

Joaquim Virgili Val

**Estratègies per a la preconcentració en línia amb la tècnica
d'electroforesi capil·lar per l'anàlisi de drogues d'abús**

TREBALL DE FI DE GRAU

dirigit per la Dra. Marta Calull

Grau de Química



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2015

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ	3
1.1. CONTEXT	3
1.2. DROGUES D'ABÚS: CATINONES.....	3
1.3. SEPARACIÓ ENANTIOMÈRICA DE CATINONES	5
1.3.1. Les ciclodextrines	5
1.3.2. Separació de catinones per ce	7
1.4. ACOBLAMENT IN-LINE SPE-CE	8
2. OBJECTIU	10
3. PART EXPERIMENTAL	10
3.1. REACTIUS, PATRONS I MATERIALS	10
3.2. INSTRUMENTACIÓ	10
3.3. CONSTRUCCIÓ DEL DISPOSITIU <i>in-line</i> SPE-CE.....	11
3.4. PROCEDIMENT <i>in-line</i> SPE-CE	12
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	13
4.1. SEPARACIÓ ELECTROFORÈTICA AQUIRAL.....	14
4.2. SEPARACIÓ ELECTROFORÈTICA QUIRAL AMB CICLODEXTRINES	15
4.3. ACOBLAMENT <i>in-line</i> SPE-CE	19
4.3.1. Estudi del sorbent oasis MCX.....	19
4.3.2. Estudi del sorbent oasis HLB.....	21
5. CONCLUSIONS.....	25
6. BIBLIOGRAFIA	26

ABSTRACT

In this work we have focused in the preconcentration and separation of three cathinone compounds (mephedrone, methylefedrine and methylenedioxypyrovalerone), by using in-line SPE-CE. Firstly we have focused in the enantiomeric separation of the analytes and for that we tested different chiral additives in the separation electrolyte, in particular we have evaluated different cyclodextrines (CD) as α -CD, β -CD, γ -CD and the ionic S- β -CD. The best results were obtained using 70 mM sodium dihydrogen phosphate and 30 mM of phosphoric acid containing 10 mM of β -CD. On the other hand, in order to obtain a sensitivity improvement, the in-line SPE coupling with CE using an Oasis HLB sorbent has been evaluated optimizing different parameters which can have an effect on the preconcentration as sample pH, the nature and volume of the elution solvent and the sample loading time.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. CONTEXT

En els últims anys s'ha detectat la comercialització i consum de noves drogues de disseny, i la seva expansió es deu fonamentalment a la falta de regularització i a la facilitat de la seva adquisició.

Entre aquestes noves drogues, anomenades drogues emergents, han adquirit un important protagonisme els derivats de la catinona, les quals el seu ús recreacional es deu als seus efectes estimulants i euforitzants, similars als produïts per amfetamines i derivats [1].

Bàsicament, els derivats sintètics de les catinones, també anomenades catinones substituïdes, han augmentat la seva popularitat per la seva fàcil adquisició i distribució en forma de “sals de bany” sota la indicació de “no apte per al consum humà”. A més, en resposta als controls legislatius i les tendències del mercat, la síntesi de nous tipus de derivats de catinones ha provocat un increment en la diversificació d'aquestes substàncies.

Les catinones són substàncies quirals, de manera que poden estar presents en forma de dos estereoisòmers diferents. Aquest fet crea una problemàtica afegida al consum d'aquestes substàncies ja que les toxicitats en l'organisme poden variar segons l'estereoisòmer que s'hagi consumit. Degut a aquest fet, és important el desenvolupament de metodologies que facin possible la detecció i quantificació dels diferents estereoisòmers en mostres biològiques, com pot ser el cabell, la sang i l'orina.

1.2. DROGUES D'ABÚS: CATINONES

Les catinones substituïdes són una família de derivats sintètics de la β -cetofenetilamina (2-amino-1-fenil-1-propanona) (Figura 1), també anomenada catinona, un alcaloide monoamínic present a la planta *Catha edulis* (khat, qat o cat) que ha estat mastegada durant centenars d'anys a l'Àfrica degut als seus efectes semblants a l'amfetamina. Són substàncies sintètiques de color blanc que es troben en forma de cristalls o pols i són solubles en solucions aquoses. Les catinones substituïdes són substàncies que simulen els efectes de l'hormona epinefrina (adrenalina) i del neurotransmissor norepinefrina (noreadrenalina). Aquestes molècules són causants de l'estimulació del sistema nerviós central, per tant, estan considerades dins del grup de drogues estimulants. Aquests neurotransmissors són mono-amínics i comparteixen l'estructura d'un anell aromàtic i d'un grup amino. Degut a que les catinones són molècules hidrofòbiques, poden travessar fàcilment les membranes cel·lulars i altres parets, incloent les parets dels vasos sanguinis del cervell [2], [3].

Les catinones substituïdes s'obtenen a partir de la modificació dels grups funcionals de la catinona. Entre les catinones substituïdes més importants

podem trobar la mefedrona i la metilefedrina, un metabòlit de la mefedrona, i la metilendioxioprovalerona (MDPV) (Figura 1).

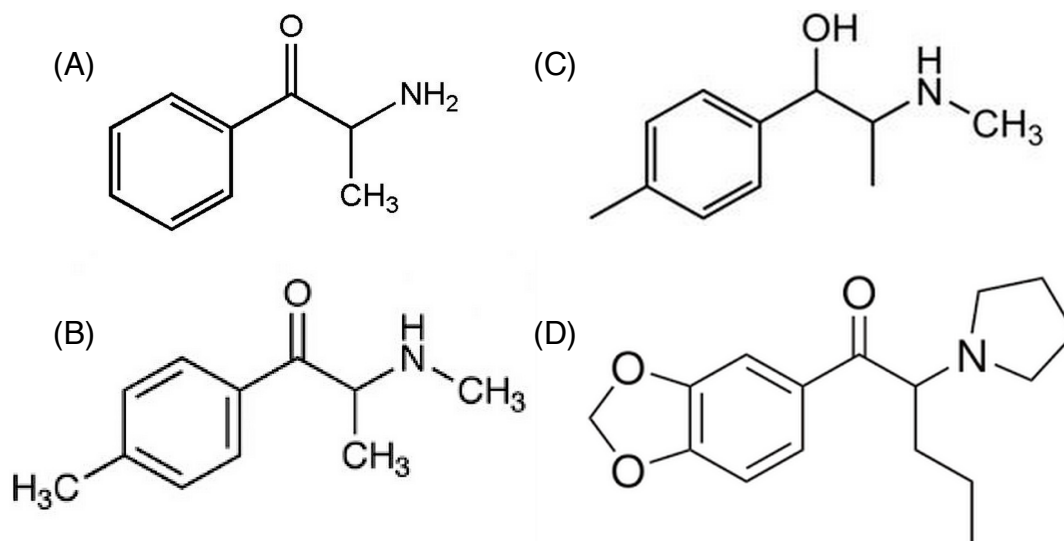


Figura 1. Estructura química de la catinona (A) i de les catinones derivades en estudi: mefedrona (B), metilefedrina (C) i MDPV (D).

La mefedrona (2-metilamino-1-(4-metilfenil)propan-1-ona) és un derivat que és sintetitzat a partir de la catinona per la substitució de l'hidrogen en el carboni 4 aromàtic per un grup metil, presentant així una estructura molecular molt semblant a l'amfetamina o a la 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA). És una base feble amb un pK_a comprès entre 7,5 i 9, per tant, a pH àcids es troba en forma catiònica i a pH bàsics, per sobre de 9, es troba en forma neutra.

El consum de mefedrona per sessió i consumidor oscil·la entre els 0.5 i 1 grams. La forma més habitual de consum és per ingestió o per esnifament. La droga fa efecte entre 15 i 45 minuts des de la seva administració i mostra efectes clínics durant aproximadament 2 i 5 hores.

La metilefedrina és un metabòlit de la mefedrona. És una base feble amb un pK_a al voltant de 9.

La droga MDPV és una base feble amb un pK_a de 8.4. Entre els efectes primaris que provoca el seu consum es poden esmentar la taquicàrdia, hipertensió i una lleu estimulació que duren de 6 a 8 hores. El consum de MDPV varia entre els 5 mg i els 20 mg. La duració total dels efectes estimulants varia entre les 4 i 6 hores segons la quantitat consumida i la via d'administració, que pot ser de forma sublingual, rectal, per injecció intramuscular o per inhalació. El consum de dosis que superen els 20 mg s'ha observat que són causants d'atacs de pànic [4].

La MDPV és coneguda principalment pel pseudònim de "droga caníbal" degut a atacs de naturalesa caníbal reportats en gent que ha consumit aquesta droga.

No obstant, aquest efecte de comportament agressiu i caníbal en vers altres persones no està comprovat que sigui per una relació directa pel consum d'aquesta droga, per tant, no es pot confirmar com a un efecte derivat del consum d'aquesta.

1.3. SEPARACIÓ ENANTIOMÈRICA DE CATINONES

La determinació de catinones en diferents tipus de mostres biològiques com són plasma, orina o cabell és de vital importància per a la investigació de la seva toxicitat i els seus efectes derivats, així com també pel control de les drogues d'ús terapèutic i per estudis farmacocinètics i metabòlics. Per aquests motius en els darrers anys s'han desenvolupat diferents mètodes analítics per a la determinació d'aquests anàlits en mostres clíniques i forenses [5–7].

Quan es duu a terme la separació de les catinones també s'ha de considerar la naturalesa quiral d'aquestes substàncies, ja que els efectes farmacològics poden variar segons l'enantiòmer. Així doncs, la possibilitat de determinar diferents enantiòmers pot facilitar l'estudi de la seva toxicitat per separat, així com la seva metabolització i els seus efectes.

En la separació enantiomèrica destaquen sobretot les tècniques cromatogràfiques, com ara la cromatografia de líquids (LC) [8]. Tanmateix, cal remarcar que en el camp de les separacions quirals l'electroforesi capil·lar (CE) és una tècnica que s'ha aplicat amb èxit [7], [9–11].

Aquestes separacions es realitzen generalment emprant el mètode de separació d'electroforesi capil·lar per zones (CZE) [9], [10] o la cromatografia capil·lar micel·lar electrocinètic (MEKC) [7], electrocromatografia capil·lar (CEC) [11] i concretament per aconseguir la separació quiral s'afegeix a l'electrolit de separació (BGE) un selector quiral que discrimina entre els dos enantiòmers. En general es pot destacar que l'CE presenta avantatges sobre altres tècniques com l'ús de menor volum de dissolvents i mostres, temps curts d'anàlisi i alta resolució. A més, en un mateix capil·lar es poden realitzar separacions enantiomèriques simplement afegint selectors quirals al BGE. Aquest fet fa que aquesta tècnica sigui més econòmica en aquest àmbit, ja que no hi ha necessitat de capil·lars especials, com és el cas de la LC emprant columnes quirals.

Dels diferents selectors quirals emprats en CE per la separació enantiomèrica de catinones, les CDs són els més emprats [9].

1.3.1. Les ciclodextrines

Les ciclodextrines són oligosacàrids cíclics sintetitzats per la degradació enzimàtica del midó. Es poden trobar dos tipus principals: les ciclodextrines natives, les quals no tenen cap tipus de substituent; i les ciclodextrines substituïdes, que en la seva estructura tenen substituents de diferent tipus amb diferents propietats, donant ciclodextrines càrregades o neutres. Les CDs tenen

forma d'anell amb una part interior relativament hidrofòbica, però en canviar la part exterior és principalment hidrofílica degut a la presència de grups hidroxil. L'estructura d'una ciclodextrina es pot veure a la Figura 2.

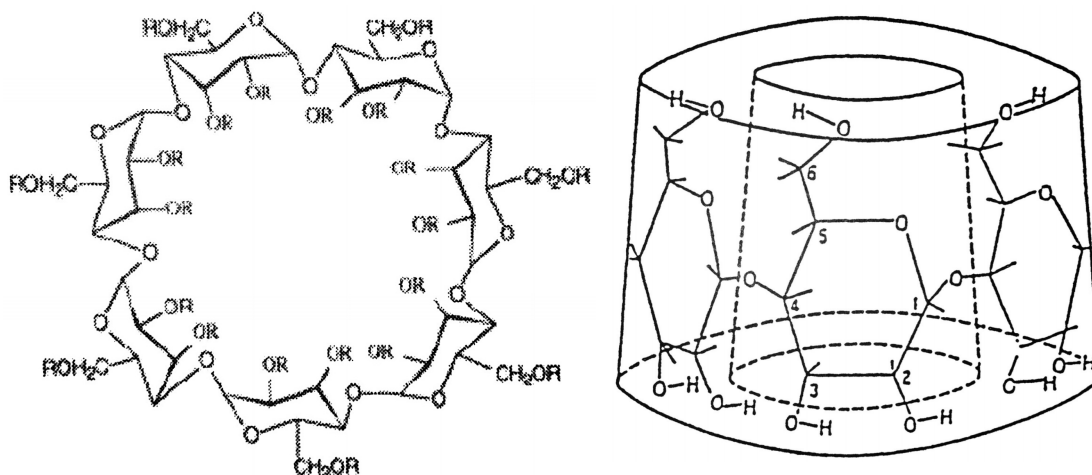


Figura 2. Estructura general d'una ciclodextrina i esquema de la seva cavitat

Encara que les CDs de sis a dotze unitats de glucosa poden ser separades fàcilment, únicament les de sis, set i vuit unitats (corresponents a les lletres gregues α -, β - i γ -, respectivament) són utilitzades activament en la química analítica. Les propietats físiques de les diferents CDs natives són una mica diferents. Per exemple, la grandària de la cavitat de l'anell, la solubilitat, la massa molecular, etc. varia en funció del nombre de glucoses que componen l'anell. Aquestes propietats es troben resumides a la Taula 1.

Taula 1. Propietats principals de les ciclodextrines natives.

	Tipus de CD		
	α	β	γ
Nombre de glucoses	6	7	8
Massa molecular	972	1135	1297
Diàmetre intern de la cavitat (Å)	5.7	7.8	9.5
Diàmetre extern de la cavitat (Å)	13.7	15.3	16.9
Solubilitat en aigua (25°C)(%w/v)	14.5	1.85	23.2
pK_a	12.33	12.20	12.08

A banda de les CD esmentades, un gran nombre de derivats de la CD s'utilitzen en la tècnica d'CE per aconseguir separacions quirals [12]. Per exemple podem trobar CD no carregades que tenen grups tan diferents com metils, hidroxietils, hidroxipropils o acetils. També es poden trobar CD carregades que tenen grups metil-amino, sulfobutylèter, carboximetil, sulfat, etc. Una de les CD derivades més utilitzades és la ciclodextrina sulfatada (S- β -CD). Aquest tipus de ciclodextrina es caracteritza per tenir substituents sulfat que fan que tota l'estructura adquireixi càrrega negativa.

Degut a la forma de la ciclodextrina, el anàlits poden entrar al nucli de la ciclodextrina i quedar complexats en aquesta cavitat. L'estructura de la ciclodextrina conté un nombre d'hidroxils quirals els quals poden interactuar enantioselectivament amb una molècula quiral durant la seva migració per el capil·lar, fent així que degut a les diferents interaccions produïdes hi hagi una complexació majoritària amb un enantiòmer concret.

1.3.2. Separació de cationes per ce

La separació quiral de cationes en CE es presenta com un repte degut a que els enantiòmers tenen una proporció massa/càrrega idèntica i no poden ser separats sense la presència d'un selector quiral. Aquesta molècula quiral és capaç d'interaccionar i associar-se, amb diferent estabilitat, amb els dos enantiòmers. Aquesta diferència d'estabilitat és el que determina la separació.

El flux electroosmòtic (EOF) juga un paper molt important en la separació quiral. Es coneixen dos mecanismes de migració en CE: el primer és el flux co-electroosmòtic (co-EOF), on els ions, que en el nostre cas es tracten de cationes carregades positivament, migren en la mateixa direcció que el EOF. El segon és el flux electroosmòtic invers (counter-EOF) on els ions tendeixen a migrar en direcció contrària al EOF, com és el cas de les cationes complexades amb S- β -CD. En el cas del co-EOF, per exemple, les cationes estan carregades positivament a pH inferior de 7.5, i hi ha un EOF baix d'ànode (+) a càtode (-), tal com es mostra a la Figura 3.

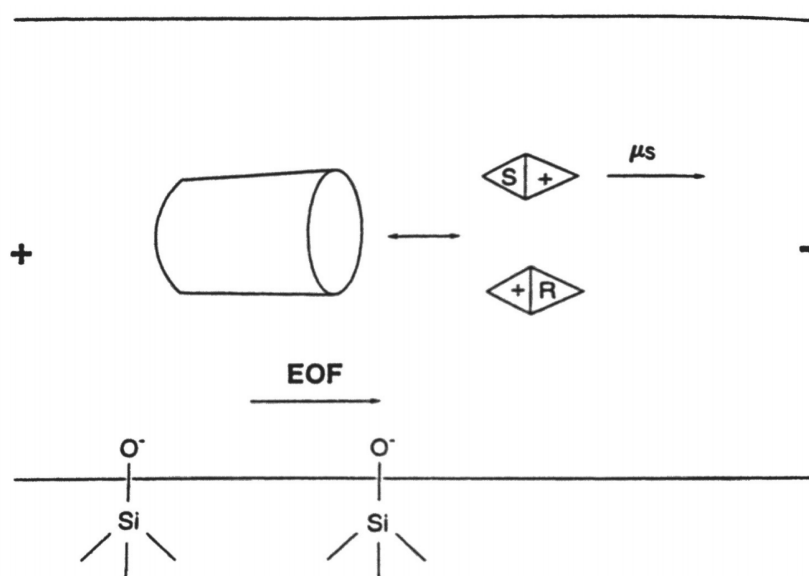


Figura 3. Esquema de migració co-EOF per a enantiòmers catiónics en CE utilitzant CDs com a selectors quirals. μ_s = mobilitat electroforètica de la forma lliure de l'enantiòmer.

S'han publicat diferents treballs centrats en la separació quiral de catinones mitjançant electroforesi capil·lar i l'ús de ciclodextrines com a selectors quirals. Per exemple Mohr *et al.* [9] utilitza la tècnica d'electroforèsi capil·lar per zona (CZE) per a la separació quiral de 19 catinones derivades utilitzant diferents selectors quirals, incloent principalment CD natives i una ciclodextrina sulfatada (S- β -CD). Els millors resultats s'assoleixen utilitzant 20 mg/mL de S- β -CD en una solució tampó de 50 mM d'acetat d'amoni a pH= 4.5, obtenint una separació de tots els enantiòmers excepte per la mecedrona.

Un altre exemple el podem trobar a l'estudi realitzat per Aturki *et.al* [11] on es porta a terme la separació enantiomèrica de 10 derivats de catinones amb una alta eficiència i amb un temps d'anàlisi menor de 10 minuts.

Per últim, Merola *et al.* [10] realitza un treball on s'estudia la separació quiral de 12 catinones derivades amb β -CD com a selector quiral i amb un temps d'anàlisi menor de 18 minuts.

1.4. ACOBLAMENT IN-LINE SPE-CE

Una limitació important relacionada amb l'ús de l'CE és la seva baixa sensibilitat associada al volum reduït d'injecció. Per tal de solventar aquest problema i a la vegada poder obtenir límits de detecció baixos s'han ideat diferents estratègies, que van des de l'ús de diferents tècniques de preconcentració *off-line* a tècniques de preconcentració dins del propi capil·lar (*in-line*) [13].

Una de les tècniques de preconcentració més utilitzades és la extracció en fase sòlida (SPE). L'SPE és un procés de preparació de mostra en el qual els anàlits d'interès són separats d'altres compostos de la mescla segons les seves propietats físiques i químiques. L'SPE fa ús de l'afinitat dels compostos dissolts en una solució per a un sorbent determinat. El resultat és que el anàlits d'interès o les impureses no desitjades queden retingudes en el sorbent. Si la porció retinguda en el sorbent inclou els anàlits d'interès, poden ser recuperats a partir d'una etapa d'elució. Encara que l'SPE presenta els avantatges esmentats, l'ús principal que es dona en aquest estudi és com a preconcentrador.

Principalment, la tècnica SPE es duu a terme de forma *off-line*. Encara que eficient, és una tècnica de preconcentració lenta i poc automatitzada que requereix una elevada laboriositat. És per això que la tendència dels últims anys és el desenvolupament d'alternatives amb la finalitat d'incrementar l'automatització d'aquest procediment, fent així que les anàlisis siguin ràpides i amb menor grau de laboriositat. Aquestes alternatives són els acoblaments *at-line*, *on-line* i *in-line* amb la CE [14–17].

En l'acoblament *in-line* SPE-CE la preconcentració i la separació electroforètica es porten a terme en el mateix capil·lar de separació. És per això que

l'acoblament *in-line* SPE-CE pot resultar un gran benefici en forma de temps i estalvi d'ús de dissolvents comparant-lo amb la SPE *off-line* convencional. A més, la quantitat de sorbent necessari per la fabricació d'un SPE *in-line* és molt petit. Aquesta alternativa fa que pugui ser considerada de gran interès en l'àmbit de la Química Verda.

En els últims anys s'han desenvolupat diferents dissenys a l'hora d'introduir el sorbent de SPE en el capil·lar de separació: (i) columnes open-tubular, (ii) microcartutxos empaquetats amb una fase estacionaria, (iii) discos o membranes i (iv) monolits [18–21].

La gran majoria d'estudis que han utilitzat l'*in-line* SPE-CE com a tècnica de preconcentració es basen en l'ús de partícules de sorbent empaquetades dins del capil·lar de separació (microcartutxos). Aquestes partícules de sorbent es poden trobar normalment dins dels propis cartutxos de SPE utilitzats de forma *off-line*. Per tal de retenir aquestes partícules en una zona concreta del capil·lar, generalment s'utilitzen frites que fa que les partícules no es vegin desplaçades per dins del capil·lar, fet que provocaria l'obstrucció d'aquest o interferències en el senyal. Encara que és una forma eficient de retindre el sorbent, a la bibliografia s'han descrit algunes problemàtiques associades a aquest disseny com ara pèrdues de corrent, eixamplament dels pics degut a la formació de bombolles o problemes amb la irreproductibilitat del flux electroosmòtic (EOF) [22]. Per tot això a la bibliografia també s'han descrit altres alternatives que solventarien aquests problemes [19], [23], [24].

Per tal de solucionar aquests problemes, en el nostre estudi s'utilitza un disseny de retenció de les partícules que no necessita frites que es basa en empaquetar les partícules de sorbent a l'interior d'un fragment de capil·lar amb un diàmetre intern major que la partícula. A aquest de capil·lar que conté el sorbent de SPE fragment s'uneix al capil·lar de separació amb un diàmetre intern més petit que el capil·lar que conté el sorbent, fent així que les partícules no puguin entrar dins del capil·lar de separació. Hi ha autors que han utilitzat aquesta tècnica obtenint bons resultats i reduïnt els problemes abans mencionats [19], [23], [24].

Hi ha molts tipus de sorbents que es poden utilitzar per realitzar la preconcentració *in-line*, i la seva elecció depèn principalment de la naturalesa dels anàlits que es volen preconcentrar. Les catinones tenen un pK_a en un interval de 7.5-9, per tant en medis àcids es trobaran carregades positivament i en medis bàsics, per sobre de $pH=9$, es trobaran en forma neutra. En aquest sentit tant els sorbents de fase inversa amb balanç hidrofílic i lipofílic, com els sorbents d'intercanvi catiònic de mode mixte serien adequats per la preconcentració de catinones. Els primers són sorbents adequats per molts compostos de naturalesa apolar; en el cas de les catinones és quan la mostra es troba a un pH inferior a 9. Els segons són sorbents adequats per la preconcentració de compostos bàsics quan el pH de la mostra és l'adequat per a que els anàlits es trobin carregats positivament, concretament en el cas de les catinones a un pH àcid.

2. OBJECTIU

L'objectiu principal d'aquest treball és l'estudi de l'acoblament de l'extracció en fase sòlida en línia amb l'electroforesi capil·lar (*in-line* SPE-CE) per la preconcentració i separació electroforètica de tres derivats sintètics de les catinones.

Concretament, el primer objectiu del treball és l'estudi de la separació de la mefedrona, la metilefedrina i la metilendioxipirovalerona mitjançant la tècnica d'electroforesi capil·lar utilitzant ciclodextrines com a selectors quirals. El segon objectiu és l'estudi de la tècnica *in-line* SPE-CE com a sistema de preconcentració.

3. PART EXPERIMENTAL

3.1. REACTIUS, PATRONS I MATERIALS

Tots els reactius utilitzats són de grau analític. S'han utilitzat els següents patrons: mefedrona, MDPV i metilefedrina. Els reactius utilitzats han estat l'hidròxid de sodi (NaOH), metanol (MeOH), àcid fosfòric (H_3PO_4), fosfat monosòdic (NaH_2PO_4), acetat d'amoni ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) i àcid acètic (CH_3COOH). També s'han utilitzat diferents ciclodextrines: ciclodextrina α (α -CD), ciclodextrina β (β -CD), ciclodextrina γ (γ -CD) i ciclodextrina β sulfatada (S- β -CD). Tots els reactius, dissolvents i ciclodextrines han estat proporcionats per Sigma Aldrich (St. Luis, MO, Estats Units). L'aigua ha estat tractada amb un sistema Milli-Q de purificació (18.2 M Ω cm) (Millipore, Bedford, MA, Estats Units).

Les solucions patró de 1000 mg/L de la mefedrona i la MDPV i la solució de 100 mg/L de metilefedrina han estat preparades amb metanol i s'han conservat al congelador a -18 °C. A partir d'aquests patrons s'han preparat solucions patró de 50 mg/L setmanalment en aigua Milli-Q. A partir d'aquesta s'han preparat diàriament solucions de concentració més petita en aigua Milli-Q. Per a la construcció del SPE *in-line* s'ha utilitzat dos tipus de sorbent, Oasis HLB i Oasis MCX, amb tamanyes de partícula mitjans de 60 μm (Waters Corporation, Millford, MA, Estats Units).

3.2. INSTRUMENTACIÓ

La instrumentació utilitzada per a la separació electroforètica ha consistit en un equip Agilent 3D CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanya) equipat amb un detector ultravioleta de diodes en línia (DAD). La detecció dels compostos estudiats s'ha realitzat a 200 nm. La cambra que conté el capil·lar s'ha mantingut a 25°C en la majoria dels experiments. S'ha utilitzat un capil·lar de sílica fosa de 80 cm de llargada (64,5 cm de longitud efectiva) amb un ID de 50 μm i un diàmetre extern (OD) de 360 μm . La Figura 4 mostra un esquema general d'un equip de CE.

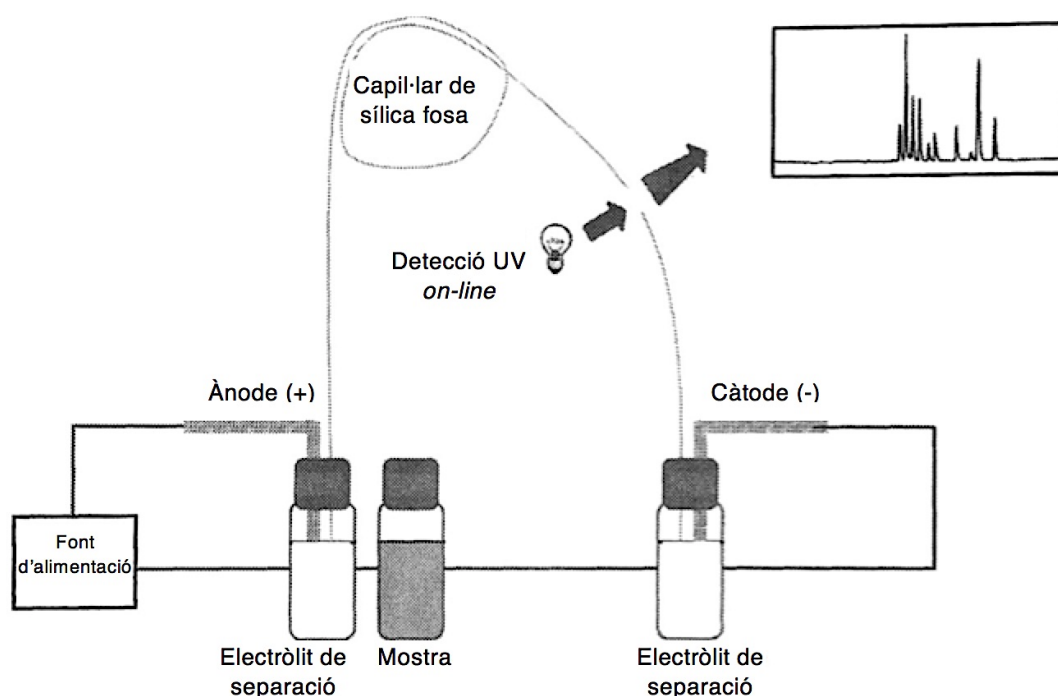


Figura 4. Esquema general d'un equip de CE.

3.3. CONSTRUCCIÓ DEL DISPOSITIU *in-line* SPE-CE

Prèviament a la utilització de les partícules de sorbent, aquest s'ha tamissat amb un tamís de acer amb un tamany de retxa de 50 μm per tal d'únicament retenir les partícules més grans a aquest diàmetre.

El primer pas en la construcció del dispositiu de SPE consisteix en tallar 2 mm de capil·lar de sílica fosa de 150 μm de ID i 360 μm de OD. Aquesta peça es introduïda 1 mm en un tub de 0.5 cm de politetrafluoroetilè (PTFE) (Grup Taper SA, Madrid, Espanya) amb un ID de 0.25 mm. A l'altre extrem del tub de PTFE s'introdueix un fragment de capil·lar de 7,5 cm de longitud i 50 μm de ID fins a connectar-se completament amb el fragment de capil·lar de 2 mm. A continuació, l'extrem lliure del capil·lar de 50 μm de ID es connecta a una bomba de buit amb una xeringa i l'extrem lliure del capil·lar de 150 μm de ID s'introdueix en un vial que contenia el sorbent (Oasis HLB o Oasis MCX). D'aquesta manera el fragment de 2 mm s'omple de partícules de sorbent que es queden retingudes degut al tamany de partícula, que és superior al ID del capil·lar (50 μm). Posteriorment, es desplaça el capil·lar de 50 μm de ID per a situar el fragment de 2 mm a la mitad del tub de PTFE. A l'altre costat del tub s'introdueix el capil·lar de separació de 72.5 cm de longitud fins a estar totalment unides les tres parts que constituïran el dispositiu. Tot el procés de fabricació s'ha controlat amb un microscopi. La Figura 5 mostra el diagrama esquematitzat del dispositiu de preconcentració *in-line* SPE-CE.

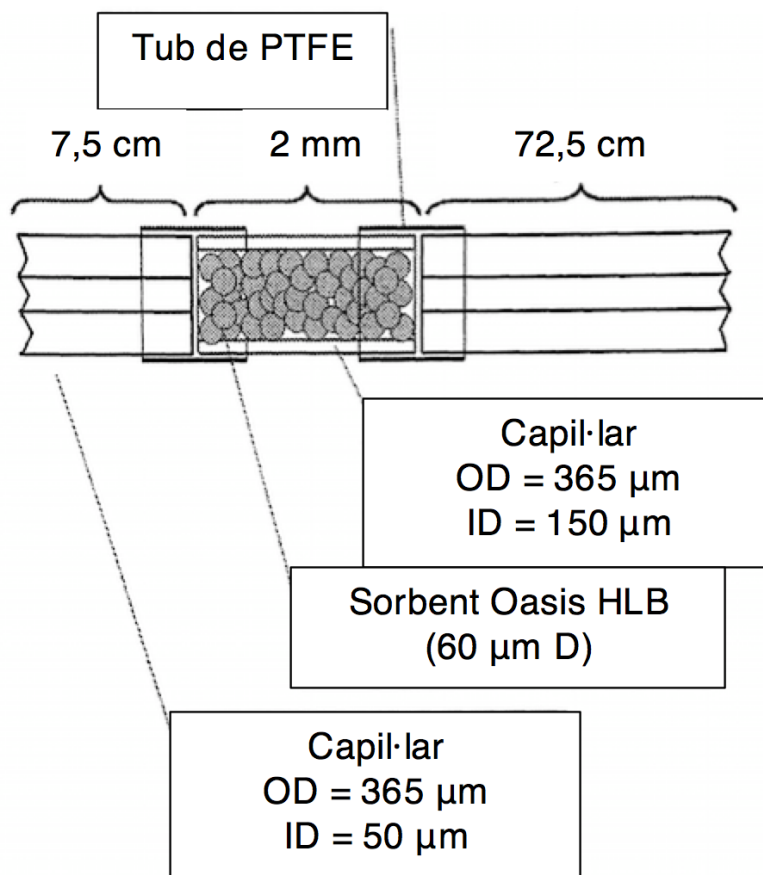


Figura 5. Esquema del dispositiu in-line SPE-CE

3.4. PROCEDIMENT *in-line* SPE-CE

En primer lloc, els capil·lars nous, i sense el preconcentrador, s'han acondicionat amb NaOH 1M durant 40 minuts i aigua Milli-Q durant 15 minuts a una pressió de 930 mbar. Tots els dies, i entre anàlisis, el capil·lar amb el dispositiu SPE s'ha acondicionat amb MeOH durant 4 minuts i aigua Milli-Q, ajustada a pH 10 amb NaOH 1M, durant 4 minuts a 930 mbar.

La Figura 6 mostra un diagrama de les etapes de preconcentració i posterior separació mitjançant el procediment *in-line* SPE-CE. El primer pas consisteix en la injecció de mostra (veure apartat 4.3.2. de resultats i discussió) (A). A continuació, es porta a terme un rentat amb electrolit (BGE) a pH 2.5 a 930 mbar durant 2 minuts (B). Aquesta etapa permet eliminar les molècules que no s'han retengut al sorbent en l'etapa de càrrega de mostra. Tambè permet equilibrar el capil·lar abans de l'elució dels anàlits d'interès per la posterior separació electroforètica. Per l'etapa d'elució s'injecta una solució d'un 5% de BGE en MeOH, anomenat *plug*, a 50 mbar durant 20 segons (C).

Posteriorment, el solvent d'elució és impulsat, etapa anomenada *pushing*, a través del sorbent pel BGE a 50 mbar durant 250 segons (D) amb la finalitat de desplaçar el solvent de elució a través del sorbent i així eluir els anàlits. Finalment s'aplica un voltatge de +30 kV per a la separació electroforètica dels tres anàlits (E). L'electròlit de separació utilitzat ha estat fosfat sòdic 100 mmol/L a pH 2.5 amb 10 mmol/L de β -CD.

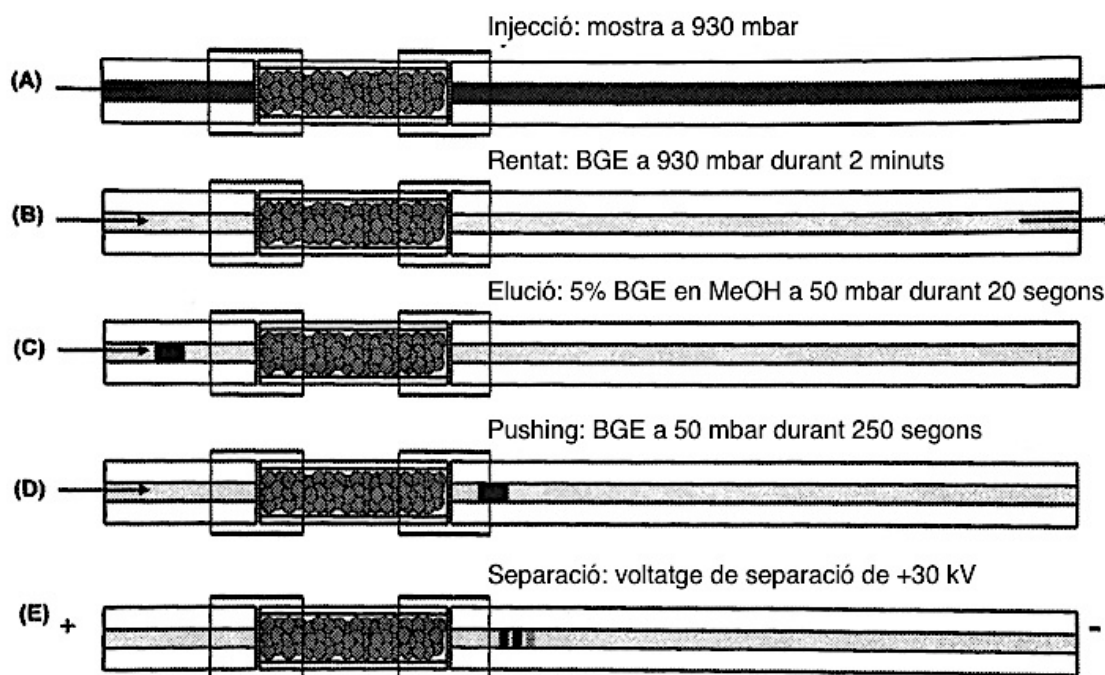


Figura 6. Diagrama del procediment *in-line* SPE-CE.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Per a la separació de catinones s'ha seleccionat la tècnica d'electroforesi capil·lar per zones (CZE) ja que és la modalitat de CE més senzilla en quant a composició de l'electròlit. En CZE, quan s'aplica una diferència de potencial positiva per a la separació, la direcció del EOF i dels anàlits carregats positivament és cap al càtode (-), on es troba situat el detector.

En l'experimentació s'han portat a terme diferents estudis per tal d'assolir una òptima separació enantiomèrica de les catinones. En l'àmbit de la separació s'ha tingut en compte diferents paràmetres com és la composició del BGE i el seu pH, el tipus de ciclodextrina i la seva concentració i la llargada del capil·lar, així com la seva temperatura i el voltatge de separació aplicat.

En la SPE *in-line* s'han considerat dos tipus diferents de sorbent per tal d'assolir la màxima preconcentració tenint en compte les característiques fisicoquímiques de les catinones: el Oasis MCX, un sorbent d'intercanvi catiònic de

mode mixte; i el Oasis HLB, un sorbent de fase reversa amb balanç hidrofílic i lipofílic, que és adient per la majoria de compostos de naturalesa apolar.

4.1. SEPARACIÓ ELECTROFORÈTICA AQUIRAL

Prèviament a la separació enantiomèrica, i amb la finalitat d'optimitzar la separació dels anàlits mitjançant CZE, s'ha seleccionat i avaluat el tipus d'electròlit de separació. Aquesta selecció està basada en estudis prèviament publicats que mostren una separació eficient, amb una bona resolució, i temps curts de migració per a totes les catinones analitzades [9].

L'electròlit de separació estudiat ha estat el tampò fosfat 100 mmol/L a pH 2,5. L'injecció hidrodinàmica de les mostres patró a 50 ppm en aigua s'ha portat a terme mitjançant l'aplicació de una pressió de 50 mbar durant 5 segons. S'ha realitzat un estudi del voltatge de separació aplicant 20, 25 i 30 kV. Els resultats han mostrat, com era previsible, que els temps de migració són inversament proporcionals al voltatge aplicat. S'ha arribat a un compromís entre resolució i temps de migració escollint el voltatge d'+25 kV, que es mostra a la Figura 7, on es pot observar una prova de separació entre les 3 catinones.

Per tal de seleccionar la longitud d'ona de treball s'han estudiat les longituds d'ona de 200, 206 i 234 nm [9], [25–27], obtenint una resposta més gran d'àrea de pic a 200 nm, escollint aquesta longitud d'ona per a tots els estudis i anàlisis posteriors.

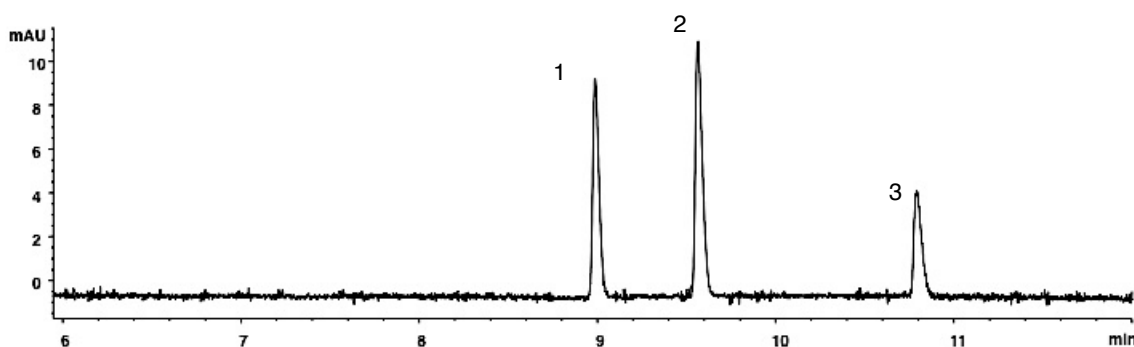


Figura 7. Electroferograma obtingut per una solució estàndard de les tres catinones a 50 mg/L. Condicions de separació: injecció hidrodinàmica durant 5 segons a 50 mbar; BGE: tampò fosfat 100 mmol/L a pH 2,5; voltatge de separació de 25 kV; $\lambda=200$ nm; temperatura del capil·lar de 25 °C. Assignació dels pics: mefedrona (1); metilefedrina (2); MDPV (3).

4.2. SEPARACIÓ ELECTROFORÈTICA QUIRAL AMB CICLODEXTRINES

Per tal de analitzar la separació enantiomèrica de les catinones s'han tingut en compte diferents ciclodextrines per arribar a la màxima resolució quiral possible en la separació. S'han comparat tres tipus de ciclodextrines natives diferents: α -CD, β -CD i γ -CD. També s'ha estudiat una ciclodextrina carregada negativament, la S- β -CD, degut a la seva propietat com a selector quiral formant complexos carregats negativament.

Les ciclodextrines s'han afegit a la solució de tampó fosfat de 100 mmol/L a pH 2,5. Per aquest estudi s'ha escollit una concentració de 5 mmol/L de cada ciclodextrina, valor escollit com a base degut a les solubilitats de les ciclodextrines escollides i com a punt de partida per l'estudi de la separació enantiomèrica. En aquesta concentració no hi ha hagut problemes de solubilitat, factor que s'ha de tenir present degut a aquesta limitació (valors de solubilitat a la Taula 1) i per tant no ha estat necessari afegir additius orgànics per tal de que d'augmentar la seva solubilitat.

A la Figura 8 es pot veure els diferents resultats de separació quiral amb les diferents ciclodextrines. Es pot veure que la β -CD dona els millors resultats de separació respecte a les altres ciclodextrines utilitzades. Per tal de intentar millorar la separació quiral dels primers pics s'ha disminuït el voltatge de separació per a que els analits tinguin més temps per a poder separar-se.

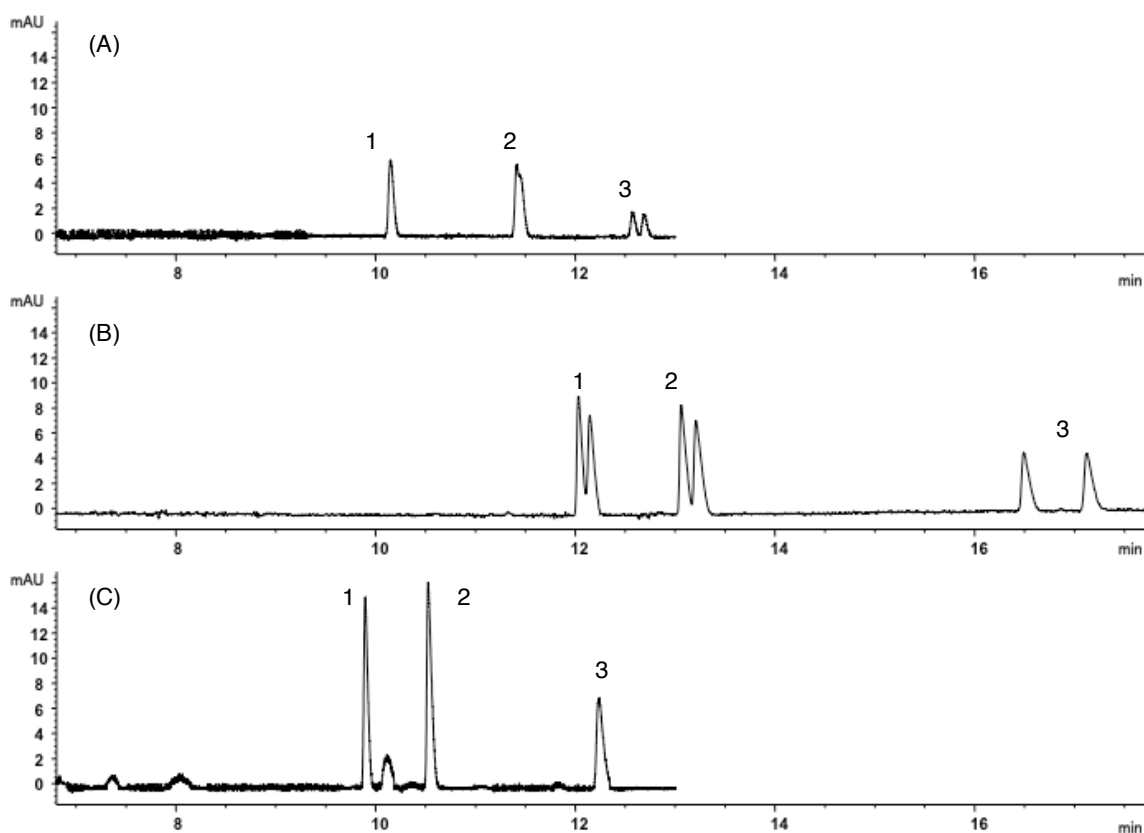


Figura 8. Electroferogrames obtinguts per una solució estàndard de les tres catinones a 50 mg/L. Condicions de separació: injecció hidrodinàmica durant 5 segons a 50 mbar; BGE: tampó fosfat 100 mmol/L a pH 2,5 i 5 mM de α -CD (A), β -CD (B) i γ -CD (C); voltatge de separació de 25 kV; $\lambda=200$ nm; temperatura del capil·lar de 25 °C. Assignació dels pics: mefedrona (1); metilefedrina (2); MDPV (3).

Els resultats han sigut negatius ja que la resolució no s'ha vist incrementada i ha augmentat el temps d'anàlisi, per tant, s'ha arribat a un compromís d'utilitzar un voltatge de separació de +25 kV.

Un cop escollida la ciclodextrina nativa que dona millors resultats, la β -CD, s'ha fet un estudi de la influència de la seva concentració en la separació enantiomèrica. S'han analitzat concentracions de 5, 6, 8, i 10 mM, observant que a majors concentracions de ciclodextrina hi ha una major separació quiral dels analits. No s'ha incrementat la concentració de β -CD per sobre d'aquests nivells degut a que la seva solubilitat en aigua és limitada i en cas de precipitació podria provocar obstruccions en el capil·lar de separació o interferències en el senyal [28]. A la Figura 9 podem veure la influència de la concentració de β -CD en la separació. La millor separació quiral s'obté amb 10 mmol/L de β -CD, tot i que el temps d'anàlisi augmenta en 2 minuts respecte la concentració de 5 mmol/L.

Una altra alternativa per aconseguir una bona separació quiral es l'ús de les ciclodextrines carregades com la S- β -CD. En contrast amb els analits carregats positivament, les S- β -CD carregades negativament migren cap l'ànode (+).

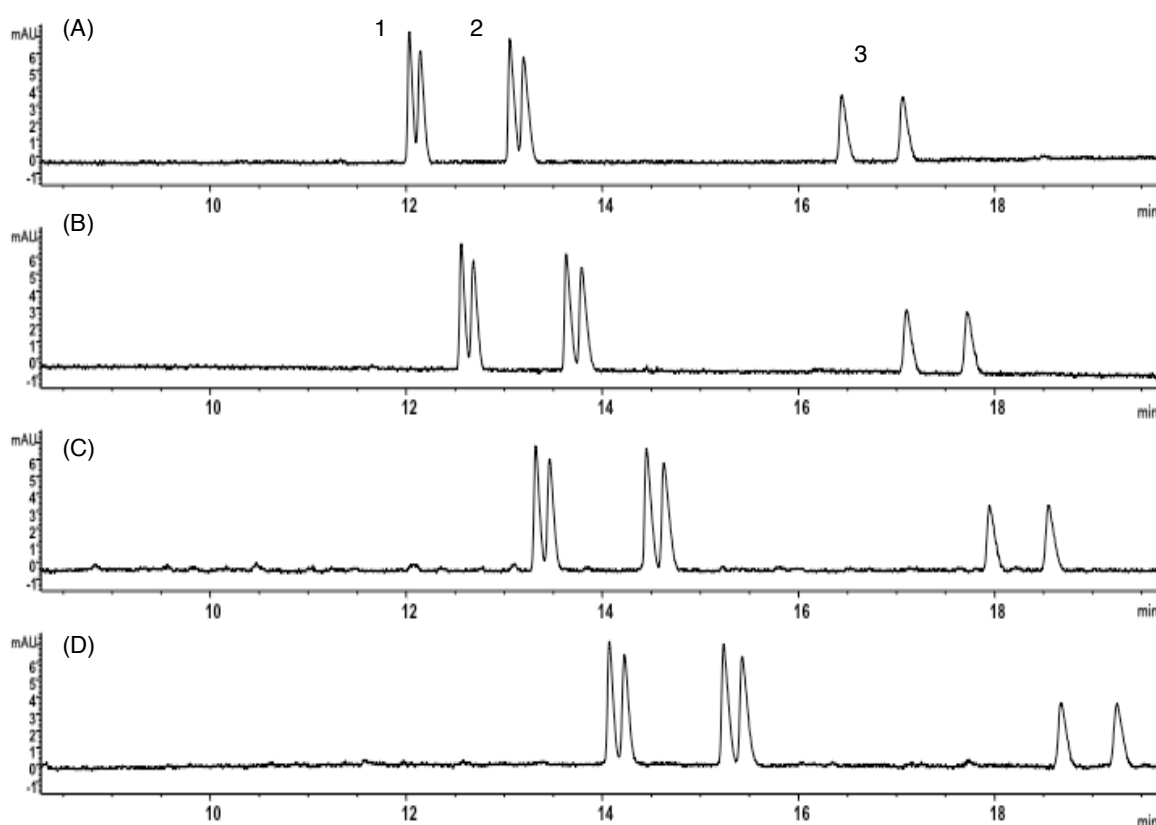


Figura 9. Electroferogrames obtinguts per una solució estàndard de les tres catinones a 50 mg/L. Condicions de separació: injecció hidrodinàmica durant 5 segons a 50 mbar; BGE: tampò fosfat 100 mmol/L a pH 2,5 i 5 mM (A), 6 mM (B), 8 mM (C), 10 mM (D) de β -CD; voltatge de separació de 25 kV; $\lambda=200$ nm; temperatura del capil·lar de 25 °C; voltatge de separació de 25 kV. Assignació dels pics: mefedrona (1); metilefedrina (2); MDPV (3).

Com a resultat d'aquesta inversió de la migració, els enantiomers que tinguin una interacció major amb aquestes CD passen la finestra de detecció més tard.

Aquest fenomen es tradueix en que a concentracions petites de S- β -CD i voltatges de separació positius l'anàlit tendeix a migrar cap al càtode (-) degut a que les interaccions del anàlit amb la S- β -CD no són suficients com per a que hi hagi una inversió de la migració. Aquest comportament es pot veure als electroferogrames A i B de la Figura 10. En canvi, al incrementar la concentració de S- β -CD en voltatges positius, s'arriba a un punt en que la mobilitat dels anàlits cap a la finestra de detecció es veu molt reduïda. Per últim, a concentracions altes de S- β -CD i voltatges positius, hi haurà una inversió de la migració i els anàlits mai arribaran a ser detectats. En aquest últim cas la polaritat del voltatge aplicat haurà de ser invertida, tal com podem veure als electroferogrames C, D i E de la Figura 10.

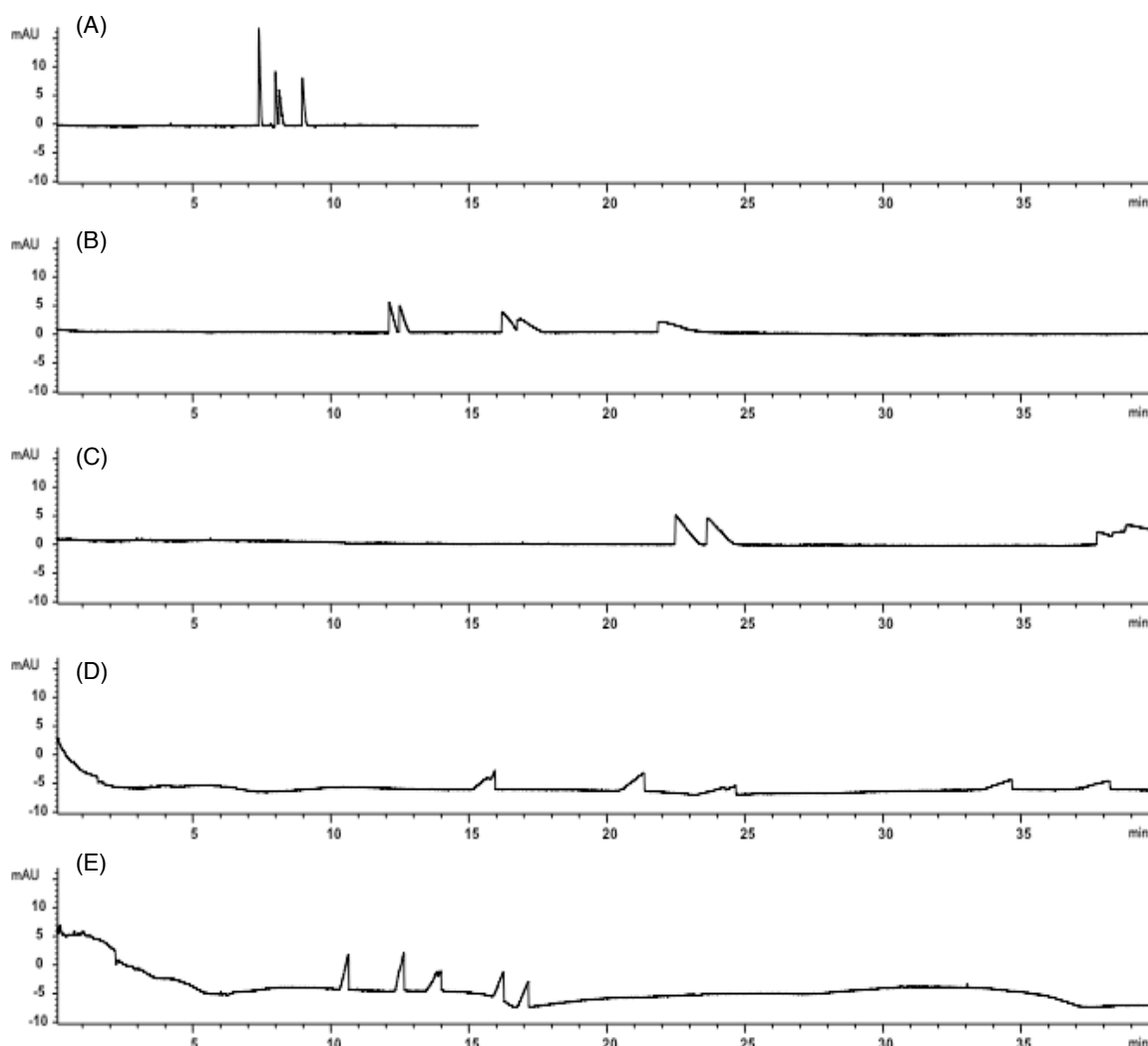


Figura 10. Electroferogrames obtinguts per una solució estàndard de les tres catinones a 50 mg/L. Condicions de separació: injecció hidrodinàmica durant 5 segons a 50 mbar; BGE: tampò fosfat 100 mmol/L a pH 2,5; voltatge de separació de 25 kV; $\lambda=200$ nm; temperatura del capil·lar de 25 °C. Concentració de S- β -CD i voltatge aplicat: (A) 0.1 mmol/L i +25 kV; (B) 1 mmol/L i +25 kV; (C) 1.5 mmol/L i -25 kV; (D) 5 mmol/L i -25 kV; (E) 10 mmol/L i -25 kV.

Per tant, i d'acord amb la bibliografia [27], a concentracions baixes de S- β -CD i per la separació enantiomèrica de compostos carregats positivament, el voltatge de separació haurà de ser positiu i, en canvi, per concentracions altes de S- β -CD el voltatge haurà de ser negatiu.

Per tal d'obtenir una òptima separació quiral, s'ha fet un estudi de diferents concentracions de S- β -CD amb diferents voltatges de separació, tant positius com negatius. L'interval de concentracions de S- β -CD ha estat de 0.1, 1, 1.5, 5 i 10 mmol/L. En totes les concentracions s'ha aplicat un voltatge de +25 kV i -25 kV.

Els resultats mostren que a concentracions baixes de S- β -CD (0.1 i 1 mmol/L) els analits no es detecten aplicant un voltatge de separació de -25 kV (electroferogrames no inclosos a la Figura). Això es degut a que no hi ha suficient interacció dels anàlits carregats positivament amb la S- β -CD i fa que migrin en direcció contrària al detector. En canvi, a +25 kV, hi ha detecció de pics degut a que no hi ha suficient interacció amb la S- β -CD per a que s'arribi a produir una migració contrària al detector (Figura 10A i 10B). En els casos d'altres concentracions de S- β -CD (1.5, 5 i 10 mmol/L) es dona el fenomen contrari (Figura 10C, 10D i 10E).

Com es pot veure en els resultats obtinguts en els electroferogrames, la separació enantiomèrica a concentracions baixes de S- β -CD i voltatges positius no és suficient per a que hi hagi una separació completa, els temps de migració és molt gran i els pics tenen cua. En els resultats obtinguts per concentracions altes de S- β -CD tampoc són bons ja que els temps de migració són massa alts i els pics surten amb cua. Per a concentracions de S- β -CD de 10 mmol/L si que hi ha separació de pics però sorgeix un problema relacionat amb la intensitat del corrent, la qual arriba a valors de 100 μ A, fent que la intensitat de corrent es mantingui inestable durant tot l'anàlisi. Aquesta inestabilitat del corrent provoca que la línia base de l'anàlisi sigui inestable.

Amb aquests resultats s'arriba a la conclusió que per el nostre estudi la ciclodextrina més adient és la β -CD a una concentració de 10 mmol/L.

Per últim, es va realitzar un estudi de la temperatura del capil·lar. En aquest estudi es va provar la temperatura de 25, 30 i 35 °C. Es va poder observar que a mesura que la temperatura augmenta, el temps d'anàlisi és més curt, però també la resolució dels pics disminueix. Per tant, es va arribar a un compromís entre temps d'anàlisi i resolució escollint la temperatura de 25 °C.

En resum, s'ha arribat a la conclusió que les condicions òptimes per una separació quiral són: BGE tampò fosfat de 100 mmol/L a pH 2.5 i 10 mmol/L de β -CD, a una temperatura de 25 °C i un voltatge de separació de 25 kV positius (Figura 9D).

4.3. ACOBLAMENT *in-line* SPE-CE

En el present treball s'han estudiat dos tipus de sorbent diferents per la SPE per a preconcentrar les catinones incloses en l'estudi: el Oasis MCX i el Oasis HLB.

4.3.1. Estudi del sorbent oasis MCX

Les catinones en estudi són drogues bàsiques que a pH àcid es troben carregades positivament, essent aquestes condicions adequades per la retenció dels analits en el sorbent Oasis MCX, que és un sorbent de mode mixte d'intercanvi catiònic.

Per l'estudi d'aquest sorbent les etapes d'anàlisi han estat:

1. L'acondicionament de l'*in-line* SPE entre anàlisis s'ha realitzat amb MeOH a 930 mbar durant 4 minuts seguit de 4 min d'aigua ajustada a pH 2,5 amb àcid fòrmic també a 930 mbar. L'última etapa en el procés d'acondicionament del sorbent és important per tal d'obtenir una màxima retenció dels analits. Com en aquest cas el pas de mostra es realitza a pH àcid, aquesta última etapa del preacondicionament s'ha de realitzar en aquestes mateixes condicions.
2. L'etapa de pas de mostra s'ha realitzat amb un patró de les catinones de 1 ppm preparat amb aigua Milli-Q ajustada a pH=2,5 amb àcid fòrmic durant 1 minut a 930 mbar.
3. S'ha procedit amb una etapa de rentat amb BGE de tampò fosfat 100 mmol/L i pH 2,5 amb 10 mmol/L de β -CD durant 2 minuts.
4. En l'etapa d'elució s'ha insertat un *plug* d'una solució amb un percentatge de NH_4OH en MeOH durant 20 segons a una pressió de 50 mbar. El solvent d'elució ha de tenir una composició tal que permeti trencar les interaccions dels analits amb el sorbent, les quals en aquest cas es trenquen en medi bàsic ja que els analits perden la càrrega positiva. Aquest medi bàsic es prepara en MeOH per afavorir l'elució dels compostos i trencar així les possibles interaccions hidrofòbiques analit-sorbent.
5. Per acabar s'ha realitzat l'etapa de desplaçament del solvent d'elució a través del sorbent amb BGE durant 250 segons a una pressió de 50 mbar.
6. Per últim, s'ha portat a terme la separació a 25 kV.

En l'estudi de l'etapa d'elució, es varen estudiar diferents percentatges de NH_4OH en MeOH, de 0, 0.5, 1 i 2%. En totes les proves realitzades el corrent del capil·lar ha estat inestable fins que finalment ha acabat caient.

S'han realitzat lleugeres variacions de la concentració del tampò fosfat (40 mM, 55 mM) i del pH (4.5) amb o sense la β -CD i tampoc van donar corrents estables.

L'estudi de Mohr *et al.* [9] utilitza un BGE amb acetat amònic 50 mmol/L per a la separació de catinones i, com el pH d'aquest tampó (4.5) també és adequat per la retenció dels compostos en el sorbent MCX, es va realitzar un estudi de la separació enantiomèrica de les catinones amb diferents concentracions de β -CD, 10, 15 i 20 mmol/L (Figura 11).

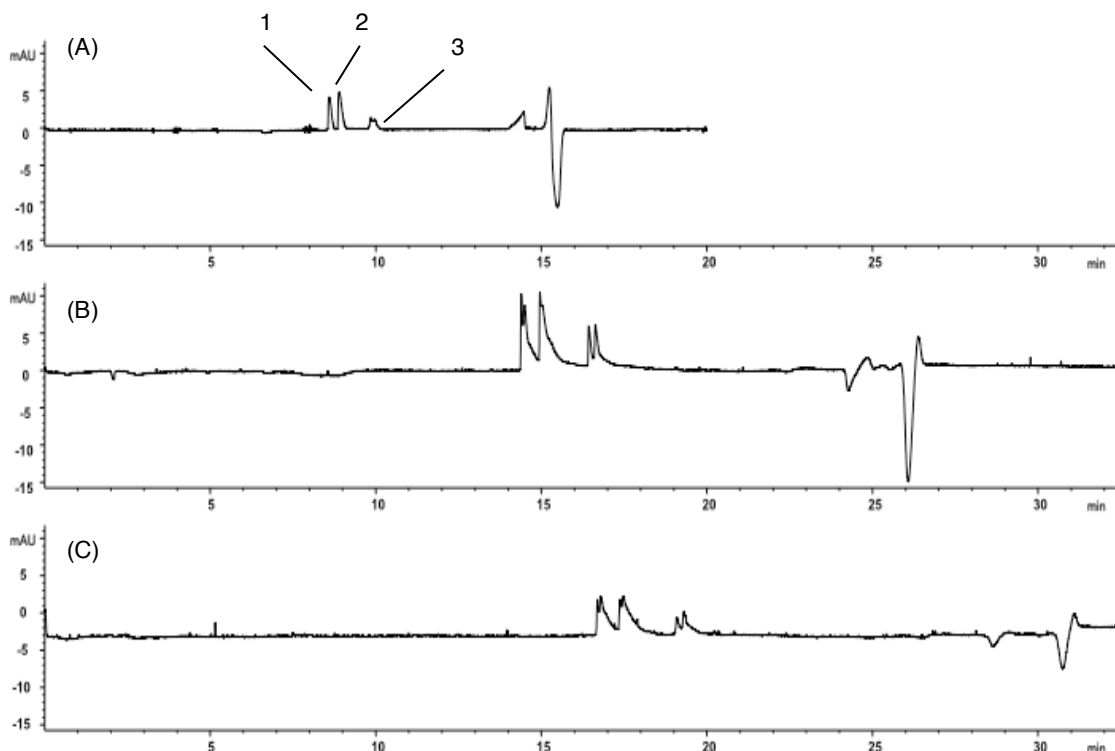


Figura 11. Efecte de la concentració de β -CD en la separació de les tres catinonens estudiades. (A) 10 mmol/L de β -CD, (B) 15 mmol/L de β -CD, (C) 20 mmol/L de β -CD. Condicions: BGE 50 mmol/L de tampó d'acetat d'amoni a pH 4,5; injecció hidrodinàmica durant 5 segons a 50 mbar; $\lambda=200$ nm; temperatura del capil·lar de 25 °C. Voltatge aplicat +15 kV (A) i +25 kV (B) i (C). Assignació dels pics: mefedrona (1); metilefedrina (2); MDPV (3).

Com es pot veure en els electroferoagrames de la Figura 11 es pot arribar a la conclusió que la separació enantiomèrica aconseguida amb el el BGE compostat d'acetat d'amoni no es satisfactoria.

Donats aquests resultats també es van provar altres tipus de ciclodextrines com la ciclodextrina α (α -CD), la ciclodextrina γ (γ -CD) i la ciclodextrina β sulfatada (S- β -CD) a concentracions de 10 i 15 mmol/L. Els resultats tampoc van ser satisfactoris.

Un cop estudiats els resultats amb els dos tipus de BGE diferents es va decidir optar per l'estudi del comportament d'un altre tipus de sorbent, ja que el Oasis MCX no ha donat resultats satisfactoris.

4.3.2. Estudi del sorbent oasis HLB

El sorbent Oasis HLB es tracta d'un sorbent de fase inversa amb balanç hidrofílic i lipofílic, que es adient per la majoria de compostos de naturalesa apolar. Les catinones en estudi son drogues bàsiques que a pH de major a 9 es troben sense càrrega, fent així que sigui un sorbent adequat per la preconcentració de catinones.

Per l'estudi d'aquest sorbent les etapes d'anàlisi han estat:

1. L'acondicionament de l'*in-line* SPE abans de cada anàlisi s'ha realitzat durant 4 minuts amb MeOH a 930 mbar seguit de 4 min d'aigua Milli-Q ajustada a pH 10 amb NaOH 1M.
2. L'etapa de pas de mostra s'ha realitzat durant 1 minut a 930 mbar amb un patró de les catinones de 0.1 ppm en aigua Milli-Q a pH 10 ajustada amb NaOH 1M.
3. L'etapa de rentat s'ha fet amb BGE tampò fosfat a 100 mmol/L i 10 mM de β -CD a pH 2.5 durant 2 minuts a 930 mbar.
4. En l'etapa d'elució s'ha insertat un *plug* d'una solució d'un 5% de BGE en MeOH durant 20 segons a 50 mbar.
5. S'ha realitzat el *pushing* amb BGE durant 250 segons a pressió de 50 mbar.
6. Per últim, s'ha portat a terme la separació a 25 kV.

A partir d'aquestes condicions inicials, es van estudiar diferents variables per tal d'arribar a unes condicions de preconcentració i de separació òptimes.

- **Estudi del pH de la mostra**

D'acord amb els valors de pK_a que presenten les catinones, l'estudi del pH de la mostra és una variable important en la retenció dels anàlits en el sorbent. L'interval de variació del pH no pot ser gaire ampli degut a que el valor de pK_a del sorbent és de 12 i el valor de pK_a de les catinones és sobre 9. En conseqüència, els valors del pH de les mostres patró utilitzats en l'estudi ha estat de 10, 10.5 i 11.

Es va seguir el procediment indicat al principi d'aquest apartat variant únicament el pH de la mostra.

Els resultats mostren que la variació de pH en l'interval escollit no aporta diferències significatives en termes d'àrea del pic, per tant, el valor de pH s'ha fixat a un valor de 10.

- **Estudi de l'etapa d'elució**

En l'etapa d'elució hi ha tres variables principals a optimitzar: el temps de *pushing*, la composició del solvent d'elució i volum de solvent d'elució.

En la primera optimització, el *pushing* es realitza amb el propi BGE de separació. Es va estudiar el *pushing* a 50 mbar a 220 i 250 segons. Aquest estudi es va realitzar amb un solvent d'elució amb un percentatge de 5% de BGE en MeOH introduït a 50 mbar durant 20 segons. El temps de *pushing* es va estudiar a dos voltatges de separació, +25 kV i +30 kV. Aquesta variable és important degut a que permet a les catinones dissoltes en l'eluent atravesar el concentrador per arribar al capil·lar de separació. Un temps massa curt de *pushing* faria que l'eluent no sortís del concentrador *in-line*. En canvi, un temps massa llarg de *pushing* fa que les catinones avancin massa pel capil·lar de separació, fent així que es redueixi la llargada efectiva del capil·lar i, en conseqüència, s'obtingués una resolució menor. Els electroferogrames d'aquest estudi es mostren a la Figura 12.

Com es pot veure en els electroferogrames de la Figura 12 per un mateix voltatge de separació quan augmenta el temps de *pushing* disminueix el temps de migració. Amb un temps de *pushing* de 250 segons a 30 kV s'han obtingut els millors resultats de separació i temps d'anàlisi. Per tant, aquests han estat els valors escollits per a estudis posteriors.

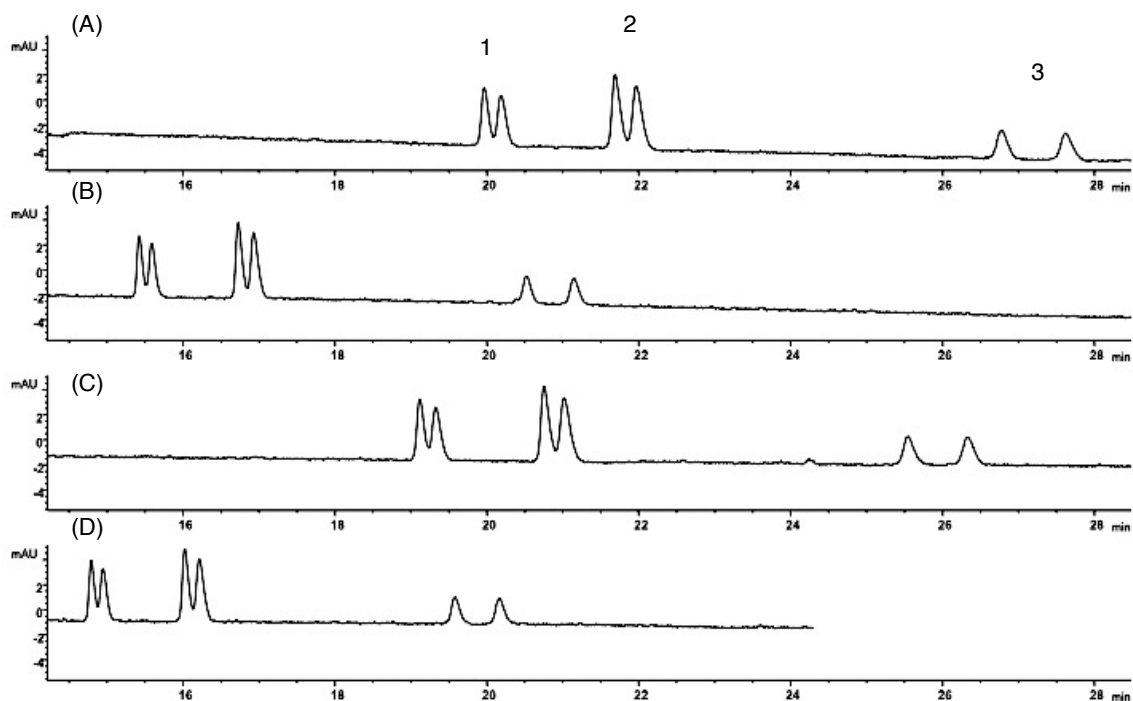


Figura 12. Estudi del temps de *pushing*. Electroferogrames obtinguts per una solució estàndard de les tres catinones a 0.1 mg/L. BGE: tampò fosfat 100 mmol/L a pH 2,5 i 10 mmol/L β -CD; $\lambda=200$ nm; temperatura del capil·lar de 25 °C; temps de *pushing* i voltatge de separació: (A) 220 segons i +25 kV; (B) 220 segons i +30 kV; (C) 250 segons i +25 kV; (D) 250 segons i +30 kV. Assignació dels pics: mefedrona (1); metilefedrina (2); MDPV (3).

A continuació, es van estudiar diferents composicions del solvent d'elució. L'elució d'un compost retintut al sorbent HLB ha de ser suficient com per trencar les interaccions de tipus hidrofòbiques entre la catinona neutra i el sorbent. Provocar l'elució es pot aconseguir de dues maneres: canviant la

polaritat de la catinona disminuint el pH del medi o dissolent les catinones en un solvent orgànic. En conseqüència, les proves de la composició de l'eluent es van realitzar de tres maneres: l'elució únicament amb metanol, l'elució amb un 5% de BGE en metanol i l'elució amb un 10% de BGE en metanol.

En aquest estudi no es van veure diferències significatives d'àrea dels pics ni de separació, per tant, l'eluent amb un 5% de BGE en MeOH es va mantenir com a solvent d'elució.

Per últim, es va optimitzar el volum d'elució mitjançant la introducció de la solució del 5% de BGE en MeOH modificant el temps de l'injecció hidrodinàmica en 20, 25 i 30 segons a 50 mbar. La Figura 13 mostra els electroferogrames de l'estudi realitzat.

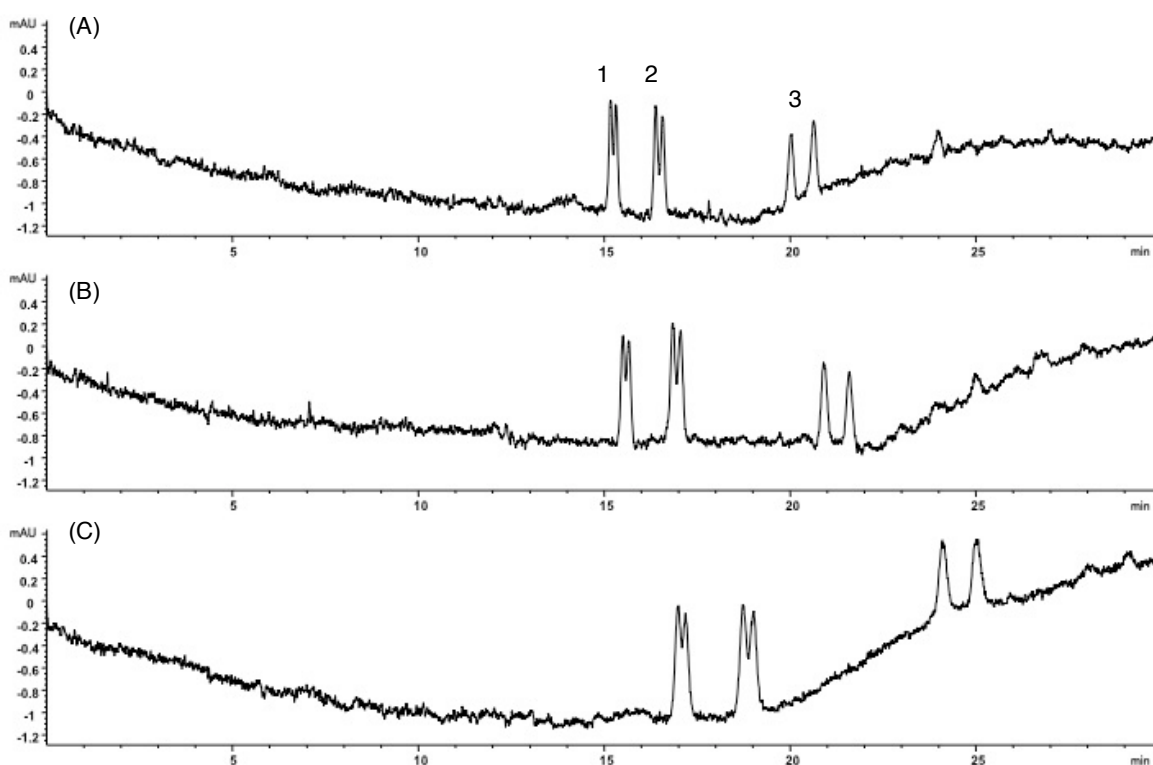


Figura 13. Estudi del temps d'elució. Electroferogrames obtinguts per una solució estàndard de les tres catinones a 0.1 mg/L. BGE: tampò fosfat 100 mmol/L a pH 2,5; $\lambda=200$ nm; temperatura del capil·lar de 25 °C; temps d'elució: (A) 20 segons; (B) 25 segons; (C) 30 segons. Assignació dels pics: mefedrona (1); metilefedrina (2); MDPV (3).

Encara que, com s'observa a la figura, a un major volum de solvent d'elució hi ha un increment de l'àrea dels anàlits, també hi ha una disminució de la resolució dels pics. A més, també provoca una retard en la sortida dels pics, fet que esdevé en un augment de l'amplitud dels pics. Tenint en compte aquestes consideracions i que l'augment de la resposta no és significatiu, s'ha seleccionat un temps d'elució de 20 segons.

• Estudi del temps d'injecció de la mostra

Per tal d'aconseguir un factor de preconcentració elevat, el volum de mostra introduïda en el capil·lar ha de ser el més elevat possible, sense que l'increment d'aquest volum representi una pèrdua en la retenció dels anàlits.

Per tal de realitzar aquest estudi es va variar el temps d'introducció de mostra en el capil·lar a una pressió de 930 mbar. El temps d'injecció estudiats varen ser 1, 10, 20 i 30 minuts. En el cas del temps de 1 minut, la concentració de la solució patró analitzada va ser de 100 ppb, i en el cas de la resta de temps va ser de 1 ppb.

Tal i com s'observa a la Figura 14, un augment del temps es tradueix en un augment de la resposta.

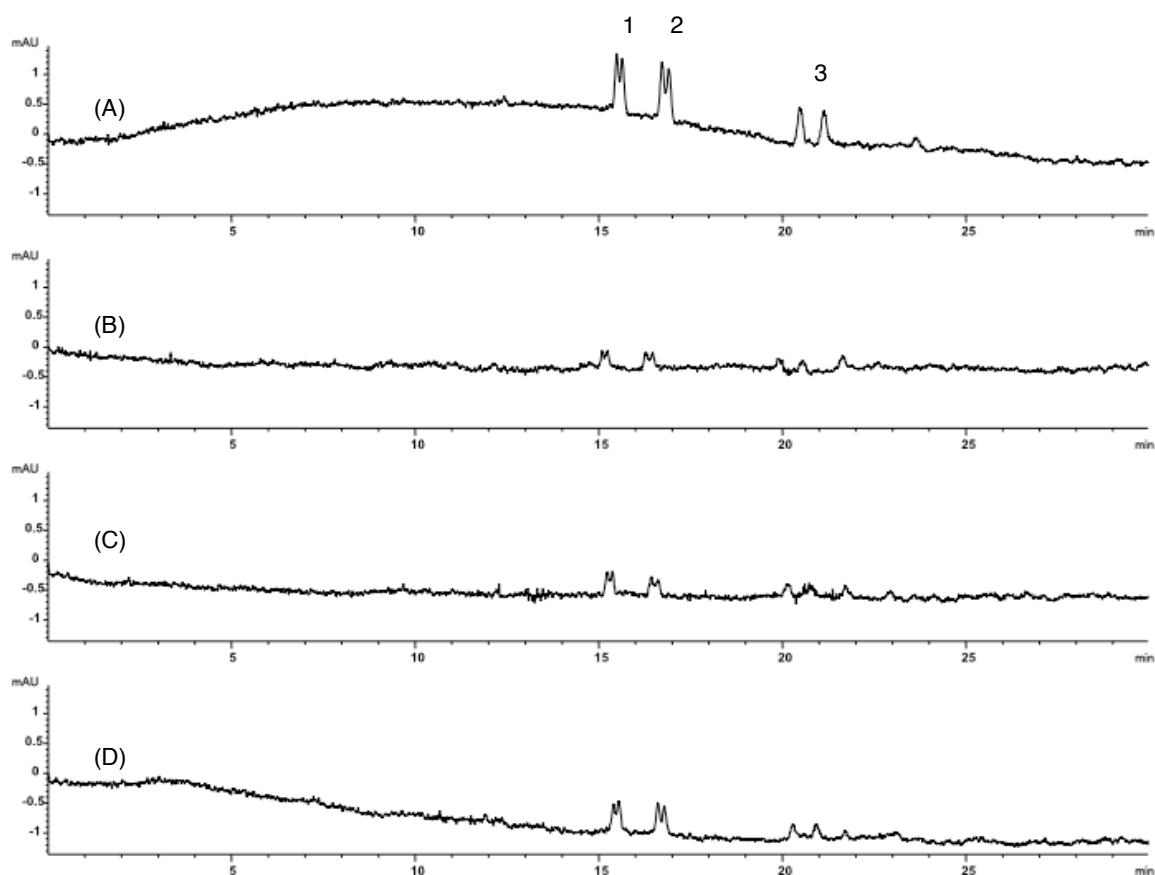


Figura 14. Estudi del temps de pas de mostra. Electroferogrames obtinguts per una solució estàndard de les tres catinones a 100 ppb (A) i 1 ppb (B,C,D); BGE: tampò fosfat 100 mmol/L a pH 2,5; $\lambda=200$ nm; temperatura del capil·lar de 25 °C; temps de pas de mostra: (A) 1 minut; (B) 10 minuts; (C) 20 minuts; (D) 30 minuts.. Assignació dels pics: mefedrona (1); metilefedrina (2); MDPV (3).

En futurs estudis per la validació de la metodologia desenvolupada, depenent de les concentracions de les catinones a les mostres biològiques, s'hauria de realitzar l'estudi del comportament linial del temps d'injecció de mostra en front la resposta. Depenent del tipus de mostra i de les concentracions de catinones, el temps d'injecció de mostra seria diferent.

5. CONCLUSIONS

In this work, the enantioseparation of three cathinone derivates by capillary zone using a separation electrolyte containing β -CD as chiral selector has been achieved in a short analysis time.

For the preconcentration of the studied analytes, in-line SPE-CE has been used with Oasis HLB as sorbent with promising results.

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. BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Paillet-Loilier, A. Cesbron, R. Le Boisselier, J. Bourguine, and D. Debruyne, "Emerging drugs of abuse: current perspectives on substituted cathinones.," *Subst. Abuse Rehabil.*, vol. 5, pp. 37–52, 2014.
- [2] J. M. Prosser and L. S. Nelson, "The Toxicology of Bath Salts: A Review of Synthetic Cathinones," *J. Med. Toxicol.*, vol. 8, no. 1, pp. 33–42, 2012.
- [3] K. Zaitsu, M. Katagi, H. Tsuchihashi, and A. Ishii, "Recently abused synthetic cathinones, ??-pyrrolidinophenone derivatives: A review of their pharmacology, acute toxicity, and metabolism," *Forensic Toxicol.*, vol. 32, no. 1, pp. 1–8, 2014.
- [4] DEA, "Report on MDPV," *Drugs of Concern*, no. October, p. 4, 2011.
- [5] S. a B. Shah, N. I. K. Deshmukh, J. Barker, A. Petróczi, P. Cross, R. Archer, and D. P. Naughton, "Quantitative analysis of mephedrone using liquid chromatography tandem mass spectroscopy: Application to human hair," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 61, pp. 64–69, 2012.
- [6] A. de Castro, E. Lendoiro, H. Fernández-Vega, S. Steinmeyer, M. López-Rivadulla, and A. Cruz, "Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of selected synthetic cathinones and two piperazines in oral fluid. Cross reactivity study with an on-site immunoassay device," *J. Chromatogr. A*, vol. 1374, pp. 93–101, 2014.
- [7] M. Švidrnoch, L. Lněničková, I. Válka, P. Ondra, and V. Maier, "Utilization of micellar electrokinetic chromatography–tandem mass spectrometry employed volatile micellar phase in the analysis of cathinone designer drugs," *J. Chromatogr. A*, vol. 1356, pp. 258–265, 2014.
- [8] A. K. Singh, É. R. M. Kedor-Hackmann, and M. I. R. M. Santoro, "Cromatografia líquida com fase quirál aplicada na separação enantiomérica de fármacos cardiovasculares," *Rev. Bras. Ciências Farm.*, vol. 42, no. 4, pp. 553–566, 2006.
- [9] 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, pp. 1624–1630, 2012.
- [10] G. Merola, H. Fu, F. Tagliaro, T. Macchia, and B. R. McCord, "Chiral separation of 12 cathinone analogs by cyclodextrin-assisted capillary electrophoresis with UV and mass spectrometry detection," *Electrophoresis*, vol. 35, no. 21–22, pp. 3231–3241, 2014.

- [11] Z. Aturki, M. G. Schmid, B. Chankvetadze, and S. Fanali, "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.
- [12] D. a. Tsioupi, R. I. Stefan-van Staden, and C. P. Kapnissi-Christodoulou, "Chiral selectors in CE: Recent developments and applications," *Electrophoresis*, vol. 34, no. 1, pp. 178–204, 2013.
- [13] M. C. Breadmore, A. I. Shallan, H. R. Rabanes, D. Gstoettenmayr, A. S. Abdul Keyon, A. Gaspar, M. Dawod, and J. P. Quirino, "Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips (2010-2012)," *Electrophoresis*, vol. 34, no. 1, pp. 29–54, 2013.
- [14] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, and C. Aguilar, "Recent advances in coupling solid-phase extraction and capillary electrophoresis (SPE – CE)," vol. 26, no. 7, 2007.
- [15] G. J. De Jong, "Recent developments in coupled SPE-CE," vol. c, pp. 44–54, 2010.
- [16] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, and C. Aguilar, "Review article Sorbent preconcentration procedures coupled to capillary electrophoresis for environmental and biological applications," vol. 6, pp. 1–18, 2008.
- [17] R. Ramautar, G. W. Somsen, and G. J. de Jong, "Developments in coupled solid-phase extraction-capillary electrophoresis 2011-2013," *Electrophoresis*, vol. 35, no. 1, pp. 128–137, 2014.
- [18] M. C. Breadmore, A. S. Palmer, M. Curran, M. Macka, N. Avdalovic, and P. R. Haddad, "On-Column Ion-Exchange Preconcentration of Inorganic Anions in Open Tubular Capillary Electrochromatography with Elution Using Implementation and Method Development," vol. 74, no. 9, pp. 2112–2118, 2002.
- [19] C. Neusüss, F. Alés-barrero, F. J. Lara, and A. M. García-campa, "Determination of sulfonamide residues in water samples by in-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis □," vol. 1216, pp. 3372–3379, 2009.
- [20] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, F. Benavente, E. Hernández, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, and C. Aguilar, "Sensitivity enhancement for the analysis of naproxen in tap water by solid-phase extraction coupled in-line to capillary electrophoresis," *J. Sep. Sci.*, vol. 31, no. 5, pp. 872–880, 2008.

- [21] L. Ruano-miguel and R. Carabias-marti, "In-capillary microextraction using monolithic polymers: Application to preconcentration of carbamate pesticides prior to their separation by MEKC," pp. 1913–1922, 2009.
- [22] L. H. Zhang, C. J. Zhang, X. Chen, Y. Q. Feng, and X. Z. Wu, "In-capillary solid-phase extraction-capillary electrophoresis for the determination of chlorophenols in water," *Electrophoresis*, vol. 27, no. 16, pp. 3224–3232, 2006.
- [23] F. J. Lara, A. M. García-campaña, F. Alés-barrero, and J. M. Bosquesendra, "In-line solid-phase extraction preconcentration in capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry for the multiresidue detection of quinolones in meat by pressurized liquid extraction," pp. 2117–2125, 2008.
- [24] L. Saavedra, N. Maeso, A. Cifuentes, and C. Barbas, "Development of a frit-free SPE-based in-column preconcentration system for capillary electrophoresis," vol. 44, pp. 471–476, 2007.
- [25] S. Fanali, "Identification of chiral drug isomers by capillary electrophoresis," vol. 735, pp. 77–121, 1996.
- [26] 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, pp. 39–46, 2003.
- [27] 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 β -cyclodextrin," *J. Chromatogr. A*, vol. 875, no. 1–2, pp. 389–401, 2000.
- [28] S. Fanali, "Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors," *J. Chromatogr. A*, vol. 875, no. 1–2, pp. 89–122, 2000.