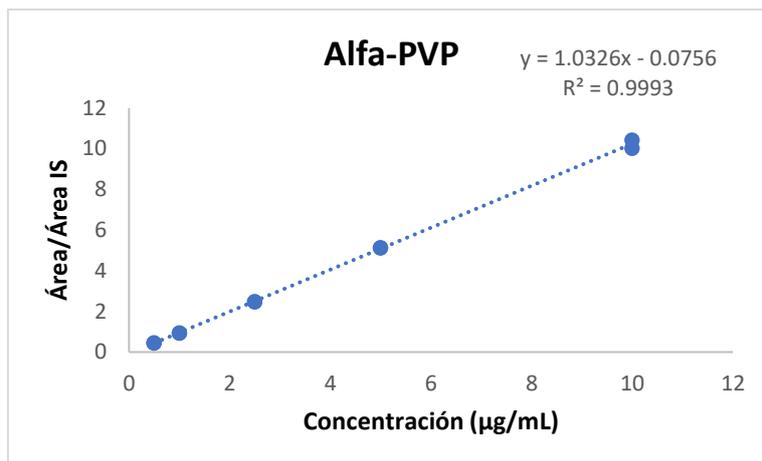


Figura 30-Recta de calibrado matrix-matched a nivel alto para la  $\alpha$ -Pirrolidinovalerofenona.

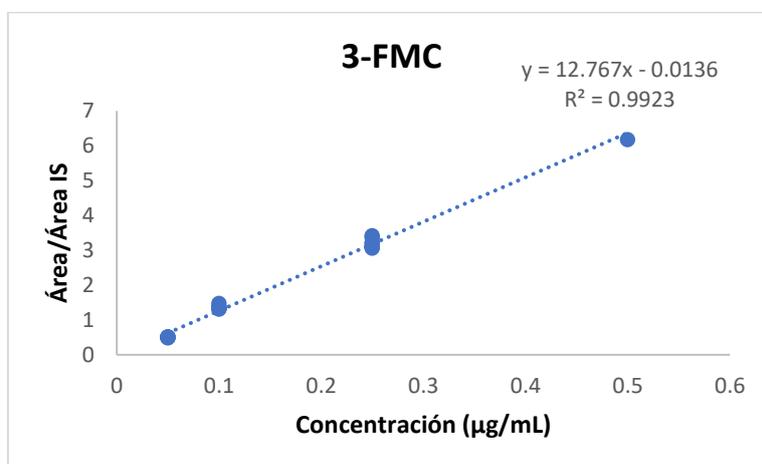


Figura 31-Recta de calibrado matrix-matched a nivel bajo para 3-Fluorometcatinona.

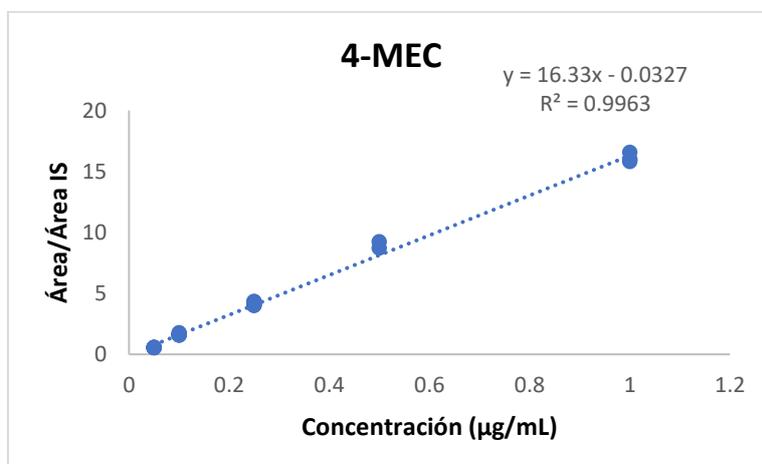
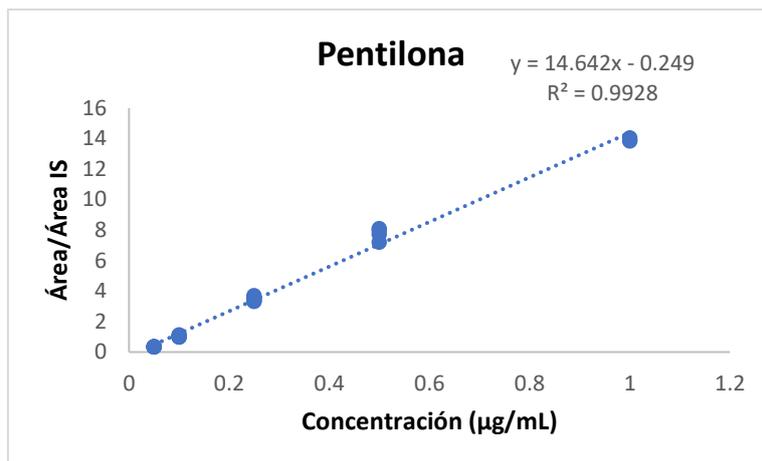
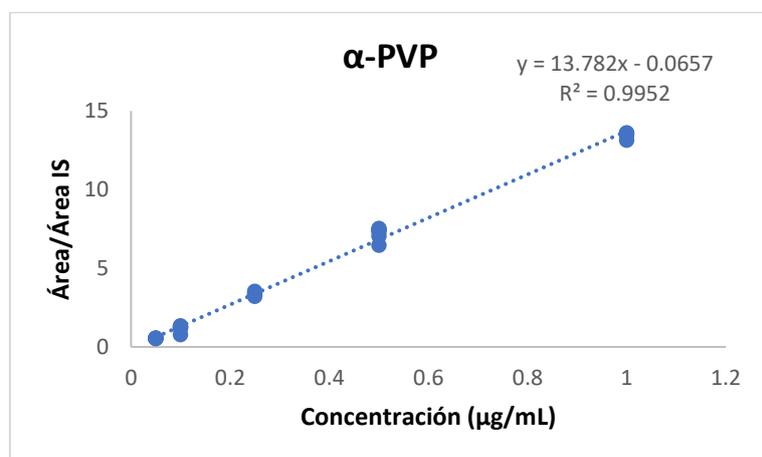


Figura 32-Recta de calibrado matrix-matched a nivel bajo para 4-Metilmecatinona.



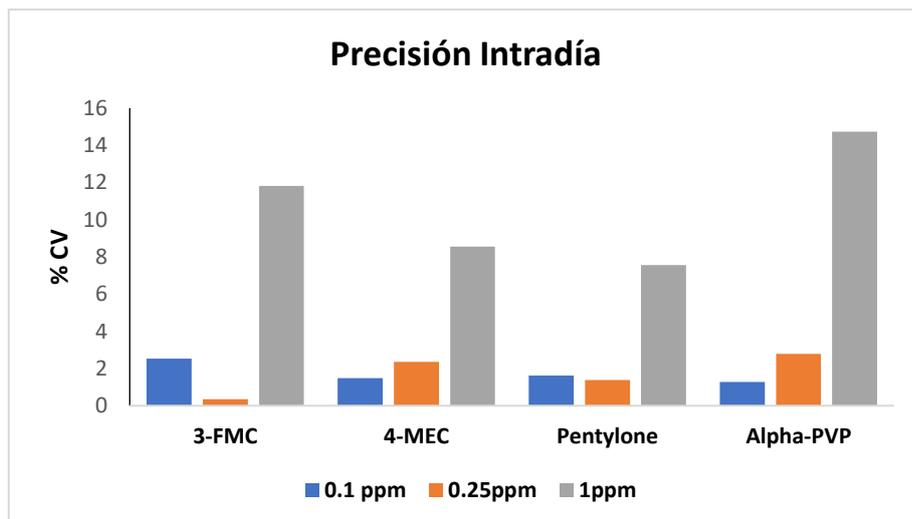
*Figura 33-Recta de calibrado matrix-matched a nivel bajo para la Pentilona.*



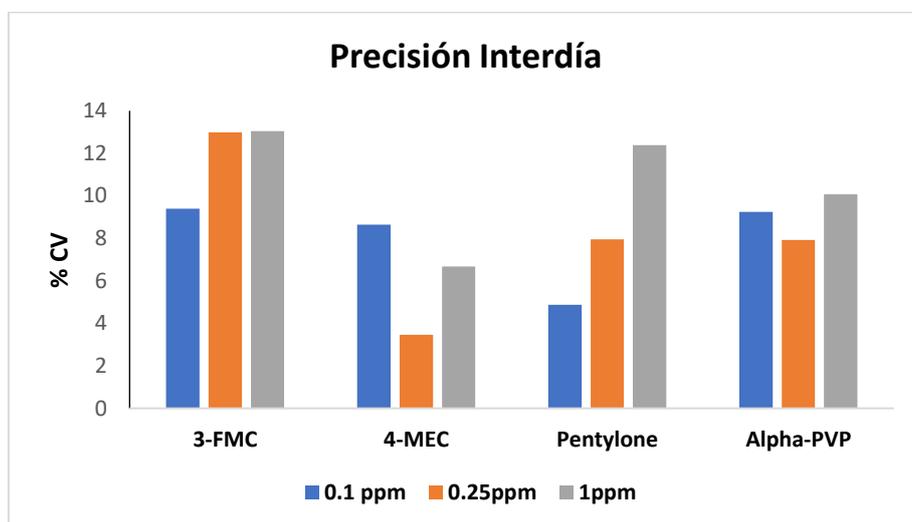
*Figura 34-Recta de calibrado matrix-matched a nivel bajo para α-Pirrolidinovalerofenona.*

#### 4.4.3 Precisión

La precisión del método DLLME-UPLC-PDA se ha evaluado a tres niveles de concentración (0.1, 0.25 y 1.0 µg/mL) adicionados al extracto de muestras blanco de fluido oral como se muestra en las figuras 35 y 36. Para la precisión intradía se ha realizado 6 replicados (n=6) y para la precisión interdía se ha realizado 10 replicados (n=10).

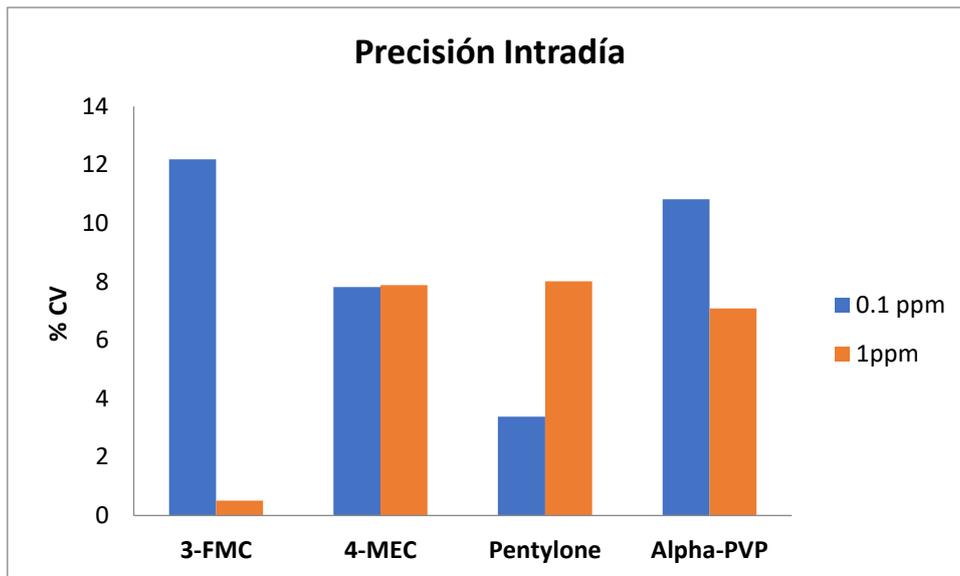


*Figura 35-Precisión intradía evaluada en el extracto de fluido oral con adición postextracción (n=6).*



*Figura 36-Precisión interdía evaluada en el extracto de fluido oral con adición postextracción (n=10).*

La precisión del método DLLME-UPLC-PDA se ha evaluado a dos niveles de concentración (0.1 µg/mL y 1.0 µg/mL) adicionados a muestras blanco de fluido oral antes de realizar la DLLME como se muestra en la figura 37 para la precisión intradía (n=4).



*Figura 37*-Precisión intradía para dos niveles de concentración adicionados al fluido oral antes de la DLLME (n=4).

## **5- CONCLUSIONES**

## 5. CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado un nuevo método analítico para identificar y cuantificar 4 catinonas sintéticas (3-Fluorometcatinona, 4-Metilmecatinona,  $\alpha$ -Pirrolidinovalerofenona y la Pentilona) en fluido oral, utilizando cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC), acoplada a un detector de red de diodos (PDA).
- Los parámetros de validación obtenidos para todos los compuestos fueron aceptables: los coeficientes de correlación lineal fueron altos ( $R^2 > 0.9914$ ); el límite de detección fue de 0.025  $\mu\text{g/mL}$  y el de cuantificación de 0.05  $\mu\text{g/mL}$ ; la precisión y los coeficientes de variación (%CV) no superan en ningún caso el 15%.
- En la determinación de las catinonas mediante la DLLME acoplada a una UPLC-PDA se obtuvieron unos parámetros de correlación lineal aceptables, tanto a niveles bajos y altos de concentración. El efecto matriz es significativo para todos los compuestos. Los coeficientes de variación obtenidos también fueron aceptables, tanto en la adición previa como la posterior de los analitos.
- Se escogió fluido oral como matriz biológica porque es una muestra no invasiva, fácil de almacenar y de transportar. Además, la mayoría de los analitos son estables y la probabilidad de adulteración es menor comparando con otras muestras como la sangre y la orina.

## CONCLUSIONS

- An analytical method has been developed to identify and quantify four synthetic cathinones (3-Fluoromethcathinone, 4-Methylethcathinone, Pentylone and  $\alpha$ -Pyrrolidinocalerophenone) in oral fluid, using ultra performance liquid chromatography (UPLC), coupled to a diode array detector (PDA).
- In the instrument validation all parameters obtained were acceptable: linear correlation coefficients were high ( $R^2 > 0.9914$ ); detection limits were established in 0.025  $\mu\text{g/mL}$  and quantification limits were established in 0.05  $\mu\text{g/mL}$ ; the accuracy or variation coefficients (%CV) do not exceed 15% in any case.
- In the cathinones extraction using DLLME coupled to an UPLC-PDA the parameters obtained in linear correlation in high and low concentration were acceptable ( $R^2 > 0.9928$ ). The matrix effect was very significant for all compounds. The variation coefficients (%CV) were accepted in the pre-extraction addition and post-extraction addition, too.
- The oral fluid was chosen as the biological samples and no other matrices because it is a no invasive sample, easy to stock up and transport. In addition, most analytes are stable, and the probability of adulteration was low compared to other samples such as blood and urine.

## **6- BIBLIOGRAFÍA**

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Dolengevich-Segal, Helen; Rodríguez Salgado, Beatriz; Gómez-Arnay Ramírez, Jorge y Sánchez-Mateos, Daniel. *New Psychoactive Drugs. Adicciones*. **2015**, 27, 231-232.
2. Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías. *Informe Europeo sobre Drogas*. EMCDDA, Luxemburgo, 2018. ISSN: 978-92-9497-318-4.
3. Espert Tortajada, Raúl; Pérez San Miguel, Joana; GAdea Doménech, Marien; Oltra-Cucarella, Javier; Aliño Costa, Marta. Emerging drugs: synthetic cathinones ("bath salts"). *AESED*. **2015**, 40, 56-71.
4. NIDA. *Synthetic cathinones ("bath salts")*. National Institute on Drug Abuse, 5 Feb. 2018, <https://www.drugabuse.gov/publications/drugfacts/synthetic-cathinones-bath-salts>. (Acceso: Marzo 24, 2019).
5. Comisión Clínica de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre. *Drogas Emergentes*. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, España, 2011. ISBN: 978-84-920522-8-8.
6. PubChem. U.S. National Library of Medicine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. (Acceso: Marzo 26, 2019).
7. SciFinder. <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>. (Acceso: Marzo 26, 2019).
8. Drug Bank. <https://www.drugbank.ca/>. (Acceso: Marzo de, 2019).
9. Anizan, S. y Huestis, M.A. The potential Role of Oral Fluid in Antidoping Testing. *Clin. Chem*. **2014**, 60, 307-322. DOI: 10.1373/clinchem.2013.209676
10. Sánchez Martínez, M<sup>a</sup> Pilar. La saliva como fluido diagnóstico. *SEQC*. **2013**, 16, 93-108.
11. Bosker, WM. y Huestis, MA. Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clin. Chem*. **2009**, 55, 1910-1931. DOI: 10.1373/clinchem.2008.108670.
12. Samanidou, V.; Kovatsi, L.; Fragou, D.; Rentifis, K. Novel strategies for sample preparation in forensic toxicology. *Bioanal*. **2011**, 3, 2019-2046. DOI: 10.4155/bio.11.168.
13. Kabir, Abuzar, Locatelli, Marcello y Ulusoy, Halil Ibrahim. Recent Trends in Microextraction Techniques Employed in Analytical and Bioanalytical Sample Preparation. *J. Separations*, **2017**, 4. DOI: doi:10.3390/separations4040036.
14. Cela, Rafael; Lorenzo, Rosa A; y Casais, M<sup>a</sup> del Carmen. *Técnicas de separación en química analítica*. Síntesis: Madrid, 2003; ISSN: 84-9756-028-0.
15. Affinisep. <https://www.affinisep.com/technology/solid-phase-extraction/>. (Acceso Febrero 7, 2019).
16. Rezaee, Mohammad; Assadi, Yaghoub; Milani Hosseini, Mohammad-Reza; Aghaee, Elham; Ahmadi, Fardin y Berijani, Sana. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatog. A*. **2006**, 1116, 1-9. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.03.007.

17. Jain, Rajeev y Singh, Ritu. Applications of dispersive liquid–liquid micro-extraction in forensic toxicology. *TrAC*. **2016**, 75, 227-237. DOI: 10.1016/j.trac.2015.07.007.
18. Zgoła-Grzeskowiak, Agnieszka y Grzeskowiak, Tomasz. Dispersive liquid-liquid microextraction. *Trends Anal. Chem.* **2011**, 30, 1382-1399. DOI: 10.1016/j.trac.2011.04.014.
19. Taleuzzaman, M.; Ali, S.; Gilani, SJ.; Imam, SS. y Hafeez, A. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review. *J. Anal. Pharm. Chem.* **2015**, 2, 1281-8913. ISSN:2381-8913.
20. Gumustas, Mehmet; Kurbanoglu, Sevinc; Uslu, Bengi y Ozkan, Sibel A. UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatog.* **2013**, 76, 1612-1112. DOI: 10.1007/s10337-013-2477-8.
21. Es'haghi, Zarrin. Photodiode Array Detection in Clinical Applications; Quantitative Analyte Assay Advantages, Limitations and Disadvantages. *Photodiodes - Communications, Bio-Sensings, Measurements and High-Energy Physics.* **2011**, 9. DOI:10.5772/18244.
22. Waters. Science of what's possible. <https://www.austinpublishinggroup.com/analytical-pharmaceutical-chemistry/fulltext/ajapc-v2id1056.php#Comparison%20between%20UPLC%20and%20HPLC>. (Acceso Mayo 20, 2019).
23. Gerace, Enrico; Caneparo, Denise; Boiro, Federica; Salomone, Alberto y Vicenti Marco. Determination of several synthetic cathinones and amphetamine-like compound in urine by gas chromatography with mass spectrometry. Method validation and application to real cases. *J. Sep. Sci.* **2019**, 42, 1577-1584. DOI:10.1002/jssc.201801249.
24. Alsenedi, Khalid A. y Morrison, Calum. Determination of amphetamine-type stimulants (ATSS) and synthetic cathinones in urine using solid phase micro-extraction fibre tips and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Chem.* **2018**, 10, 1431-1440. DOI: 10.1039/c8ay00041g.
25. Boumba, Vassiliki A.; Di Rago, Matthew; Peka, Melissa, Drummer, Olaf H. y Gerostamoulos, Dimitri. The analysis of 132 novel psychoactive substances in human hair using a single step extraction by tandem LC/MS. *Forensic Sci. Int.* **2017**, 279,192-202. DOI:10.1016/j.forsciint.2017.08.031.
26. Mercieca, Gilbert; Odoardi, Sara; Cassar, Marisa y Strano Rossi, Sabina. Rapid and simple procedure for the determination of cathinones, amphetamine-like stimulants and other new psychoactive substances in blood and urine by GC–MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, 149,494-501. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.11.024.
27. Alremeithi, Rashed; Meetani, Mohammed A.; Alaidaros, Anas A.; Lanjawi, Adnan y Alsumaiti, Khalid. Simultaneous Quantitative Determination of Synthetic Cathinone Enantiomers in Urine and Plasma Using GC-NCI-MS. *J. Anal. Chem.* **2018**, 1-11 DOI: 10.1155/2018/4396043.
28. Lehmann, Sabrina; Kieliba, Tobias; Beike, Justus; Thevis, Mario y Mercer-Chalmers-Bender, Katja. Determination of 74 new psychoactive substances in serum using automated in-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, 1064, 124-138 DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.09.003.

29. Glicksberg, Lindsay; Bruand, Kelsie y Kerrigan, Sarah. Identification and quantification of synthetic cathinones in blood and urine using liquid chromatography-quadrupole/time of flight (LC-Q/TOF) mass spectrometry. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2016**, 1035, 91-103. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.09.027.
30. Sánchez-González, Juan; Odoardi, Sara; Bermejo, Ana María; Bermejo-Barrera, Pilar; Saverio Romolo, Francesco; Moreda-Piñeiro, Antonio y Strano-Rossi, Sabina. HPLC-MS/MS combined with membrane-protected molecularly imprinted polymer micro-solid-phase extraction for synthetic cathinones monitoring in urine. *Wiley*. **2018**, 11, 33-44. DOI:10.1002/dta.2448.
31. Murakami, Takaya; Iwamuro, Yoshiaki; Ishimaru, Reiko; Chinaka, Satoshi y Hasegawa, Hiroshi. Molecularly imprinted polymer solid-phase extraction of synthetic cathinones from urine and whole blood samples. *J. Sep. Sci.* **2018**, 41, 4403-4566. ISSN: 1615-9306.
32. Fernández, P.; Regenjo, M.; Ares, A.; Fernández, A.M.; Lorenzo, R.A. y Carro A.M. Simultaneous determination of 20 drugs of abuse in oral fluid using ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 411, 193-203. DOI: 10.1007/s00216-018-1428-5.
33. Ares, A.M.; Fernández, P.; Regenjo, M.; Fernández A.M.; Carro A.M. y Lorenzo, R.A. A fast bioanalytical method based on microextraction by packed sorbent and UPLC-MS/MS for determining new psychoactive substances in oral fluid. *Talanta*, **2017**, 174, 454-161. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.06.022.
34. Valen, Anja; Øiestad ÅM, Leere; Helge Strand, Dag; Skari, Ragnhild y Berg, Thomas. Determination of 21 drugs in oral fluid using fully automated supported liquid extraction and UHPLC-MS/MS. *Drug Testing and Analysis*. **2017**, 9, 808-8023. DOI: 10.1002/dta.2045.
35. Borovcová, Kucie; Pauk, Volodymyr y Lemr, Karel. Analysis of new psychoactive substances in human urine by ultra-high performance supercritical fluid and liquid chromatography: Validation and comparison. *J. Sep. Sci.* **2018**, 41, 2105-2304. DOI: 10.1002/jssc.201800006.
36. López-Rivadula Lamas, Manuel; Cruz Landeiras, Angelines; De Castro Rios, Ana; Lendoiro Belio, Elena; Blanco Turnes, Salvador y Rey López, Pablo. *Evaluación de la presencia de nuevas catinonas sintéticas en conductores españoles mediante análisis de muestras de fluido oral por LC-MS/MS*. [En línea]: DGT, España Enero 2013. <http://www.dgt.es/es/seguridad-vial/investigacion/estudios-informes/2013/evaluacion-de-la-presencia-de-nuevas-catinonas-sinteticas.shtml>. (Acesso Mayo 25, 2019).
37. Cruz Martín del Campo, Silvia L. y Rivera García, María Teresa. Las nuevas drogas: origen, mecanismos de acción y efectos. Una revisión de la literatura. *Revista Internacional de investigación en adicciones RIIAD*. **2015**, 1, 68-76. DOI: 10.28931/riiad.2015.1.08.
38. ICH, Harmonisation for better health. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. ICH, Génova, noviembre de 2006.
39. U.S. Food and Drugs Administration. *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics*. FDA, Rockville, julio de 2015.
40. U.S. Food and Drug Administration. *Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program, 2<sup>nd</sup> Ed.* FDA, Rockville, mayo 2015.

41. U.S Food and Drug Administration. *Bioanalytical Method Validation*. FDA, Rockville, mayo de 2018.

42. *Boqué, Ricard*. La selectividad en el análisis. Grupo de Quimiometría y Cualimetría, Universidad Rovira i Virgili.

