



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Análisis de mefedrona en sustancias
estupefacientes incautadas**

Autora: Marina Villafañe Alonso

Tutor/es: Dr. Luis Mariano Deban Miguel

(Dpto. Química Analítica)

Dr. Jesús Miguel Tejedor Muñoz

(Delegación del Gobierno, Junta Castilla-León)

El trabajo que se expone a continuación se ha llevado a cabo por la estudiante de Grado en Química de la Universidad de Valladolid MARINA VILLAÑE ALONSO, en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid y en la Delegación del Gobierno, Área de Sanidad de Castilla y León, bajo la dirección del Dr. LUIS MARIANO DEBAN MIGUEL y el Dr. JESÚS MIGUEL TEJEDOR MUÑOZ.

ÍNDICE

1. RESUMEN/SUMMARY	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. Mefedrona	4
2.1.1. Mefedrona como droga sintética	4
2.1.2. Antecedentes bibliográficos	7
2.1.3. Características de la mefedrona y de los adulterantes estudiados	12
2.2. Planteamiento y objetivos	20
2.3. Líneas de actuación y justificación	21
2.3.1. Técnicas de determinación de mefedrona	21
2.3.1.1. Espectroscopía de absorción molecular UV/Vis	21
2.3.1.2. Cromatografía	21
2.3.1.3. Espectroscopía de fluorescencia	22
2.3.1.4. Espectroscopía Raman	22
3. EXPERIMENTACIÓN Y RESULTADOS	23
3.1. Cromatografía líquida de alta eficacia UV/Vis (HPLC-UV/Vis)	23
3.1.1. Equipos empleados	23
3.1.2. Preparación de la muestra “patrón”	24
3.1.3. Estudio de la capacidad de absorción por espectroscopía UV/Vis	24
3.1.4. Estimación de la pureza de la muestra incautada	28
3.1.5. Estudio de la fase móvil	28
3.2. Cromatografía de gases con detector FID (CG-FID)	35
3.2.1. Equipos empleados	35
3.2.2. Preparación de la muestra “patrón”	35
3.2.3. Estudio de las condiciones de trabajo	35
3.3. Espectroscopía de fluorescencia	40
3.3.1. Equipos empleados	40

3.3.2. Estudio de la luminiscencia por espectroscopía de fluorescencia	40
3.4. Espectroscopía Raman	43
3.4.1. Equipos empleados.....	43
3.4.2. Determinación de mefedrona y adulterantes estudiados	43
4. CONCLUSIONES	48
5. BIBLIOGRAFÍA	49
6. ANEXOS	51
6.1. Cromatografía líquida de alta eficacia UV/Vis (HPLC-UV/Vis).....	52
6.2. Cromatografía de gases con detector FID (CG-FID)	62
6.3. Espectroscopía de fluorescencia.....	70
6.4. Espectroscopía Raman.....	72

1. RESUMEN/SUMMARY

En el trabajo se realizan diferentes estudios para la puesta a punto de métodos para la determinación de mefedrona en presencia de posibles adulterantes: ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, paracetamol, cafeína, teobromina y teofilina, algunos de ellos de presencia habitual en muestras requisadas a consumidores o en el mercado de calle “menudeo”, mediante cromatografía de líquidos (HPLC) con detector UV/Vis y cromatografía de gases (GC) con detector de ionización de llama (FID). A efectos de una caracterización rápida de las muestras también se efectúa un breve estudio por espectroscopía Raman y espectroscopía de fluorescencia.

During the project we have carried out different studies for the development of methodologies, based on the determination of mephedrone in the presence of possible adulterants such as acetylsalicylic acid, salicylic acid, acetaminophen, caffeine, theobromine and theophylline. Many of these adulterant substances are commonly present in requisitioned samples from consumers or from the street market as retail products. The determination of mephedrone was carried out using a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) equipment tandem and UV visible (UV/Vis) detector, and Gas Chromatography (GC) coupled a Flame Ionization Detector (FID). For the purpose of a quick sample characterization, simple tests by Raman and Fluorescence Spectroscopy were also made.

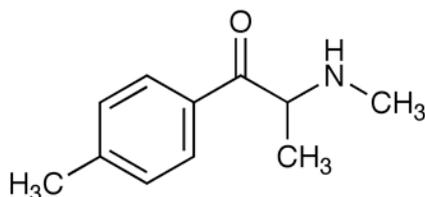
2. INTRODUCCIÓN

2.1. Mefedrona

2.1.1. Mefedrona como droga sintética

La aparición en el mercado ilegal de sustancias nuevas estimulantes es algo habitual y está en progresivo incremento, sobre todo en lo referente a compuestos de tipo anfetamínico. Estas sustancias a menudo tienen propiedades farmacológicas y/o químicas similares a las sustancias *controladas* internacionalmente como estupefacientes.

Entre las sustancias sintéticas de nueva aparición en la venta de menudeo o de calle, se encuentra la mefedrona.



Se trata de un compuesto sintético perteneciente al grupo de las catinonas con efectos estimulantes parecidos a las anfetaminas. Concretamente es una β -ketoanfetamina que es similar estructuralmente a la metcatinona (4, R=Me). Las catinonas (4, R=H) son un tipo de fenetilaminas estimulantes controladas internacionalmente, que son el principal principio activo de la planta de khat. También es conocida como mefe, miau-miau, 4-MMC, bk-MMA, o M-CAT entre otros. Un 20% de los informes enviados a la UNODC [1] en el período comprendido entre 2008 y 2015 pertenecían a las fenetilaminas y un 17% a las catinonas sintéticas.

La mefedrona está dentro de las denominadas nuevas sustancias psicoactivas (NSP) que en el mercado se conocen como "Research Chemical", "RCs", "Legal Highs", "drogas de diseño", "hierbas euforizantes" o "sustancias de investigación". Según la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC) [1] las NSP se definen como "sustancias de abuso, ya sea en forma pura o en preparado, que no son controladas por la Convención Única de 1961 sobre Estupefacientes ni por el Convenio sobre Sustancias Sicotrópicas de 1971, pero que pueden suponer una amenaza para la salud pública". Puede aparecer en forma de polvos o cristales de color blanco o amarillo, de olor característico, o también en forma de cápsulas, comprimidos o pequeñas bolitas.

En 1929 fue sintetizada por primera vez por J.Sáenz y col. [2], en la cual se produce la alfa brominación de la 1-tolilpropano-1-ona y luego reacciona con la metilamina para producir 4-metilmecatinona racémica.

A partir del año 2007 esta sustancia comenzó a venderse por internet por empresas de suministros de productos químicos. Este medio se ha convertido en un lugar popular de venta de mefedrona ya que ofrece una amplia posibilidad de anuncio a través de páginas web, redes sociales, foros de debate, blogs, etc, nombrándola con apelativos que resultan fáciles de recordar como "miau miau", "top cat", "burbujas" y "ola de marfil" y además permite una fácil distribución mediante "tiendas Online" donde además, se venden accesorios para su consumo. A veces se disfraza su venta como productos químicos de investigación, ambientadores, abono para plantas o sales de baño con una "advertencia" o "descargo de responsabilidad" en la que se indica su carácter de no aptos para el consumo humano o bien que se han de utilizar únicamente con fines de investigación. También se puede encontrar mezclada con otras sustancias como la metilona, dando lugar a productos denominados "Bubbles", "Neo Doves", etc...

El 2 noviembre del 2010, la mefedrona pasa a ser una sustancia controlada en todos los países de la Unión Europea, y el 3 de febrero del 2011 fue publicada la orden SPI/201/2011 que la incluía en la lista I de sustancias controladas en España. Finalmente durante el 58º período de sesiones de la Comisión de Estupefacientes en 2015, la mefedrona se sometió a fiscalización internacional y se clasificó en la Lista II del Convenio sobre Sustancias Sicotrópicas de 1971.

En cuanto a sus efectos, son de tipo estimulante y euforizante, como el de las anfetaminas o la cocaína y duran de 2 o 3 horas, siendo los más intensos a partir de los 45 minutos y hasta las 2 horas después de la ingesta. Además produce otros efectos secundarios tales como: pérdida de apetito, visión borrosa, ansiedad, depresión, confusión, alucinaciones etc.

Como efectos a largo plazo se puede destacar la vasoconstricción, coloración roja de la piel y problemas cardiovasculares.

Su vía de consumo suele ser oral o intranasal, teniendo efectos secundarios más graves está segunda forma de ingesta. El aumento en el consumo de mefedrona plantea una seria amenaza para la salud de los consumidores y ha hecho que aumente la demanda de tratamiento por consumo de drogas.

Aunque se tienen escasos datos de investigación clínica en animales y humanos, la mefedrona es metabolizada en el hígado produciendo los siguientes metabolitos: nor-dihidro-mefedrona, 4-carboxidihidromefedrona, nor-dihidroxitolil-mefedrona y hidroxitolil-mefedrona, siendo estas dos últimas excretadas por el riñón.

A nivel del sistema nervioso central posiblemente actúe como inhibidor de la recaptación y liberador de dopamina y norepinefrina [**páginas Web**⁽¹⁻⁸⁾].

Dadas las características actuales de sustancia ilegal, se procede al control de su venta mediante el requisado por los Cuerpos de seguridad y su correspondiente análisis en las Áreas Funcionales de Sanidad en las Subdelegaciones y Delegaciones del Gobierno (dependientes orgánicamente del Ministerio de Administraciones Públicas y Hacienda), mediante el empleo de técnicas cromatográficas, (tales como HPLC, CG, etc).

En este trabajo pretendemos realizar un estudio de esta sustancia y proponer algunos procedimientos de identificación y determinación que pudieran ser alternativos a los actualmente utilizados.

2.1.2. Antecedentes bibliográficos

En la bibliografía consultada figuran varios métodos analíticos para la identificación y cuantificación de la mefedrona. Las técnicas más empleadas son la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos de alta eficacia, ambas acopladas normalmente a la espectrometría de masas, aunque también se emplean otros detectores.

En este año 2016 la sección de laboratorio y asuntos científicos de la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC) ha publicado un manual para usarse en los laboratorios nacionales de análisis de drogas en el que se exponen los métodos recomendados para la identificación y el análisis de catinonas sintéticas en los materiales incautados. En dicho manual se detallan desde métodos para determinar a qué clase de compuestos pertenece una sustancia, sin especificar qué tipo de compuesto es (es decir que no se pueden considerar pruebas de confirmación), como los ensayos presuntivos de color, cromatografía en capa fina (TLC) y pruebas microcristalinas, hasta procedimientos basados en técnicas de infrarrojo y cromatografía con detector de masas [3].

A continuación vamos a comentar brevemente algunos de los procedimientos citados en dicho manual:

El ensayo presuntivo de color empleado es el de Zimmermann, que consiste en añadir dos gotas de 1,3-nitrobenzoceno en metanol al 1% masa/volumen y 2 gotas de hidróxido de potasio en agua al 15% masa/volumen, observándose para la mefedrona un color inmediato morado oscuro que después de cinco minutos vira a granate/morado.

La TLC es un método barato, rápido y sensible. Las placas están formadas por capas (fases estacionarias) de gel de sílice de 0,25 mm de grosor y un indicador inerte que produce fluorescencia en respuesta a la luz ultravioleta ($\lambda=254$ nm). Los eluyentes son acetato de etilo, metanol y amoníaco al 25% (85:10:5) y las disoluciones se preparan en metanol. La visualización se produce a partir de las manchas generadas que, en el caso de la mefedrona, son de color negro.

Las pruebas microcristalinas se basan en la reacción de la mefedrona con una solución acuosa de cloruro de mercurio originando formaciones cristalinas que posteriormente se analizan mediante un microscopio de luz polarizada y se comparan con el material de referencia.

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier permite confirmar la identidad de una sustancia de forma inequívoca a partir de su espectro exclusivo. Las señales obtenidas se encuentran en un intervalo de frecuencias entre 3416,6 y 477,7 cm^{-1} .

En GC-MS se utiliza una columna capilar de 5% de fenilo y 95% de metil silicona de 30 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 mm de grosor de la película. El gas portador utilizado es el helio. Se utiliza metanol como disolvente de extracción. No se necesita derivatizar la muestra.

La HPLC-MS/MS es otra de las técnicas, acopladas, recomendada [3]. Se emplea una columna C18 de 75 x 4,6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 3,5 μm . La fase móvil, que se compone de una mezcla A de 95% de agua + 5% de acetonitrilo + 0,1% de ácido fórmico y una mezcla B de 95% de acetonitrilo + 5% de agua + 0,1% de ácido fórmico, combina un flujo isocrático (de 0 a 2 minutos (90:10), y de 7 a 9 minutos (60:40)) con un flujo en gradiente de 2 a 7 minutos.

Además del anterior documento existen diferentes trabajos en los que se detalla la determinación de mefedrona en presencia de otras sustancias. E. Y. Santali y col. [4] desarrollaron y validaron un método para la detección y el análisis cuantitativo de la mefedrona en presencia de una serie de adulterantes (cafeína, paracetamol, benzocaína, lidocaína, sacarosa, manitol, actosa, metilona, ketamina, cocaína y diamorfina) por HPLC en fase reversa. Se utiliza una columna C18 de 150 x 4,6 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 3 μm . La fase móvil, se compone de metanol y formiato de amonio (28:62). Al cromatógrafo de líquidos se le acopla un detector de diodo array (PDA-UV), que permite la determinación en UV de la mefedrona ($\lambda=258\text{nm}$) junto con otros componentes).

Los analitos con elevada absorción en UV (paracetamol, cafeína, metilona, mefedrona y benzocaína) dan respuesta lineal en un rango de concentraciones de 0,5-10 $\mu\text{g/ml}$, estando los coeficientes de correlación entre 0,993 y 0,995. Los límites de detección se determinaron entre 0,23 y 0,28 $\mu\text{g/ml}$. Para los analitos que presentan una respuesta más débil en UV (lidocaína, ketamina, cocaína y diamorfina) la respuesta del detector es lineal en un rango de concentraciones de 2,5-25 $\mu\text{g/ml}$, estando los coeficientes de correlación entre 0,987 y 0,989. Los límites de detección se determinaron entre 0,99 y 1,08 $\mu\text{g/ml}$. Finalmente se demuestra que la presencia de analitos inactivos en UV (sacarosa, manitol y lactosa) no interfieren con el resto de los analitos anteriormente mencionados.

Una gran parte de las referencias bibliográficas se refieren a la determinación de mefedrona en matrices biológicas, tales como, sangre, orina, pelo o saliva [5-9].

La GC-MS se ha usado rutinariamente para la detección de mefedrona en sangre y orina aunque recientemente también se ha comenzado a utilizar la HPLC-MS para el análisis de muestras de sangre, orina y cabello. La técnica de HPLC-MS/MS permite el análisis de trazas en muestras biológicas, como las anteriormente citadas, debido a la alta sensibilidad y selectividad de esta técnica, alcanzándose límites de detección del orden de la ppb.

Los análisis de muestras de cabello [5,6] tienen la ventaja de proporcionar información sobre el historial de ingesta de este tipo de drogas por su acumulación en el pelo durante el crecimiento del mismo, por lo que se han validado métodos tanto de cromatografía de gases como de cromatografía de líquidos. A continuación se van a mostrar diferentes métodos en los que la matriz analítica son muestras de cabello.

M. Martin y col. [5] han desarrollado y validado un método preciso y específico para la determinación de mefedrona en muestras de cabello usando cromatografía de gases con espectrometría de masas, pudiendo además determinar tanto el consumo regular como ocasional de la mefedrona. Como en el caso de las anfetaminas y la cocaína, las concentraciones de mefedrona en el pelo se encuentran en el rango de los ng/mg. Para llevar a cabo el análisis se utiliza una columna capilar apolar de 30 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 μ m de grosor de la película.

Previamente se realiza la extracción de la mefedrona. Para ello se toma una muestra de pelo, se trocea adecuadamente y se procede a su digestión con hidróxido sódico 1N. A continuación se realiza la extracción en acetato de etilo, y por último se procede a inyectar 1 μ L en el cromatógrafo de gases utilizando helio como gas portador.

Para comprobar la validez del método en presencia de otras posibles sustancias, debido al consumo de diferentes tipos de drogas, a las muestras de pelo se les añadió una mezcla de anfetaminas, catinonas y sustancias relacionadas con las anfetaminas, no observándose interferencias.

La respuesta del detector es lineal en un rango de concentraciones de 0,2 a 313,2 ng/mg, con una concentración media de 26,8 ng/mg, siendo el coeficiente de correlación superior a 0,99. El límite de cuantificación es 0,2 ng/mg y el límite de detección se estableció en 0,08 ng/mg.

S. A.B. Shah y col. [6] desarrollaron un método validado para el análisis cuantitativo de mefedrona en pelo humano por HPLC–MS/MS. La respuesta del detector es lineal en el rango de concentraciones de 5–100 pg/mg. Se utiliza una columna C18 de 2,1 μm \times 150 mm de diámetro interno, y un tamaño de partícula de 1,8 μm . La fase móvil está compuesta por acetonitrilo y agua, se trabaja en régimen de gradiente (de 0 a 3 minutos (65:35), de 3 a 5 minutos (100:0) y de 5 a 10 minutos (65:35). Como en el caso anterior previamente se debe extraer la mefedrona. Para ello se toma una muestra de pelo de 50 mg aproximadamente, se trocea adecuadamente y se procede a su digestión con hidróxido sódico 1M a 95°. A continuación se realiza la extracción líquido-líquido y por último se procede a inyectar la disolución en el cromatógrafo de líquidos. No se observa ninguna interferencia en los cromatogramas, por lo que se demuestra que el método es altamente selectivo. El coeficiente de correlación resultó ser 0,999. El valor del límite de detección es 2,5 pg/mg y el límite de cuantificación es 5 pg/mg. En el trabajo los autores indican que los tratamientos estéticos realizados sobre el pelo no afectan a la detección de la droga.

R. Lake y col. [7] desarrollan un método para la determinación simultánea por HPLC-MS/MS de anfetaminas y varias catinonas, entre las que se incluyen la mefedrona, metilona y MDPV en la orina a niveles bajos. Las catinonas son compuestos muy similares a las anfetaminas. Se utiliza una columna de ultra-bifenilo de 50 \times 2,1 mm y un tamaño de partícula de 5 μm . La fase móvil se compone de una mezcla de agua + 0,1% de ácido fórmico y de una mezcla de metanol + 0,1% de ácido fórmico y se trabaja en régimen de gradiente: de 0,00 a 2,50 minutos (85:15), de 2,50 a 3,50 minutos (45:55), de 3,50 a 3,51 (5:95) y de 3,51 a 4,50 (85:15).

La respuesta del detector es lineal en un rango de concentraciones de 1-500 ng/ml, siendo los coeficientes de correlación superiores a 0,995. Cuando las concentración de las muestras son mayores de 1000 ng/ml se produce una sobrecarga tanto en el detector como en la columna, que se puede remediar mediante el uso de un mayor factor de dilución y/o un volumen de inyección más pequeño, aunque se puede exceder el rango dinámico lineal del detector de MS/MS. El límite de cuantificación es 1 ng/mg.

P.d. Maskell y col. [8] validaron un método para la detección y cuantificación de mefedrona en sangre venosa femoral, de cuatro víctimas mortales, por cromatografía líquida de alta resolución con un detector Diode-Array. La columna empleada es de 150 \times 4,6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 5 μm . La fase móvil se compone de un flujo isocrático de acetonitrilo y un tampón 25mM (90:10). La respuesta del detector es lineal en un rango de concentraciones de 0,078-10 mg/l, siendo el coeficiente de correlación superior a 0,999.

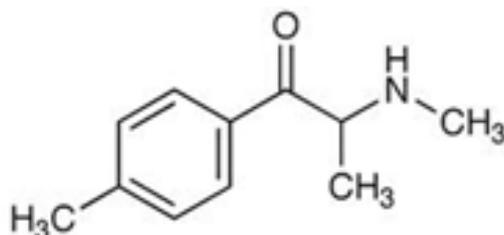
El límite de cuantificación es 0,078 mg /l y el límite de detección se estableció en 0,039 mg/l. La longitud de onda de máxima absorción de la mefedrona es 264,2 nm. Los resultados revelaron una concentración de mefedrona de 0,98; 2,24; 0,13 y 0,24 mg/l respectivamente.

Los sistemas de detección empleados para la determinación del consumo de drogas en los conductores españoles mediante análisis de saliva, implantados en los controles de carretera a partir de diciembre de 2010, solo permiten la identificación de las drogas de abuso tradicionales, incluyendo opiáceos, cocaína, anfetamina y derivados, y cannabis. Pero, debido al crecimiento en el consumo de la mefedrona, es fundamental disponer de las herramientas analíticas necesarias para identificar el consumo de esta sustancia con el fin de establecer las políticas adecuadas de prevención y control del consumo de esta nueva droga. Por todo esto, en el Servicio de Toxicología del Instituto de Técnicas Forenses Luis Concheiro, en la Universidad de Santiago de Compostela, han validado un método que permite detectar y cuantificar catinonas sintéticas, en muestras de saliva, entre las que se incluye la mefedrona, por HPLC-MS/MS [9]. La separación cromatográfica se realizó empleando una columna analítica de fase reversa de 150 x 2,1 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 3,5 µm. La fase móvil, que consta de ácido fórmico del 0,1% en agua (A) y acetonitrilo (B), tiene un flujo en gradiente (de 0,0 a 0,5 minutos (90:10), de 6,0 a 6,1 minutos (40:60) y de 6,1 a 12 minutos (90:10)). El límite de cuantificación es 0,2 ng /mg y el límite de detección se estableció en 0,1 ng/mg.

2.1.3. Características de la mefedrona y de los adulterantes estudiados

Mefedrona

- Estructura química: 4-metilmecatinona

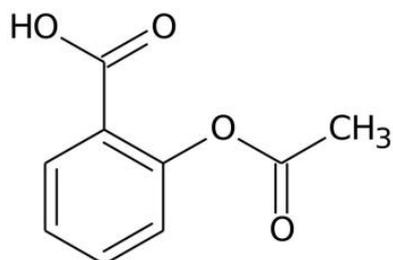


- Tabla de características:

Datos químicos		
Fórmula química	C ₁₁ H ₁₅ NO	
Peso molecular	177,24 g/mol	
Datos físicos		
Aspecto físico	Polvo blanco	
Punto de fusión	66,61°	
Solubilidad	Disolvente	g/100ml
	Agua	0,52
	Etanol	0,50

Ácido acetilsalicílico

- Estructura química: ácido 2-acetoxibenzoico

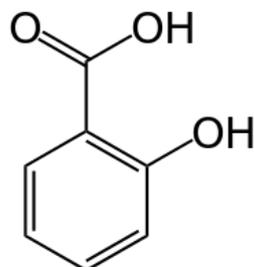


- Tabla de características:

Datos químicos		
Fórmula química	C ₉ H ₈ O ₄	
Peso molecular	180,15 g/mol	
pk_a	3,5-3,6	
Datos físicos		
Aspecto físico	Sólido incoloro casi inodoro	
Punto de fusión	135-144°	
Solubilidad	Disolvente	g/100ml
	Agua	0,33
	Etanol	20,0

Ácido salicílico

- Estructura química: ácido 2-hidroxibenzoico

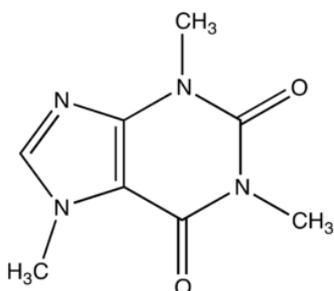


- Tabla de características:

Datos químicos		
Fórmula química	C ₇ H ₆ O ₃	
Peso molecular	138,12 g/mol	
pk_a	3,0	
Datos físicos		
Aspecto físico	Sólido blanco inodoro	
Punto de fusión	160°	
Solubilidad	Disolvente	g/100ml
	Agua	1,80
	Etanol	2,10

Cafeína

- Estructura química: 1,3,7-Trimetilxantina

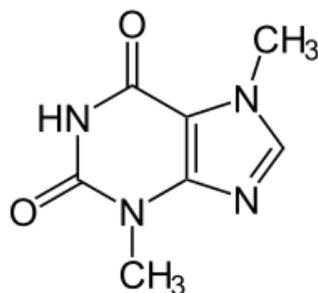


- Tabla de características:

Datos químicos		
Fórmula química	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	
Peso molecular	194,19 g/mol	
pk_a	14,0	
Datos físicos		
Aspecto físico	Sólido blanco inodoro	
Punto de fusión	234-239°	
Solubilidad	Disolvente	g/100ml
	Agua	1,60
	Etanol	1,50

Teobromina

- Estructura química: 3,7 – dimetilxantina

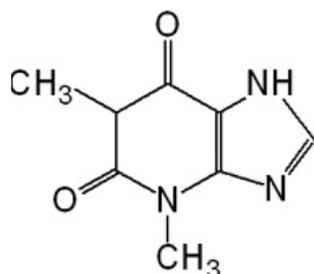


- Tabla de características:

Datos químicos		
Fórmula química	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	
Peso molecular	180,17 g/mol	
pK_a	8,8	
Datos físicos		
Aspecto físico	Sólido blanco inodoro	
Punto de fusión	357°	
Solubilidad	Disolvente	g/100ml
	Agua	0,056
	Etanol	0,042

Teofilina

- Estructura química: 1,3-Dimetilxantina:

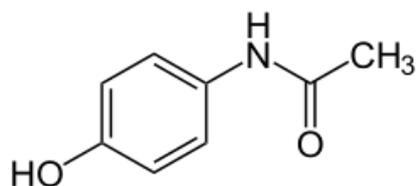


- Tabla de características:

Datos químicos		
Fórmula química	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	
Peso molecular	180,17 g/mol	
pK_a	8,8	
Datos físicos		
Aspecto físico	Sólido blanco inodoro	
Punto de fusión	270-274°	
Solubilidad	Disolvente	g/100ml
	Agua	0,83
	Etanol	1,25

Paracetamol

- Estructura química: 4-Hidroxifenilacetamida

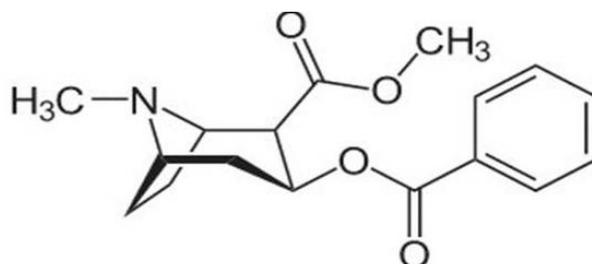


- Tabla de características:

Datos químicos		
Fórmula química	C ₈ H ₉ NO ₂	
Peso molecular	151,17 g/mol	
pk_a	9,51	
Datos físicos		
Aspecto físico	Polvo blanco finamente cristalizado	
Punto de fusión	169-171°	
Solubilidad	Disolvente	g/100ml
	Agua	1,40
	Etanol	10,0-14,2

Cocaína

- Estructura química: Benzoilmetilecgonina:



- Tabla de características:

Datos químicos		
Fórmula química	C ₁₇ H ₂₄ NO ₄	
Peso molecular	303,40 g/mol	
Datos físicos		
Aspecto físico	Polvo blanco	
Punto de fusión	98°	
Solubilidad	Disolvente	g/100ml
	Agua	0,16
	Etanol	15,38

2.2. Planteamiento y objetivos

Se pretende poner a punto métodos cromatográficos alternativos a los de HPLC-MS y GC-MS, para la determinación de mefedrona, droga sintética de la familia de las catinonas. En todos los casos se ha planteado la posibilidad de analizar la mefedrona en presencia de posibles adulterantes. Para ello nos marcamos los objetivos siguientes:

- a) Estudio por espectroscopía UV-Visible de las longitudes de onda óptimas de absorción de la mefedrona y posibles adulterantes, para realizar la determinación por HPLC con detector UV-Visible, procediendo seguidamente a la puesta a punto del correspondiente método cromatográfico.
- b) Estudio para la determinación por cromatografía de gases con detector FID, buscando las condiciones óptimas de medida y proceder a la determinación del compuesto, tanto solo como en presencia de adulterantes.
- c) Con el fin de plantear procedimientos de identificación rápida del compuesto, realizar un breve estudio por las técnicas de: espectrofotometría de fluorescencia y espectroscopia Raman.

2.3. Líneas de actuación y justificación

2.3.1. Técnicas de determinación de mefedrona

2.3.1.1. *Espectroscopía de absorción molecular UV/Vis*

La absorción de radiación UV y visible por parte de las moléculas ocurre en una o más bandas de absorción, posibilitando la determinación cuantitativa de compuestos que absorban a estas longitudes de onda. Es una técnica que se utiliza ampliamente como forma de detección en los equipos de cromatografía de líquidos de alta resolución.

2.3.1.2. *Cromatografía*

La cromatografía es el procedimiento principal utilizado en este trabajo. *Tanto la cromatografía de gases como la de líquidos, son métodos de separación físicos* en el que los componentes de una mezcla se dividen en función de sus coeficientes de distribución en una fase estacionaria, de elevada superficie específica, y en una fase móvil, que atraviesa la fase estacionaria.

La cromatografía de líquidos de alta resolución es un método de separación por elución en el que la fase móvil es un líquido. La muestra, una vez preparada, se inyecta a través del portal de inyección en la columna cromatográfica para que se produzca la separación. Cuando los compuestos salen de la columna llegan al detector el cual proporciona una señal que es registrada y visualizada en un cromatograma.

La cromatografía de gases es un método de separación por elución en el que la fase móvil es un gas. Una vez preparada la muestra se introduce en un vial para ser inyectada mediante un sistema de inyección. A continuación se vaporiza la muestra y, al ponerse en contacto con el gas portador (normalmente nitrógeno), llega a la columna para que se produzca la separación de los analitos. Una vez separados llegan al detector proporcionando una señal que es registrada y visualizada en un cromatograma.

2.3.1.3. Espectroscopía de fluorescencia

La fluorescencia es un proceso de fotoluminiscencia en el que los átomos y las moléculas se excitan con la absorción de radiación electromagnética a una determinada longitud de onda, la especie excitada se relaja al estado fundamental y emite su exceso de energía a otra longitud de onda mayor. La característica más atractiva de la fluorescencia molecular es su sensibilidad, que es de uno a tres órdenes de magnitud mayor que la de la espectroscopía de absorción molecular UV-visible.

2.3.1.4. Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman, se basa en la irradiación de la muestra con una fuente de radiación monocromática (láser) visible o infrarroja de alta intensidad en un medio transparente. Parte de esta radiación se dispersa y se registra en un espectrómetro. Es una técnica muy útil dentro del campo del análisis pues no necesita, normalmente, tratamiento previo de la muestra.

3. EXPERIMENTACIÓN Y RESULTADOS

3.1. Cromatografía líquida de alta eficacia con detector UV/Vis (HPLC-UV/Vis)

De la bibliografía consultada se deduce que la HPLC-UV/Vis no es una técnica utilizada habitualmente en la determinación de mefedrona, tanto desde el punto de vista de las publicaciones relacionadas con trabajos de investigación como desde el punto de vista de laboratorios forenses. No obstante, dada la importancia de esta técnica mixta, hemos procedido a realizar un estudio para la determinación de mefedrona junto con algunos posibles contaminantes mediante esta técnica.

3.1.1. Equipos empleados

Espectrofotómetro UV-Vis	
Equipo	HEWLETT PACKARD AGILENT 8453
Medio	Neutro
Cubeta	Cuarzo
Lámpara	Deuterio

Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia	
Equipo	Agilent 1200
Columna	Col KROMAPHASE C18 5.0 150mm x 4,6mm
Fase móvil	Agua : Acetonitrilo : Metanol : Ácido fosfórico 0,1% : Acetato amónico $5 \cdot 10^{-2}M$

3.1.2. Preparación de la muestra “patrón”

La muestra “patrón” se prepara a partir de una muestra de mefedrona proporcionada por el Área de Sanidad de la Delegación del Gobierno, de pureza aproximada al 55% (obtener patrones de mefedrona de pureza contrastada ocasionan dificultades administrativas que nos impiden acceder a este tipo de muestras).

Se pesan $8,16 \pm 0,01$ mg de muestra, se disuelven en agua desionizada y se enrasa a 10,0 ml. Se toman alícuotas de esta disolución y se enrasan al volumen que convenga obteniendo disoluciones cuyas concentraciones están comprendidas, una vez realizadas las correspondientes correcciones, entre 1 y 20 ppm.

3.1.3. Estudio de la capacidad de absorción por espectroscopía UV/Vis

Puesto que se va a utilizar un detector de estas características, se procede a realizar un estudio que tiene como finalidad determinar la longitud de onda óptima de absorción para obtener la máxima sensibilidad, selectividad y precisión en las medidas de mefedrona por HPLC.

Para ello se toman los “patrones” de mefedrona cuyas concentraciones están comprendidas entre 1 y 20 ppm y se realizan barridos entre 200 y 400 nm (la mefedrona no absorbe en el visible) frente a blancos de contenido en cafeína del orden del indicado para nuestra muestra. Los resultados se recogen en la **Figura 1**.

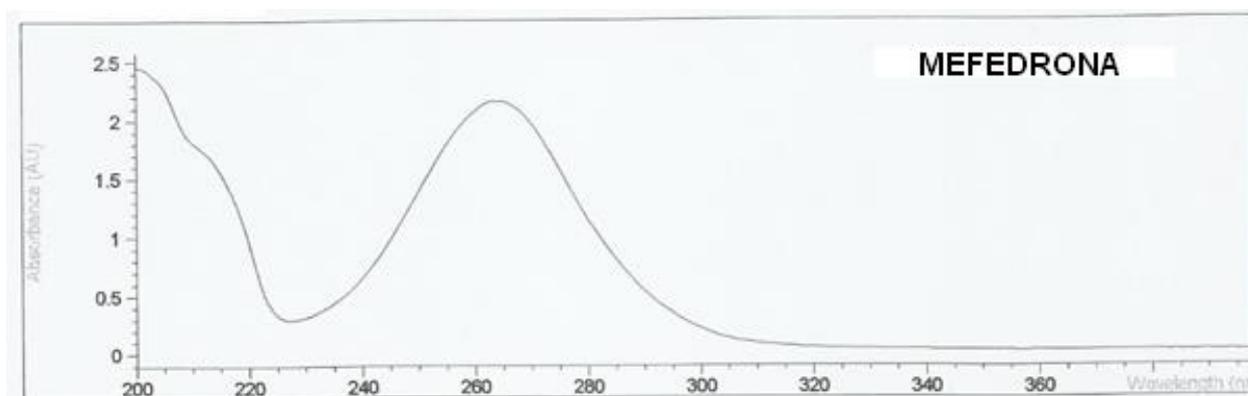


Figura 1: Espectroscopía UV/Vis del “patrón” de mefedrona

Se observa que aparecen 2 bandas. La banda a la longitud de onda menor de 200 nm no es adecuada para trabajar porque hay muchos compuestos orgánicos que absorben a esta longitud de onda. Por lo que la banda que se obtiene a una longitud de onda de 264 nm se considera la más adecuada para trabajar, por lo que se ha utilizado tanto en medida directa por absorción molecular como para HPLC.

A dicha longitud de onda se realizó una línea de calibrado para conocer la relación lineal entre la absorbancia y la concentración de la mefedrona y para obtener, además, el valor de la absorptividad molar de la mefedrona. Los resultados se muestran en la **Tabla 1** y en la **Figura 2**.

Tabla 1: Datos de la línea de calibrado de la mefedrona por espectroscopía UV/Vis

Concentración (ppm)	Absorbancia
1,3	0,110
3,5	0,225
6,2	0,350
9,7	0,512
13,1	0,716
16,3	0,784
19,2	0,957

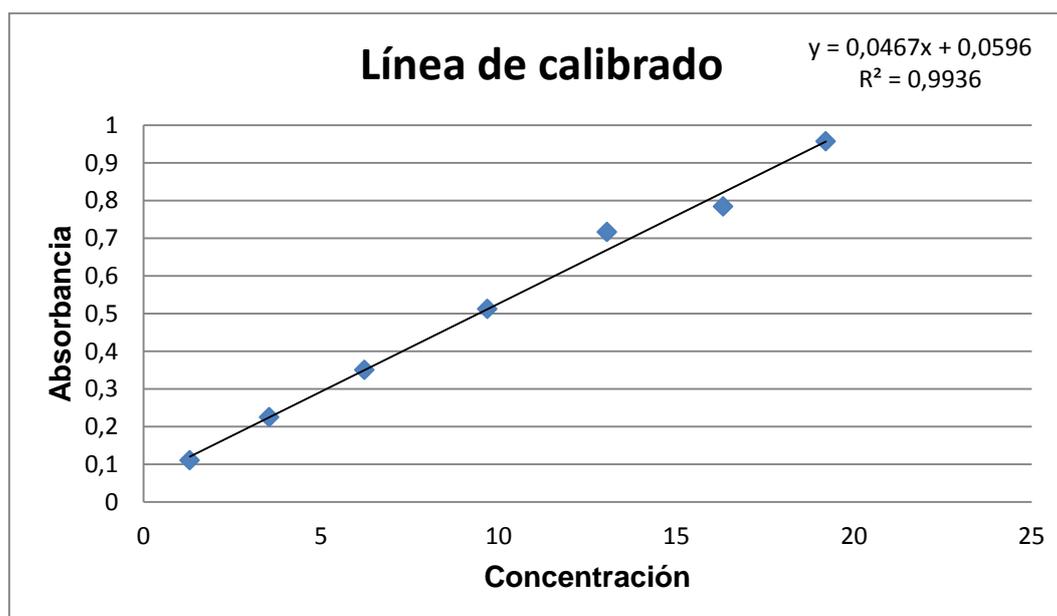
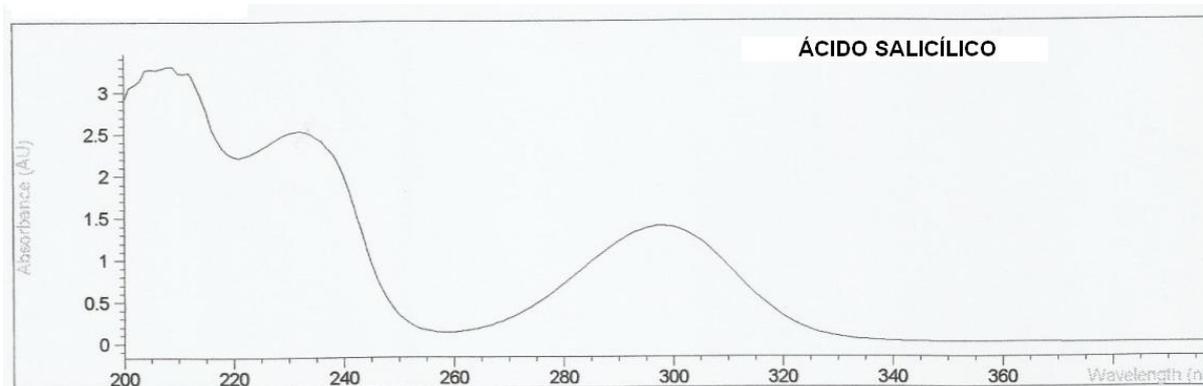
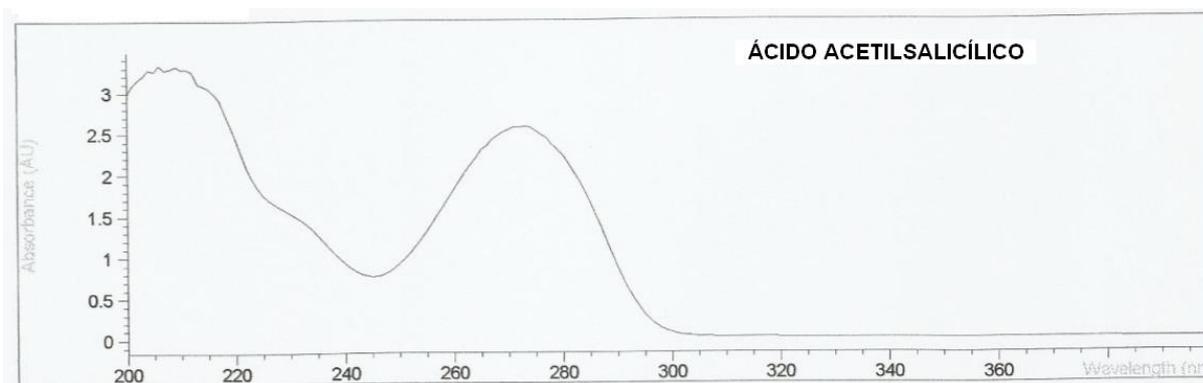
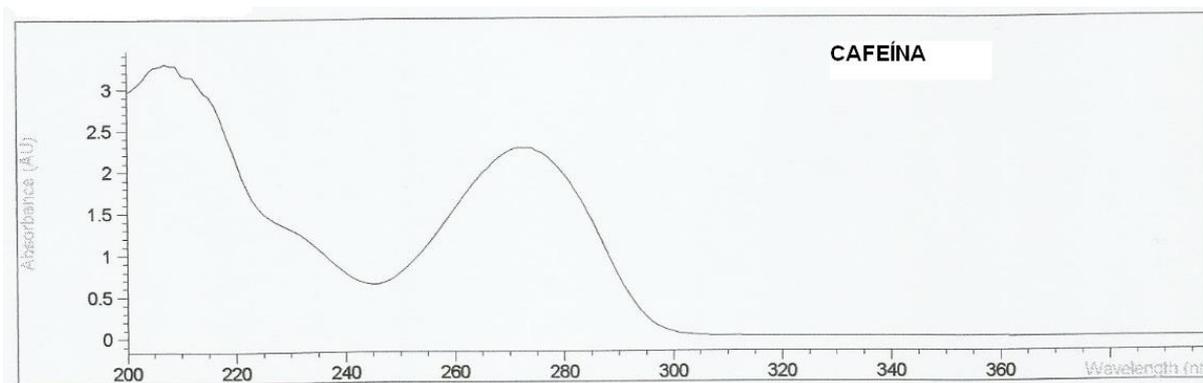


Figura 2: Línea de calibrado de la mefedrona por espectroscopía UV/Vis

De la pendiente obtenemos el valor de la absorptividad, $a=0,0467 \text{ ppm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, que corresponde a un valor de absorptividad molar de $\epsilon=8,28 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A continuación se hizo el estudio de absorción de los adulterantes. Los resultados se muestran en la **Figura 3** y en la **Tabla 2**.



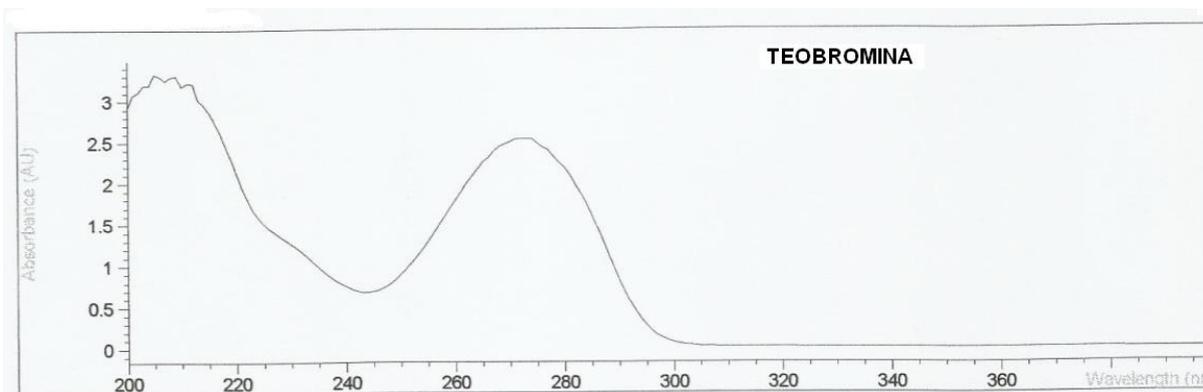
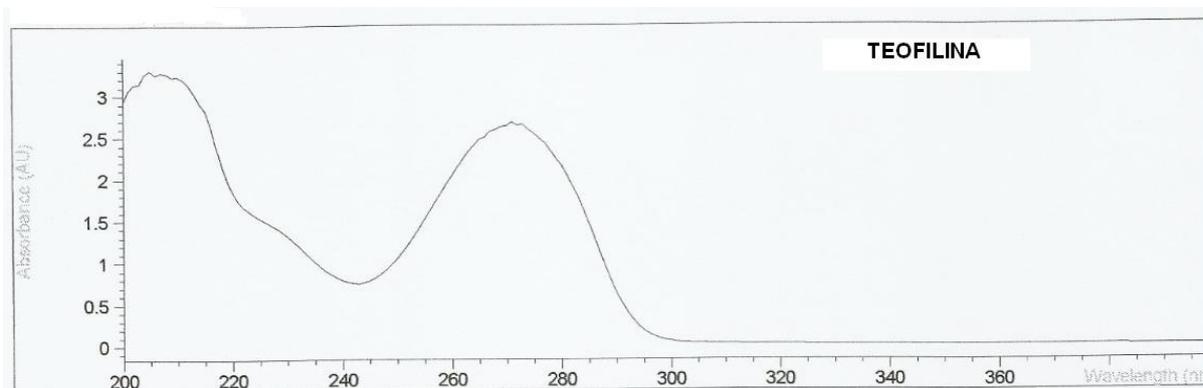
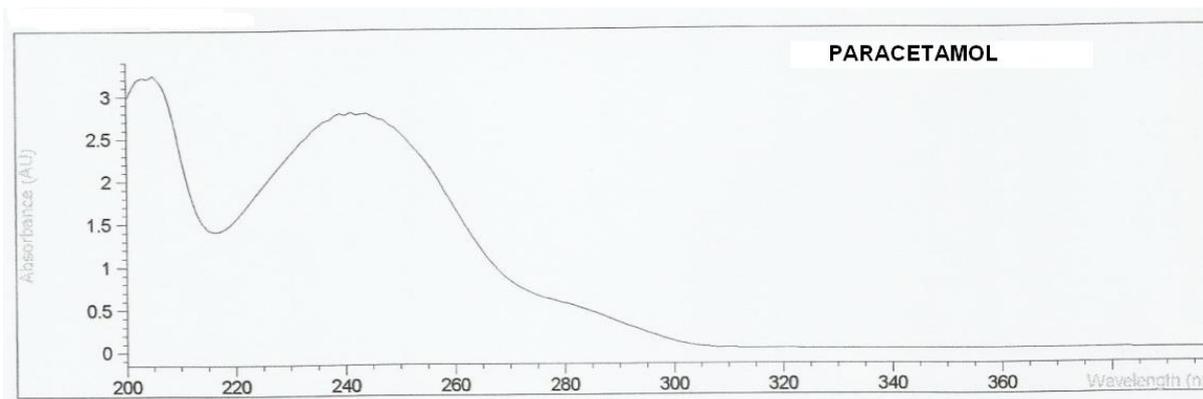


Figura 3: Espectroscopía UV/Vis de: cafeína, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, paracetamol, teofilina y teobromina

Tabla 2: Longitud de onda y bandas de los distintos adulterantes

Compuesto	Longitudes de onda de absorción (nm)	Longitud de onda de máxima absorbancia (nm)
Cafeína	207, 273	273
Ácido acetilsalicílico	209, 273	273
Ácido salicílico	208, 232, 298	298
Paracetamol	205, 241	241
Teofilina	207, 271	271
Teobromina	206, 272	272

Como se puede observar en las figuras todos los compuestos muestran absorbancia a 264 nm lo que significa que todos estos adulterantes van a dar respuesta a la λ de medida de la mefedrona.

3.1.4. Estimación de la pureza de la muestra incautada

Se ha determinado, mediante el *método de adiciones patrón*, la concentración de cafeína contenida en la muestra a partir de una disolución patrón de cafeína de concentración 16,3 ppm por espectroscopía de absorción molecular UV/Vis. De la extrapolación del correspondiente tramo recto se obtiene un resultado que implica una concentración del orden del 47% en cafeína, por lo tanto la concentración de mefedrona sería del 53%, valor próximo al suministrado por la delegación.

3.1.5. Estudio de la fase móvil

Todos los estudios se han realizado a la longitud de onda de 264 nm, correspondiente a la máxima absorción, teniendo en cuenta que la muestra inicial tiene un contenido apreciable de cafeína.

Los estudios previos para la determinación de mefedrona se realizaron con una fase móvil isocrática de Agua: Acetonitrilo en proporciones 90:10. Se obtiene un pico, a un tiempo de retención de 8,331 min, cuyo cromatograma se muestra en la **Figura 4**.

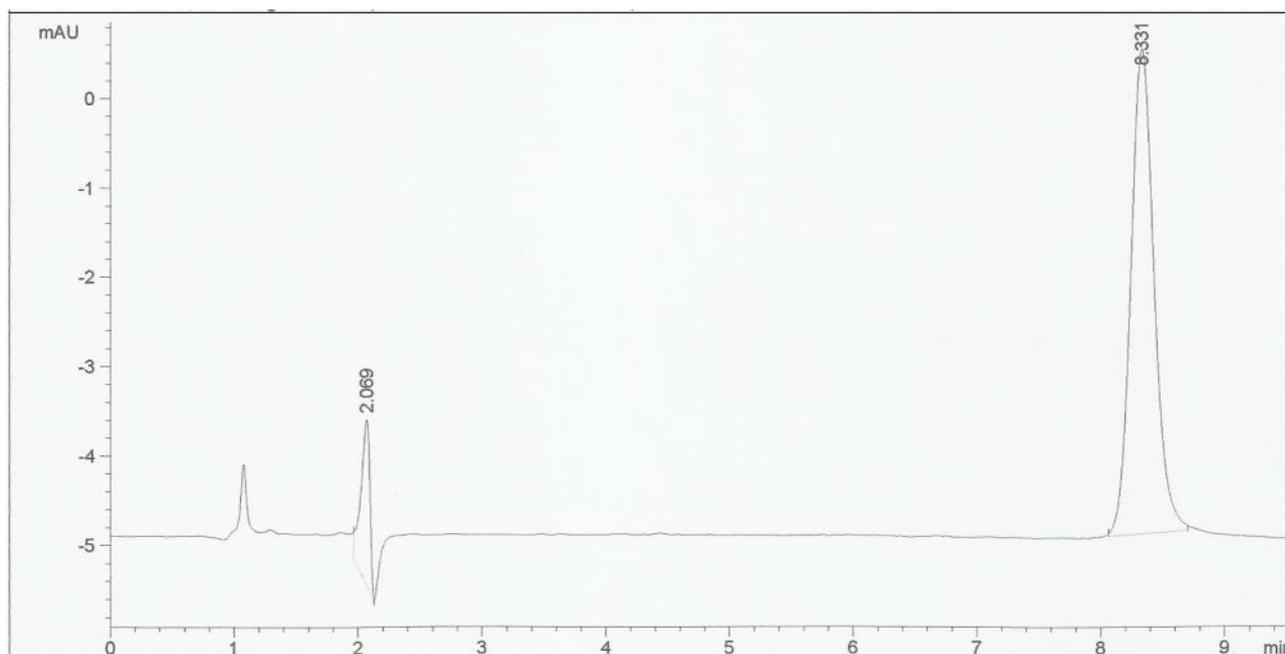


Figura 4: Cromatograma de la mefedrona con una fase móvil de Agua : Acetonitrilo en proporciones 90:10

A continuación y, a efectos de observar la influencia de la fase móvil en los tiempos de retención, se va variando la composición de la fase móvil. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3**, todos ellos correspondientes a la aparición de un único pico.

Tabla 3: Tiempo de retención de la mefedrona en régimen isocrático variando la composición de la fase móvil (A=Agua, B=Acetonitrilo)

% A	% B	t_R (min)
90	10	8,331
85	15	4,045
80	20	2,604
75	25	2,122
70	30	1,883

A continuación se hizo un estudio por separado de los adulterantes: cafeína (dada su presencia inicial en la muestra), ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, teobromina, teofilina y paracetamol, en las mismas condiciones isocráticas que en los ensayos previos (Agua : Acetonitrilo en proporciones 90:10). Los tiempos de retención obtenidos se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Tiempo de retención de la cafeína, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, teobromina, teofilina y paracetamol en régimen isocrático en proporciones 90:10

Compuesto	t_R (min)
Cafeína	8,324
Ácido acetilsalicílico	4,443
Ácido salicílico	2,250
Teobromina	3,036
Teofilina	4,435
Paracetamol	4,275

A la vista de los tiempos de retención, esta fase móvil no nos permite una separación de la cafeína y la mefedrona, y también se produce un solapamiento entre el ácido acetilsalicílico, el paracetamol y la teofilina. Por ello se procedió a realizar modificaciones en la composición de la fase móvil. Se han probado diferentes componentes (agua, acetonitrilo, metanol, ácido fosfórico 0,1% y acetato amónico $5 \cdot 10^{-2}M$) y se ha ido variando el porcentaje de cada uno de ellos para cada fase móvil. Los resultados se reflejan en las **Tablas 5 y 6**.

Tabla 5: Tiempo de retención de la mefedrona y la cafeína en régimen isocrático variando la composición de la fase móvil (A=Agua, B=Acetonitrilo, C=Metanol, D= Ácido fosfórico 0,1%, E= Acetato amónico $5 \cdot 10^{-2}M$)

% A	% B	% C	% D	% E	t_R Mefedrona (min)	t_R Cafeína (min)
80	10	0	0	10	7,720	7,697
70	10	10	0	10	6,078	6,089
75	10	5	0	10	5,972	5,511
85	10	5	0	0	5,727	5,842
80	10	10	0	0	4,960	4,989
86	14	0	0	0	4,226	4,238
80	20	0	0	0	2,671	2,645
50	30	10	10	0	1,901	1,824

Tabla 6: Tiempos de retención del ácido acetilsalicílico, teofilina y paracetamol en régimen isocrático variando la composición de la fase móvil (A=Agua, B=Acetonitrilo, C=Metanol, D=Ácido fosfórico 0,1%, E= Acetato amónico $5 \cdot 10^{-2}M$)

% A	% B	% C	% D	% E	t_R Ácido acetilsalicílico (min)	t_R Teofilina (min)	t_R Paracetamol (min)
80	10	0	0	10	2,087	4,146	4,069
75	10	5	0	10	2,081	3,565	3,536
80	10	10	0	0	4,457	2,960	2,898
50	30	10	10	0	3,704	1,742	1,795

A la vista de estos resultados consideramos que el primer objetivo, la separación de la cafeína y la mefedrona, no tiene lugar, aunque sí mejoran los resultados obtenidos con respecto a otros adulterantes.

A continuación procedimos al estudio por HPLC en régimen de gradiente (**Tablas 7 y 8**) de la mefedrona y la cafeína por separado.

Tabla 7: Gradiente 1 (A=Agua, B=Metanol, C=Acetonitrilo, D= Acetato amónico $5 \cdot 10^{-2}M$)

Tiempo (min)	% A	% B	% C	% D
0	80	0	10	10
4	40	0	50	10
5	10	0	80	10

Tabla 8: Tiempo de retención de la cafeína sola y de la mefedrona y la cafeína en régimen de gradiente 1 por separado

Compuesto	t_R (min) gradiente 1
Cafeína	1,555
Mefedrona + Cafeína	1,559/6,788

Se observa, que en estas condiciones, si se produce la separación de la mefedrona de la cafeína. Los resultados se reflejan en los **cromatogramas 1 y 2** del **Anexo 6.1**, el primero correspondiente al cromatograma de la cafeína sola y el segundo a la muestra que lleva mefedrona y cafeína, lo que permite deducir que la cafeína sale a 1,559 minutos y la mefedrona a 6,788 minutos.

No obstante a dichos gradientes no se producía una separación adecuada de otros adulterantes, e incluso originaban problemas en la identificación de la mefedrona (dependiendo de la concentración de alguno de ellos), con tiempos de retención próximos a nuestro analito, por lo que se procedió a realizar medidas a otros gradientes. Los mejores resultados se obtuvieron en las condiciones que se reflejan en la **Tabla 9**.

Tabla 9: Gradiente 2 (A=Agua, B=Metanol, C=Acetonitrilo, D= Acetato amónico $5 \cdot 10^{-2}M$)

Tiempo (min)	% A	% B	% C	%D
0	75	10	10	5
3	75	10	10	5
4	70	10	15	5
8	30	10	15	5
9	30	10	55	5
15	30	10	55	5
16	75	10	10	5

A continuación se procede al estudio individual tanto de la muestra como de los adulterantes. Los resultados obtenidos para cada uno de los compuestos por separado se muestran en la **Tabla 10** y los **cromatogramas 3-9** se encuentran en el **Anexo 6.1**.

Tabla 10: Tiempo de retención de los 7 compuestos estudiados, por separado, en régimen de Gradiente 2

Compuesto	t_R (min)
Mefedrona	11,582
Cafeína	4,891
Ácido acetilsalicílico	1,579
Ácido salicílico	2,061
Teobromina	2,309
Teofilina	3,142
Paracetamol	3,130

Finalmente se procedió a realizar un patrón mixto con los 7 compuestos estudiados y así comprobar si era posible su separación empleando el citado gradiente. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 11** y en la **Figura 5**.

Tabla 11: Tiempo de retención de los 7 compuestos, mezclados, en régimen de gradiente 2

Compuesto	t_R (min)
Mefedrona	11,648
Cafeína	5,033
Ácido acetilsalicílico	1,581
Ácido salicílico	2,034
Teobromina	2,346
Teofilina + Paracetamol	3,147

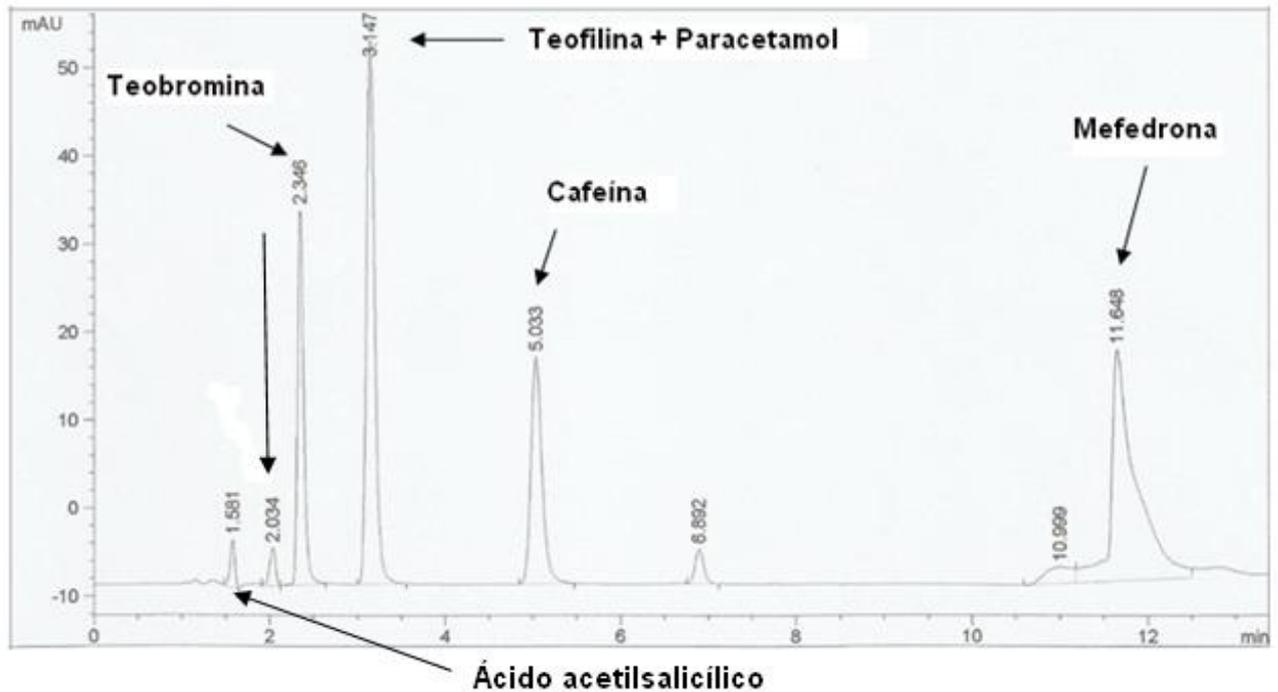


Figura 5: Cromatograma de los 7 compuestos estudiados en régimen de Gradiente 2

Como se puede observar se obtiene un cromatograma que permite la separación de todos los componentes salvo la teofilina y el paracetamol. Por ello consideramos que se ha logrado poner a punto un método por HPLC para la determinación de mefedrona en presencia de diferentes adulterantes.

3.2. Cromatografía de gases con detector FID (CG-FID)

Aunque la CG-FID es una de las técnicas que habitualmente se utiliza en los laboratorios forenses de forma rutinaria, en las publicaciones más recientes y en los centros forenses más especializados es la cromatografía de gases con detector de masas el procedimiento más adecuado para su determinación en muestras biológicas o partidas de drogas requisadas con problemática para su caracterización por los compuestos presentes en ellas.

3.2.1. Equipos empleados

Cromatógrafo de gases	
Equipo	Agilent Technologies 6890N
Columna	GC Capillary Column BP x 1.6m x 0,53mm x 2,650m
Gas portador	Nitrógeno

3.2.2. Preparación de la muestra “patrón”

La muestra patrón se prepara a partir de una muestra de mefedrona proporcionada por el Área de Sanidad de la Delegación del Gobierno de pureza alrededor del 55%.

Se pesan $8,16 \pm 0,01$ mg de muestra, se disuelven en etanol y se enrasa a 10,0ml. Se toman alícuotas de esta disolución y se enrasan al volumen que convenga obteniendo disoluciones cuyas concentraciones estarían comprendidas entre 1 y 30 ppm, una vez efectuada la correspondiente corrección asociada al porcentaje.

3.2.3. Estudio de las condiciones de trabajo

Se pretende proponer un método en el que se pueda identificar la mefedrona y los adulterantes estudiados (cafeína, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, teofilina, teobromina y paracetamol).

Primero se introdujo una muestra “patrón” de mefedrona de 30 ppm sin rampa de temperatura obteniéndose un tiempo de retención de 4,951 min, cuyo cromatograma se muestra en la **Figura 6**.

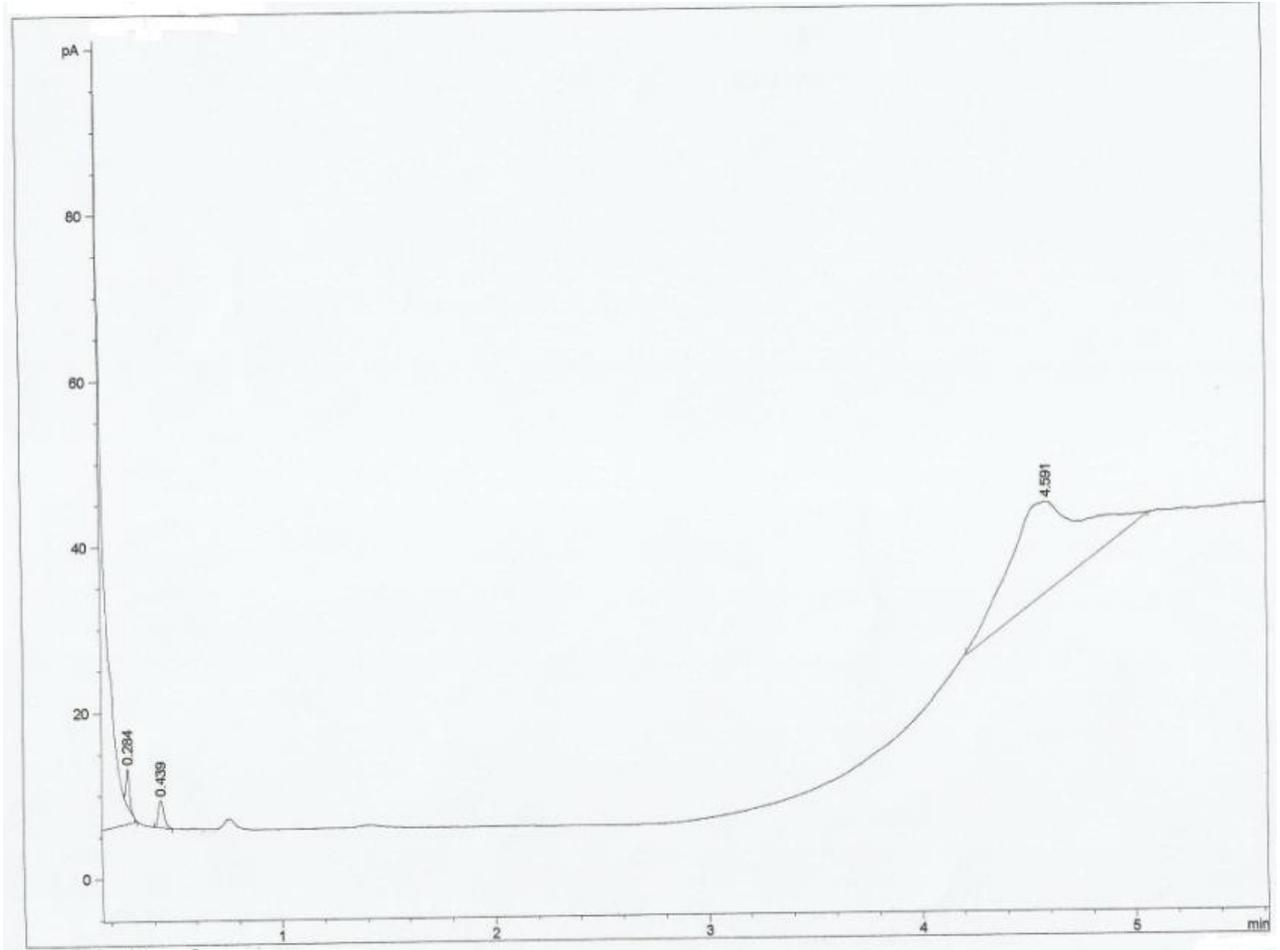


Figura 6: Muestra “patrón” de mefedrona sin rampa de temperaturas

Dada la respuesta obtenida, a la vista del anterior cromatograma, se procede a trabajar con rampas de temperaturas, a fin de obtener una respuesta más definida. Se probaron diversas rampas obteniéndose los mejores resultados en las condiciones que se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 12: Condiciones de trabajo con la rampa de temperatura

Portal de inyección	Temperatura del inyector	290°
	Split del inyector	8:1
	Flujo del Split	175 mL/min
	Volumen de inyección	1 µL
Horno	Temperatura inicial	130°
	Temperatura final	240°
	Rampa de temperatura 1	5°/min durante 8 min hasta 170°
	Rampa de temperatura 2	20°/min durante 3,50 min hasta 240°
	Duración del ensayo	12,5 min
Detector	Temperatura del horno	250°

A continuación se procede al estudio de los adulterantes. Algunos de ellos se corresponden con los que de forma más habitual se encuentran en este tipo de muestras: cafeína, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, teofilina, teobromina o paracetamol.

Se inyectaron los adulterantes, anteriormente citados, individualmente, obteniéndose los tiempos de retención que se muestran en la **Tabla 13** y en los **cromatogramas 10-16** que se encuentran en el **Anexo 6.2**.

Tabla 13: Tiempos de retención de los compuestos analizados individualmente

Compuestos	t_R (min)
Mefedrona	2,975
Cafeína	8,063
Ácido acetilsalicílico	1,567
Ácido salicílico	1,545
Teobromina	8,178
Teofilina	10,160
Paracetamol	5,683

A la vista de estos resultados, nos encontramos con el posible solapamiento de los picos correspondientes al ácido salicílico y al ácido acetilsalicílico, así como los picos de la cafeína y la teobromina, cuando se encuentren formando parte de una misma muestra.

A continuación se procede al estudio conjunto, inyectándose los patrones mixtos, observándose los resultados en la **Tabla 14** y en la **Figura 7**.

Tabla 14: Tiempo de retención de los compuestos analizados en conjunto

Compuesto	t_R (min)
Mefedrona	3,193
Cafeína	8,008
Ácido salicílico	1,513
Ácido acetilsalicílico	1,513
Teobromina	8,008
Teofilina	10,108
Paracetamol	5,605

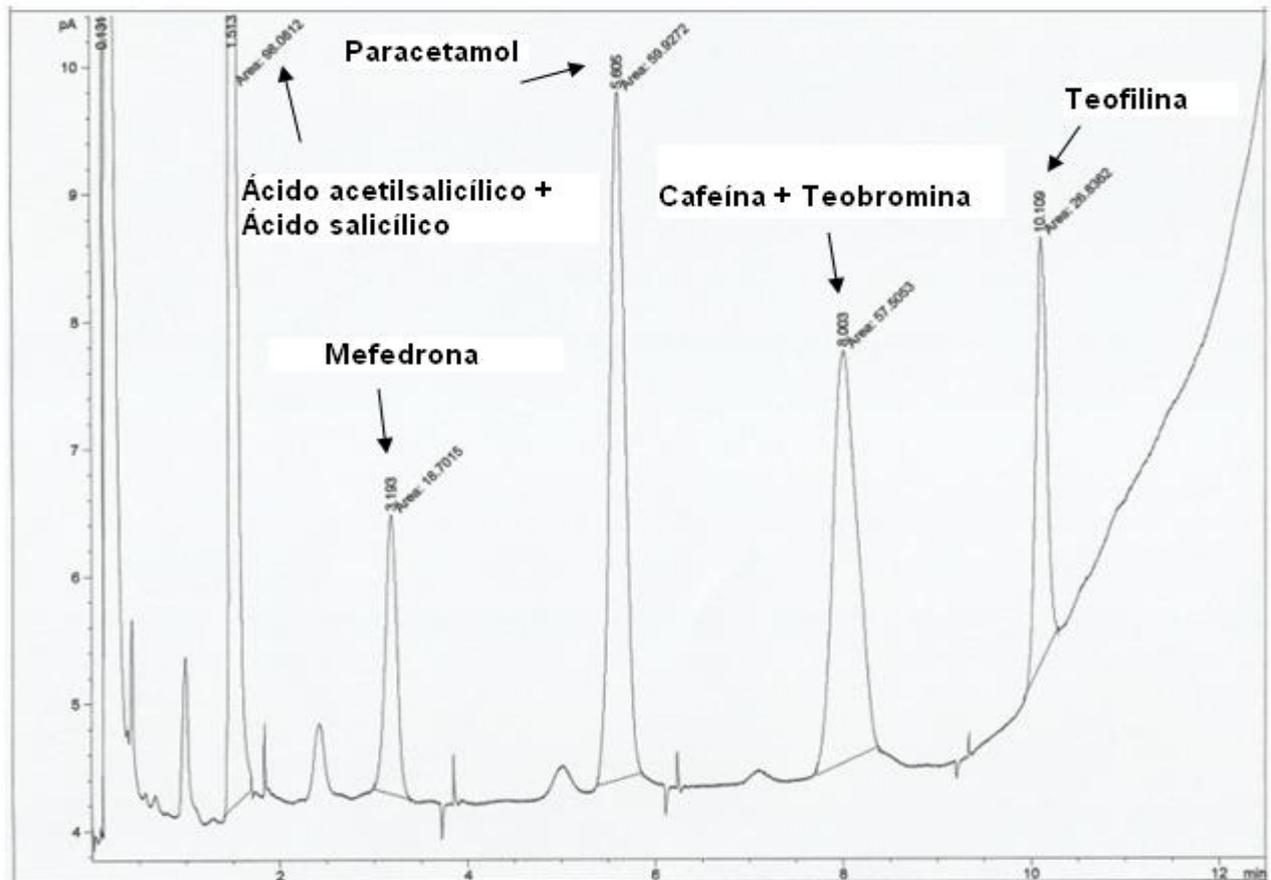


Figura 7: Cromatograma de los patrones mixtos

Como se predijo anteriormente, se solapan las bandas del ácido acetilsalicílico y la del ácido salicílico, y las de la cafeína y la teobromina.

La teofilina y teobromina como compuestos puros, no suelen ir presentes en estas muestras, sin embargo sí que pueden presentarse mediante añadidos de cacao o pequeñas cantidades de plantas aromáticas como el té.

3.3. Espectroscopía de fluorescencia

3.3.1. Equipos empleados

Espectrofotómetro de fluorescencia	
Equipo	HITACHI F-3000
Medio	Neutro
Cubeta	Cuarzo
Lámpara	Xenón

3.3.2. Estudio de la luminiscencia por espectroscopía de fluorescencia

Se utiliza esta técnica para, en función de las propiedades luminiscentes de la mefedrona, comprobar la viabilidad de la determinación de mefedrona en presencia de los adulterantes estudiados. Se ha utilizado un espectrofluorímetro que nos permite, mediante los correspondientes barridos, un estudio completo a efectos de las longitudes de onda de excitación y emisión.

Una vez realizado el correspondiente estudio, se encontró que la longitud de onda óptima de excitación para la mefedrona en agua se correspondía con 264 nm, y la longitud de onda de emisión a 533 nm.

El espectro obtenido se muestra en la **Figura 8**.

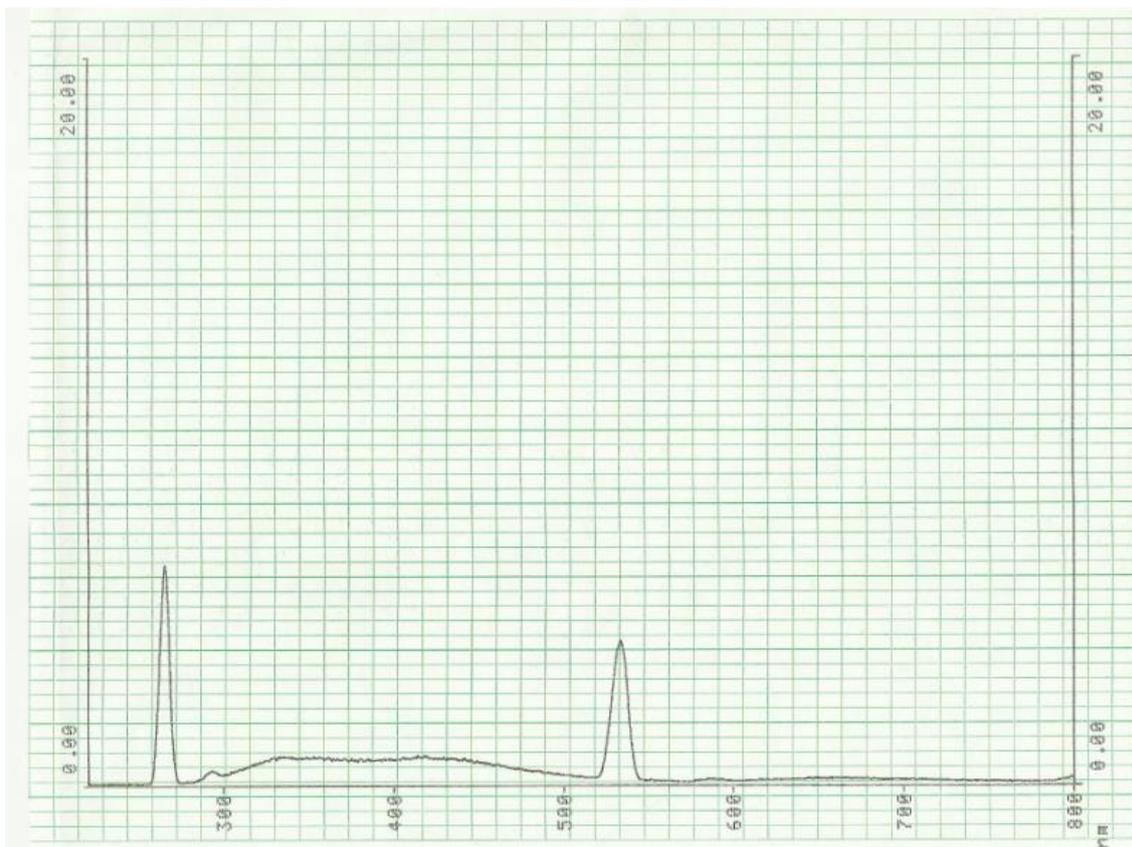


Figura 8: Espectro de fluorescencia de la mefedrona

A continuación y, con el fin de comprobar la viabilidad de llevar a cabo la determinación cuantitativa directa mediante esta técnica, se realizó una línea de calibrado, con un “patrón” de mefedrona corregido, cuyos datos se muestran en la **Tabla 15** y en la **Figura 9**.

Tabla 15: Datos de la línea de calibrado de la mefedrona por espectroscopía de fluorescencia

Concentración (ppm)	Intensidad
1,3	61,920
3,7	66,588
7,2	72,726
9,9	77,360
13,1	84,960
16,3	87,020
20,1	95,268

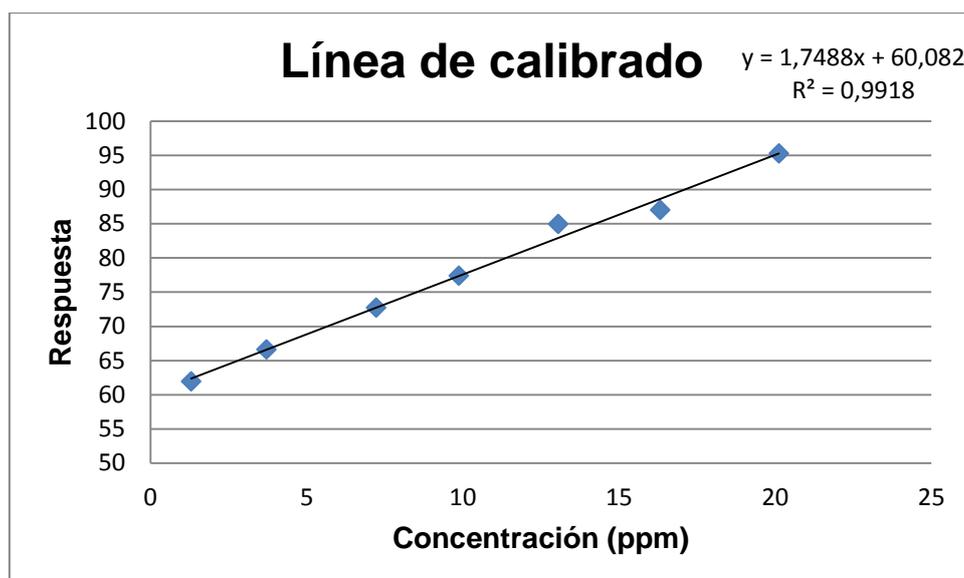


Figura 9: Línea de calibrado de la mefedrona en agua por espectroscopía de fluorescencia

En cuanto a los adulterantes estudiados, se presentó que únicamente el ácido acetilsalicílico y el ácido salicílico presentaban luminiscencia. Los espectros correspondientes se encuentran en el **Anexo 6.3.** y las longitudes de onda de los 3 compuestos fluorescentes se muestran en la **Tabla 16.**

Tabla 16: Longitudes de onda de la mefedrona, ácido acetilsalicílico y ácido salicílico por espectroscopía de fluorescencia

Compuesto	Longitud de onda de excitación (nm)	Longitud de onda de emisión (nm)
Mefedrona	264	533
Ácido acetilsalicílico	273	502
Ácido salicílico	298	420

3.4. Espectroscopía Raman

3.4.1. Equipos empleados

Equipo Raman: i-Raman B&W TEK modelo BW S415-785

3.4.2. Determinación de mefedrona y adulterantes estudiados

Se ha realizado un estudio por espectroscopía Raman de la pastilla de mefedrona incautada, que se muestra en la fotografía (**Figura 10**).



Figura 10: Pastilla de mefedrona incautada

Primero se analiza la pastilla tomando unos 10 mg, se trituran previamente en un mortero de ágata y se deposita, para mayor facilidad de enfoque, en una pequeña cavidad de una placa de aluminio. A continuación se mide por espectroscopía Raman fijando la longitud de onda de excitación en 784 nm, mediante una sonda láser. El espectro obtenido se muestra en la **Figura 11**.

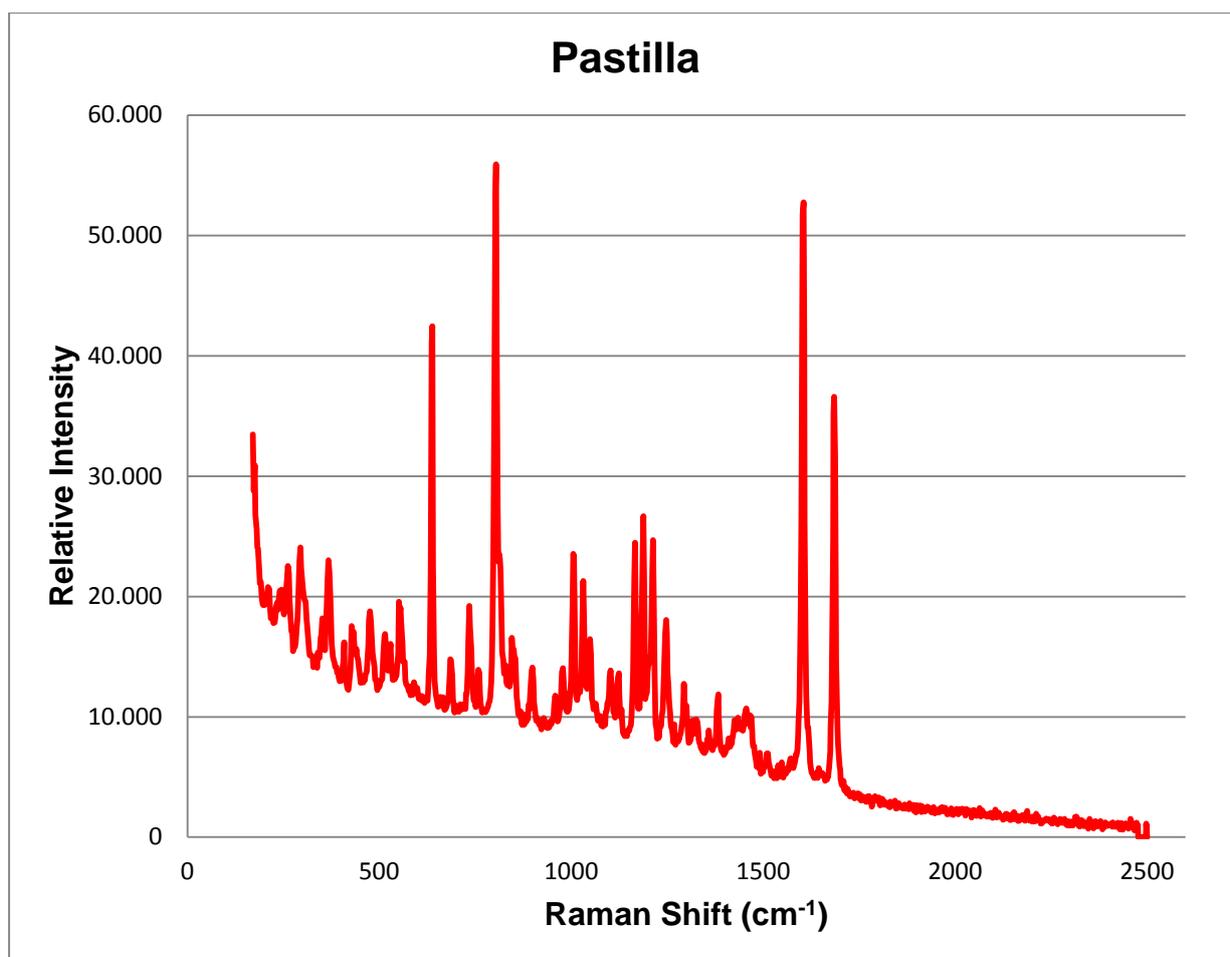


Figura 11: Espectro de la pastilla obtenido por espectroscopía Raman

Las bandas más características de la pastilla, mefedrona, se indican en la **Tabla 17**.

Tabla 17: Bandas más características de la mefedrona por espectroscopía Raman

Desplazamiento Raman (cm ⁻¹)	Intensidad relativa
638	42447
804	55905
1605	52746
1685	36590

A continuación se procedió al estudio de la cafeína, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, paracetamol y una muestra de cocaína requisada por espectroscopía Raman. Los espectros Raman obtenidos se muestran en el **Anexo 6.4**.

Las bandas más características de los adulterantes estudiados se observan en la **Tabla 18**.

Tabla 18: Bandas características de los adulterantes estudiados

Compuesto	Desplazamiento Raman (cm ⁻¹)	Intensidad relativa
Cocaína	999	63218
	1596	30474
	1714	29267
Cafeína	555	48087
	1327	21537
Ácido acetilsalicílico	749	67459
	1045	57784
	1605	76501
Ácido salicílico	772	98512
	1029	56072
	1245	55471
Paracetamol	651	32322
	797	32584
	858	54313
	1168	34853
	1236	34853
	1323	37172

En la **Figura 12** se muestra el espectro de la cafeína junto con el de la pastilla de mefedrona con el fin de observar la diferencia de bandas que permiten diferenciar la mefedrona de la cafeína en nuestro caso concreto, donde la pastilla de mefedrona se encuentra adulterada con dicha sustancia.

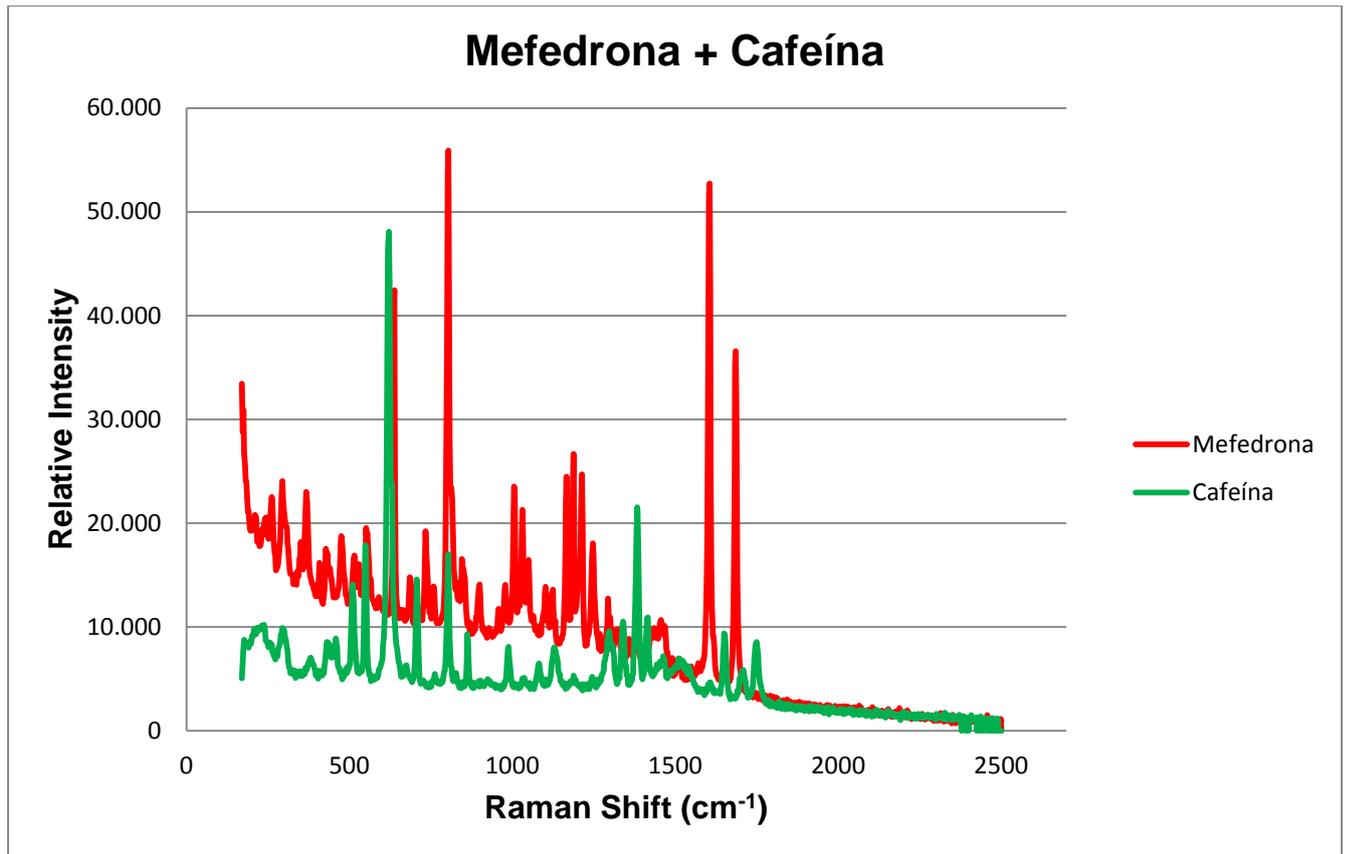


Figura 12: Superposición de los espectros de la pastilla y de la cafeína

A partir de la superposición de los espectros de los adulterantes con el espectro de la pastilla de mefedrona observamos que, dependiendo del adulterante que se considere, se solapan distintas bandas, dificultándose mucho su determinación en el caso de que sean varios los adulterantes, **Figura 13**.

No obstante, para muestras más sencillas que contengan uno o dos adulterantes sí que sería factible su identificación. Por tanto esta técnica puede ser muy adecuada para la realización de un primer análisis. Los espectros de los adulterantes junto con el de la pastilla de mefedrona se muestran en la **Anexo 6.4**.

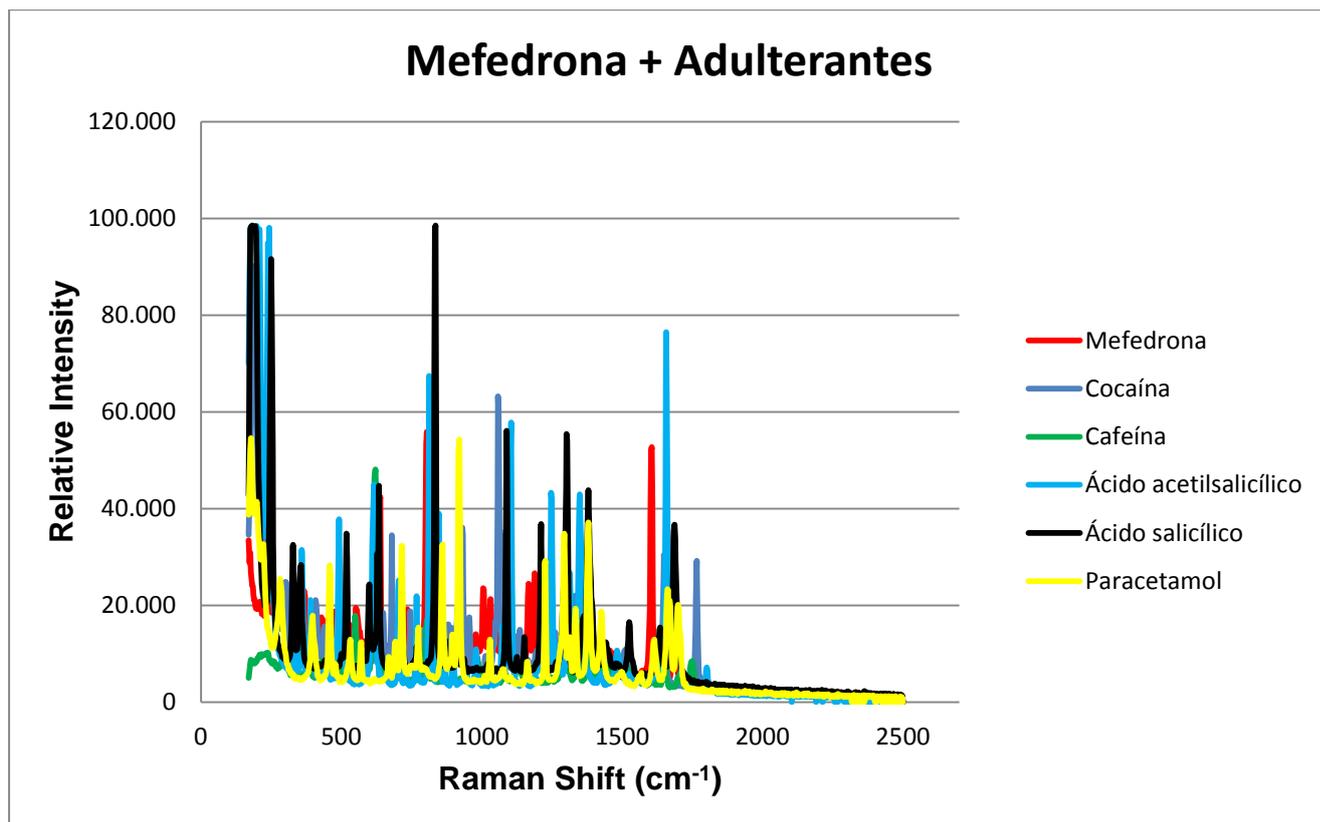


Figura 13: Superposición de los espectros de la pastilla y de la cocaína, cafeína, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico y paracetamol

4. CONCLUSIONES

- Se ha puesto a punto un método para la determinación de mefedrona por HPLC con detector UV-Vis., con un límite de detección del orden de 0,5 ppm y en un tiempo de retención no superior a 15 minutos.
- Se ha puesto a punto un método para la determinación de mefedrona por GC con detector FID, con un límite de detección del orden de 0,8 ppm y tiempo de retención no superior a los 5 minutos.
- En la aplicación de ambos métodos sobre una muestra requisada y marcada con diferentes adulterantes (cafeína, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, teobromina, teofilina y paracetamol) algunos de ellos muy comunes en este tipo de muestras, se ha logrado la diferenciación clara de la mefedrona y de la mayoría de los adulterantes, en un tiempo de análisis no superior, para todos ellos, a los 15 minutos.
- Se ha realizado una serie de ensayos para la posible aplicación de Raman y de la espectroscopia de fluorescencia, para una identificación rápida de mefedrona, tanto en el caso de componente único como en presencia de adulterantes, los resultados obtenidos nos permiten avalar el interés de estas técnicas para llevar a cabo tales determinaciones, aunque lógicamente requieren un estudio más amplio que el recogido en este trabajo

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] UNODC. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (2014).
- [2] J. Sáenz de Buruaga y Sánchez, Sur un homologue de l'ephedrine, Bull. Soc. Chim. Fr, (1929) 284-286.
- [3] UNODC. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (2016): "Métodos recomendados para la identificación y el análisis de las catinonas sintéticas en los materiales incautados", Nueva York.
- [4] E.Y. Santali, A.-K. Cadogan, N.N. Daeid, K.A. Savage, O.B. Sutcliffe, Synthesis, full chemical characterisation and development of validated methods for the quantification of (\pm)-4'-methylmethcathinone (mephedrone): A new "legal high", J. Pharm. Biomed. Anal, 56 (2011) 246– 255.
- [5] M. Martin , J.F. Muller, K. Turner, M. Duez, V. Cirimele, Evidence of mephedrone chronic abuse through hair analysis using GC/MS, Forensic Sci. Int, 218 (2012) 44–48.
- [6] S.A.B. Shah, N. I.K. Deshmukh, J. Barker, A. Petróczi, P. Cross, R. Archer, D.P. Naughton, Quantitative analysis of mephedrone using liquid chromatography tandem mass spectroscopy: Application to human hair, J. Pharm. Biomed. Anal, 61 (2012) 64– 69.
- [7] R. Lake, A. Rigdon, S. Lupo, M. Misselwitz, T. Kahler, C. Denicola, Simultaneous Determination of Mephedrone, Methylone, MDPV, and Amphetamines in Urine by LC/MS/MS, Pittcon, Conference and Expo 2012, Poster (470-03P) Orlando, Florida USA march (2012).
- [8] P.D. Maskell, G. De Paoli, C. Seneviratne, and D.J. Pounder, Mephedrone (4-Methylmethcathinone)-Related Deaths, J. Anal. Toxicol, 35 (2011).
- [9] "Evaluación de la presencia de nuevas catinonas sintéticas en conductores españoles mediante análisis de muestras de fluido oral por LC-MS/MS". Instituto de ciencias forenses Universidad Santiago de Compostela (2013).

Páginas Web

- 1) Energy Control (2011): www.energycontrol.org
- 2) Centro provincial de drogodependencias: <http://cpd.dipusevilla.es>
- 3) Acofarma distribución, S.A (1999). www.acofarma.com
- 4) PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- 5) Cayman Chemical: <https://www.caymanchem.com/pdfs/10801.pdf>
- 6) Nutrición hospitalaria: www.nutricionhospitalaria.org
- 7) Energy Control (2011): “Informe 2011 Análisis de sustancias”.
- 8) World Health Organization (2014): Critical Review Report Mephedrone”, http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/4_12_review.pdf

6. ANEXOS

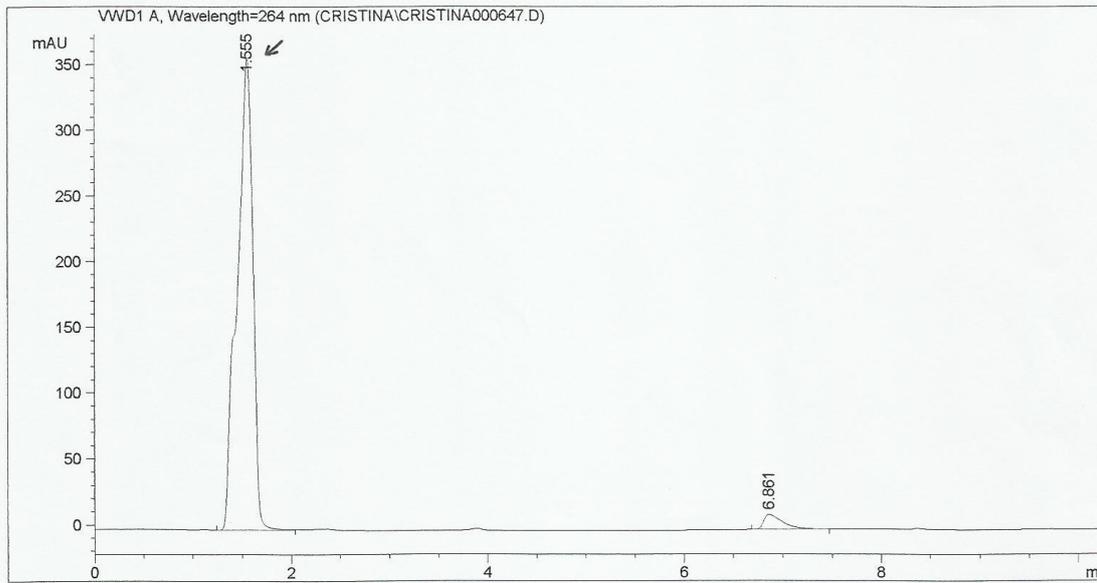
6.1. Cromatografía líquida de alta eficacia con detector UV/Vis (HPLC-UV/Vis)

Data File C:\CHEM32\1\DATA\CRISTINA\CRISTINA000647.D
 Sample Name: cafeina50 rampa 5

CAFEÍNA GRADIENTE 1

=====
 Acq. Operator : agua ds
 Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
 Injection Date : 11/26/2015 5:20:08 PM
 Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CAF2012.M
 Last changed : 11/26/2015 5:19:49 PM by agua ds
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CAF2012.M
 Last changed : 6/17/2016 12:06:55 PM by eliam
 (modified after loading)

CROMATOGRAMA 1



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=264 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	1.555	VB	0.1679	4099.98730	359.64694	96.3997
2	6.861	BB	0.1985	153.12576	11.43513	3.6003

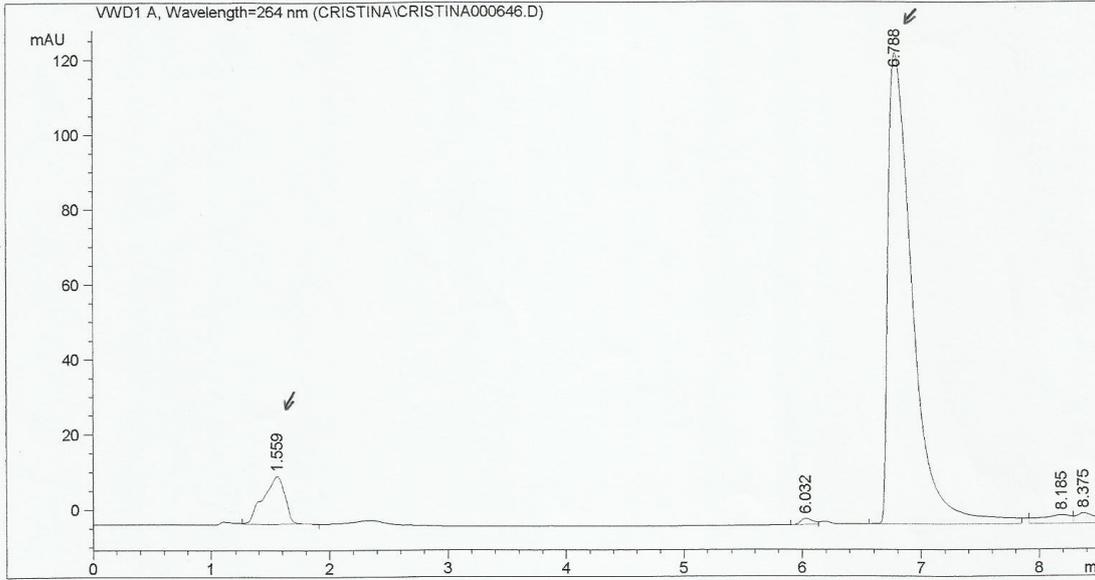
Totals : 4253.11307 371.08207

Data File C:\CHEM32\1\DATA\CRISTINA\CRISTINA000646.D
 Sample Name: mefe30 rampa 5

MEFEDRONA + CAFÉINA GRADIENTE 1

=====
 Acq. Operator : agua ds
 Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
 Injection Date : 11/26/2015 5:10:58 PM
 Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CAF2012.M
 Last changed : 11/26/2015 5:10:41 PM by agua ds
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CAF2012.M
 Last changed : 6/17/2016 12:06:18 PM by eliam
 (modified after loading)

CROMATOGRAMA 2



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=264 nm

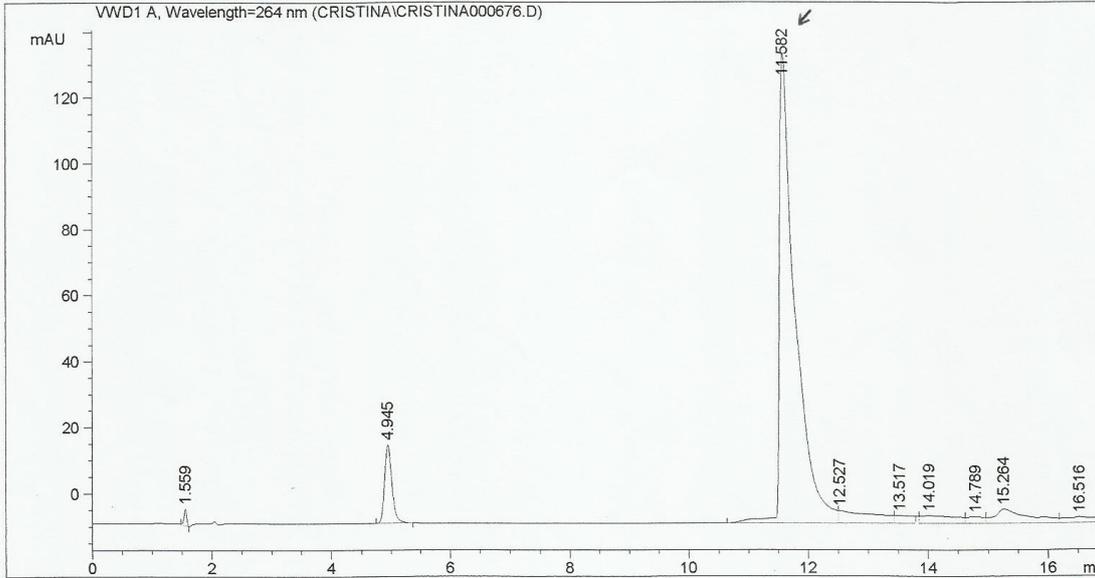
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.559	VB	0.1763	166.42357	12.80803	8.0700
2	6.032	BV	0.1089	12.60379	1.74842	0.6112
3	6.788	BB	0.2225	1802.86597	125.84315	87.4226
4	8.185	BV	0.2508	43.01829	2.34047	2.0860
5	8.375	VBA	0.1740	37.33013	2.86199	1.8102

Data File C:\CHEM32\1\DATA\CRISTINA\CRISTINA000676.D
Sample Name: mefe 50(nueva)rampa cristina

MEFEDRONA GRADIENTE 2

=====
Acq. Operator : agua ds
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
Injection Date : 12/1/2015 5:04:02 PM
Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CAF2012.M
Last changed : 12/1/2015 5:03:08 PM by agua ds
(modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CAF2012.M
Last changed : 1/14/2016 7:08:19 PM by eliam

CROMATOGRAMA 3



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=264 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.559	BV	0.0500	17.27574	5.25742	0.5056
2	4.945	BB	0.1309	204.24234	23.75112	5.9771
3	11.582	BV	0.2528	2612.21484	142.72253	76.4453
4	12.527	VB	0.4937	157.00485	3.84593	4.5947
5	13.517	BB	0.2650	48.93942	2.36268	1.4322
6	14.019	BV	0.5086	97.49809	2.38698	2.8532
7	14.789	VV	0.2618	37.81261	1.93185	1.1066

Instrument 1 6/22/2016 10:25:53 AM eliam

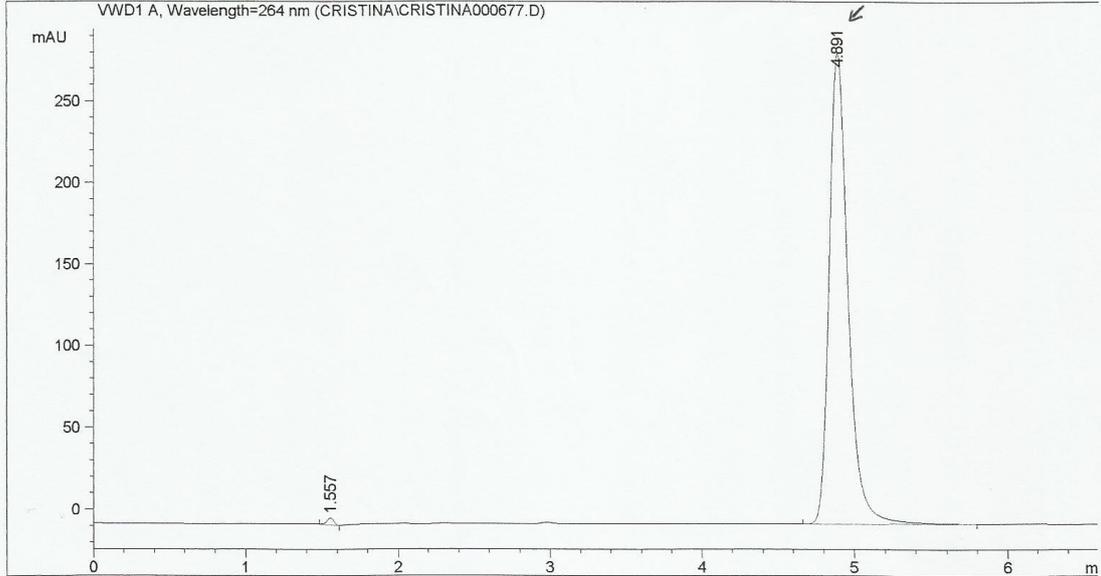
Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\CRISTINA\CRISTINA000677.D
Sample Name: cafeina 50(nueva)rampa cristina

CAFEINA GRADIENTE 2

=====
Acq. Operator : agua ds
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
Injection Date : 12/1/2015 5:22:14 PM
Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CAF2012.M
Last changed : 12/1/2015 5:20:52 PM by agua ds
(modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CAF2012.M
Last changed : 1/14/2016 7:08:19 PM by eliam

CROMATOGRAMA 4



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=264 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	1.557	BV	0.0517	14.41636	4.35961	0.5775
2	4.891	BB	0.1307	2481.82544	289.16644	99.4225

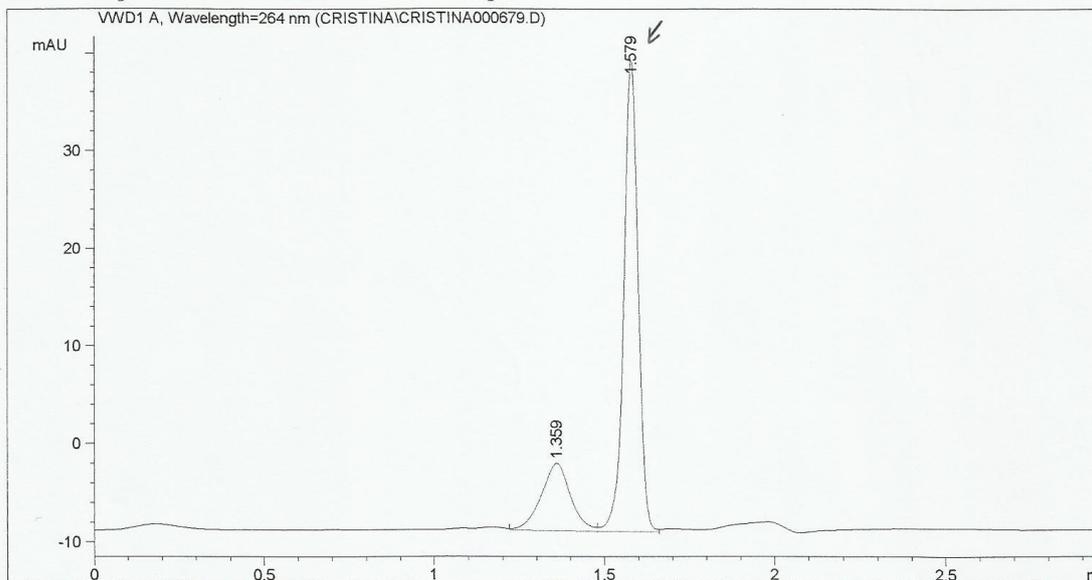
Totals : 2496.24180 293.52605

Sample Name: aas50(nueva)rampa cristina

ÁCIDO ACETILSALICÍLICO GRADIENTE 2

=====
 Acq. Operator : agua ds
 Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
 Injection Date : 12/1/2015 5:33:50 PM
 Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CAF2012.M
 Last changed : 12/1/2015 5:33:18 PM by agua ds
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CAF2012.M
 Last changed : 1/14/2016 7:08:19 PM by eliam

CROMATOGRAMA 5



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=264 nm

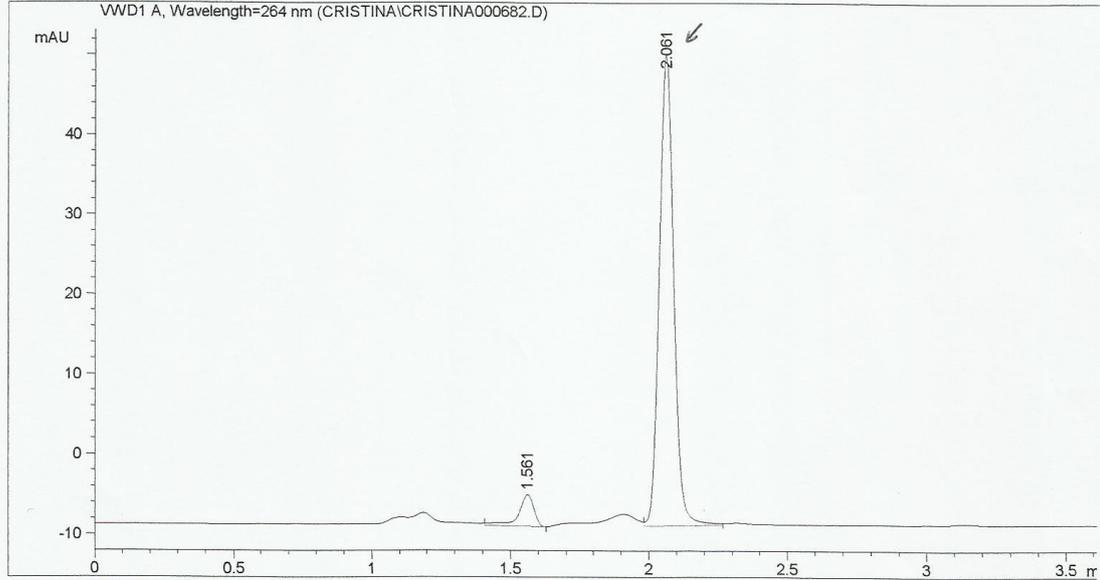
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.359	VV	0.0899	42.06603	6.91413	23.0382
2	1.579	VV	0.0454	140.52689	48.60717	76.9618
Totals :				182.59292	55.52130	

Data File C:\CHEM32\1\DATA\CRISTINA\CRISTINA000682.D
Sample Name: as50(nueva)rampa cristina

ÁCIDO SALICÍLICO GRADIENTE 2

=====
Acq. Operator : agua ds
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
Injection Date : 12/1/2015 5:42:04 PM
Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CAF2012.M
Last changed : 12/1/2015 5:41:34 PM by agua ds
(modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CAF2012.M
Last changed : 1/14/2016 7:08:19 PM by eliam

CRONATOGRAMA 6



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=264 nm

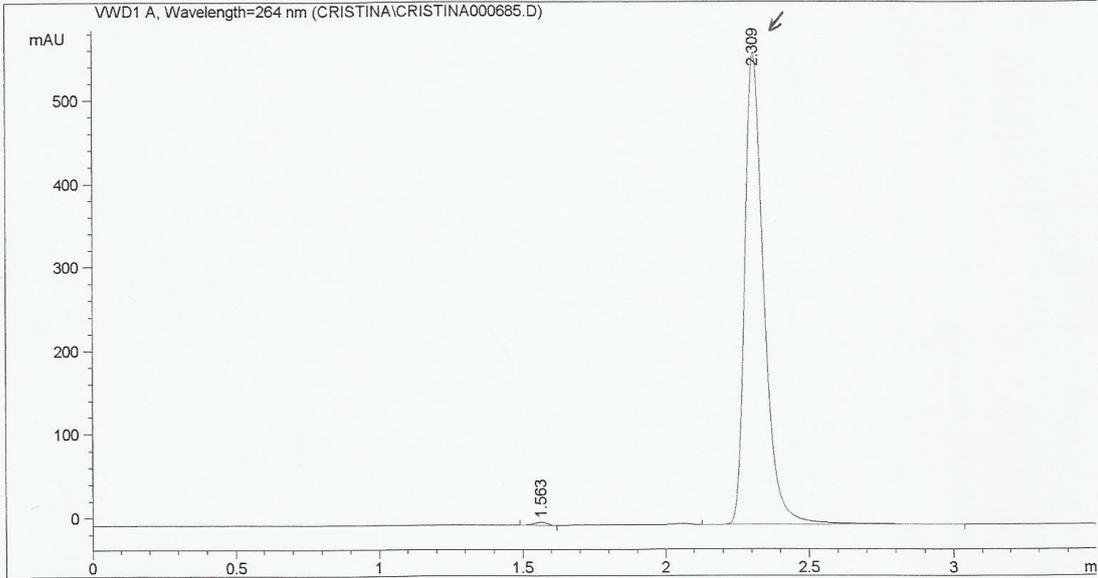
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.561	BV	0.0596	15.93833	3.99835	6.8657
2	2.061	VV	0.0571	216.20580	59.26375	93.1343
Totals :				232.14413	63.26210	

Data File C:\CHEM32\1\DATA\CRISTINA\CRISTINA000685.D
Sample Name: teobromina50(nueva)rampa cristina

TEOBROMINA GRADIENTE 2

=====
Acq. Operator : agua ds
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
Injection Date : 12/1/2015 5:55:55 PM
Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CAF2012.M
Last changed : 12/1/2015 5:55:22 PM by agua ds
(modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CAF2012.M
Last changed : 1/14/2016 7:08:19 PM by eliam

CRONATOGRAMA 7



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=264 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	1.563	BV	0.0520	13.01446	3.90748	0.4843
2	2.309	VB	0.0725	2674.17822	567.43707	99.5157

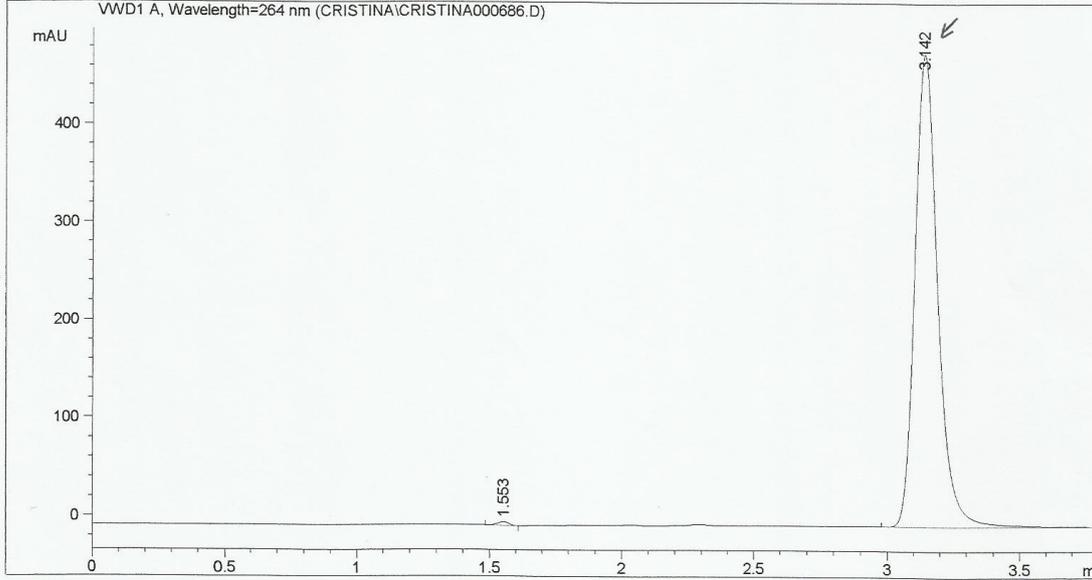
Totals : 2687.19268 571.34456

Data File C:\CHEM32\1\DATA\CRISTINA\CRISTINA000686.D
Sample Name: teofilina50(nueva)rampa cristina

TEOFILINA GRADIENTE 2

=====
Acq. Operator : agua ds
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
Injection Date : 12/1/2015 6:00:18 PM
Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CAF2012.M
Last changed : 12/1/2015 5:59:19 PM by agua ds
(modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CAF2012.M
Last changed : 1/14/2016 7:08:19 PM by eliam

CROMATOGRAMA 8



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=264 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.553	BV	0.0513	12.84198	3.92483	0.4349
2	3.142	BBA	0.0927	2940.29810	483.93237	99.5651

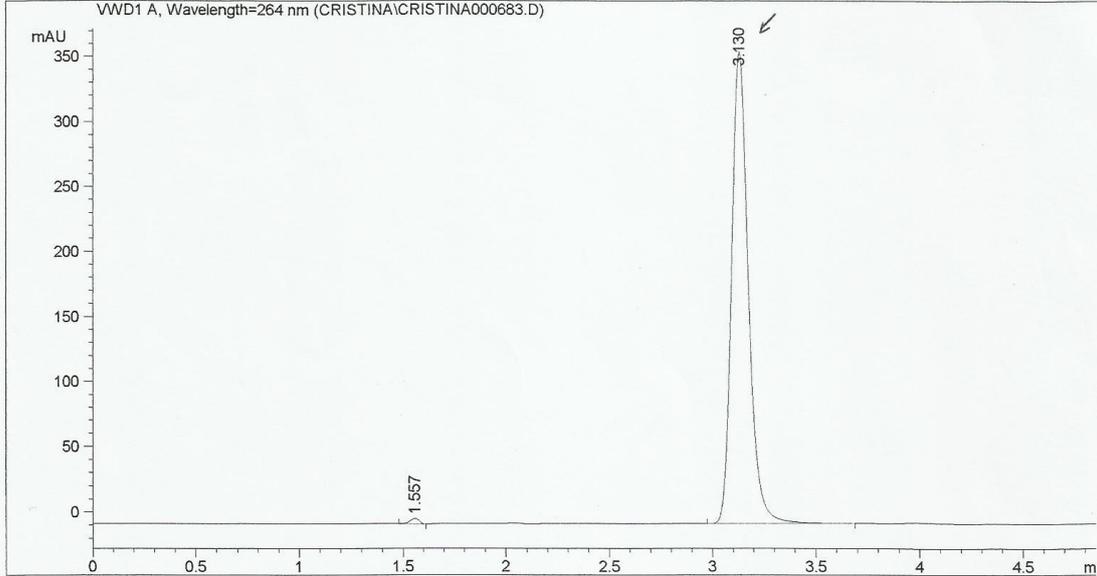
Totals : 2953.14008 487.85720

Data File C:\CHEM32\1\DATA\CRISTINA\CRISTINA000683.D
Sample Name: paracetamol50(nueva)rampa cristina

PARACETAMOL GRADIENTE 2

=====
Acq. Operator : agua ds
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
Injection Date : 12/1/2015 5:46:51 PM
Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CAF2012.M
Last changed : 12/1/2015 5:45:36 PM by agua ds
(modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CAF2012.M
Last changed : 1/14/2016 7:08:19 PM by eliam

CROMATOGRAMA 9



=====
Area Percent Report
=====

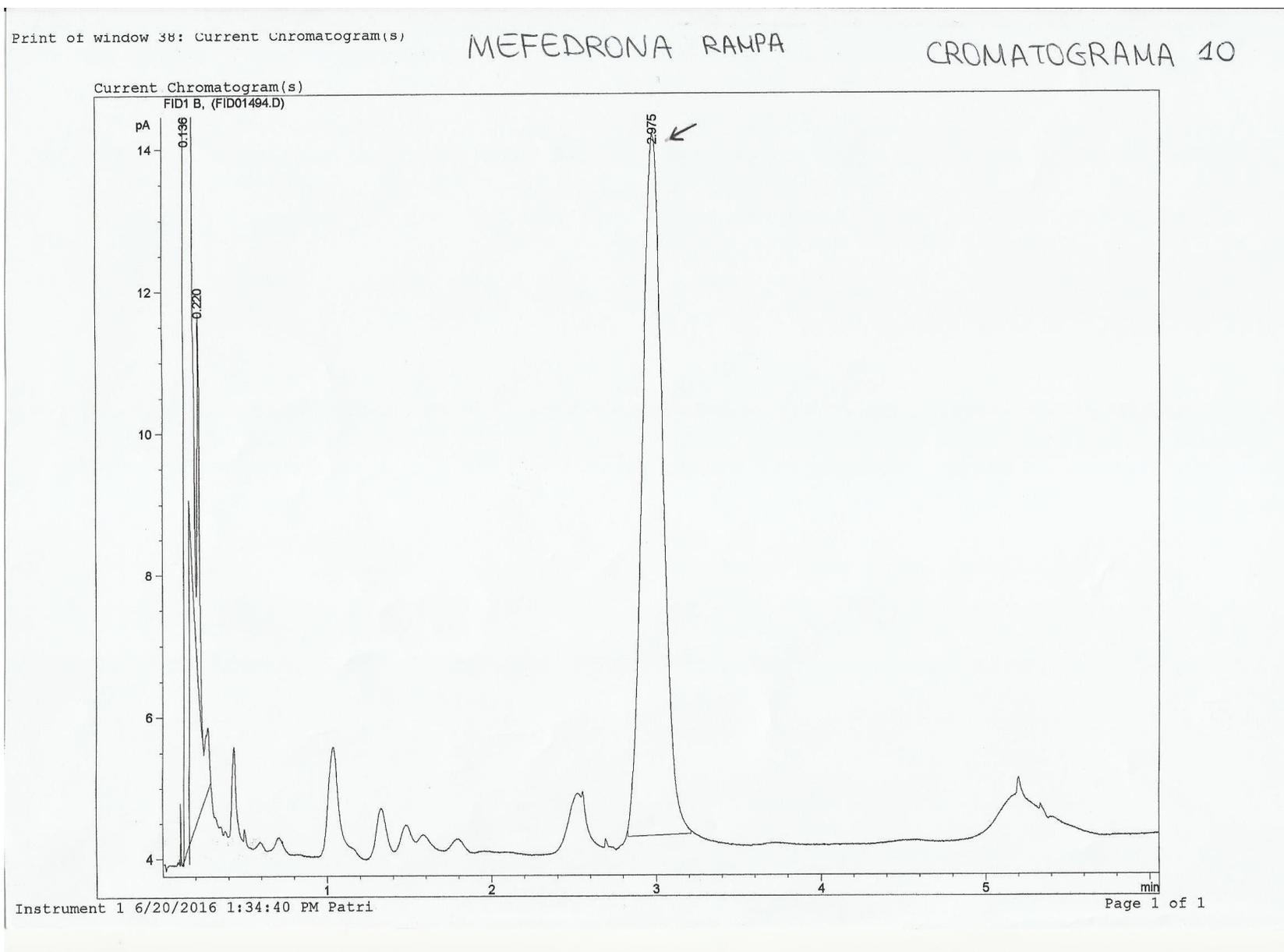
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

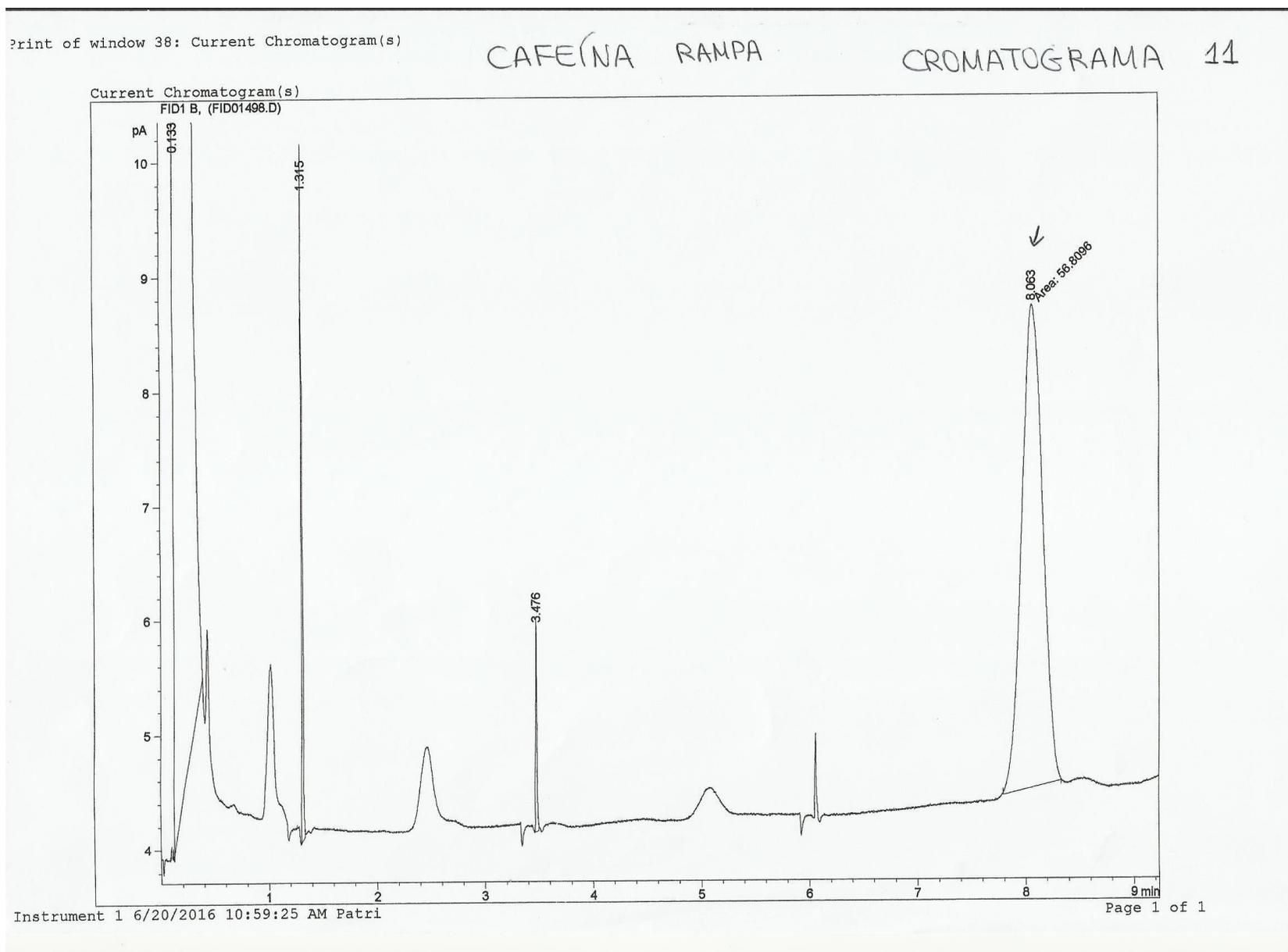
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=264 nm

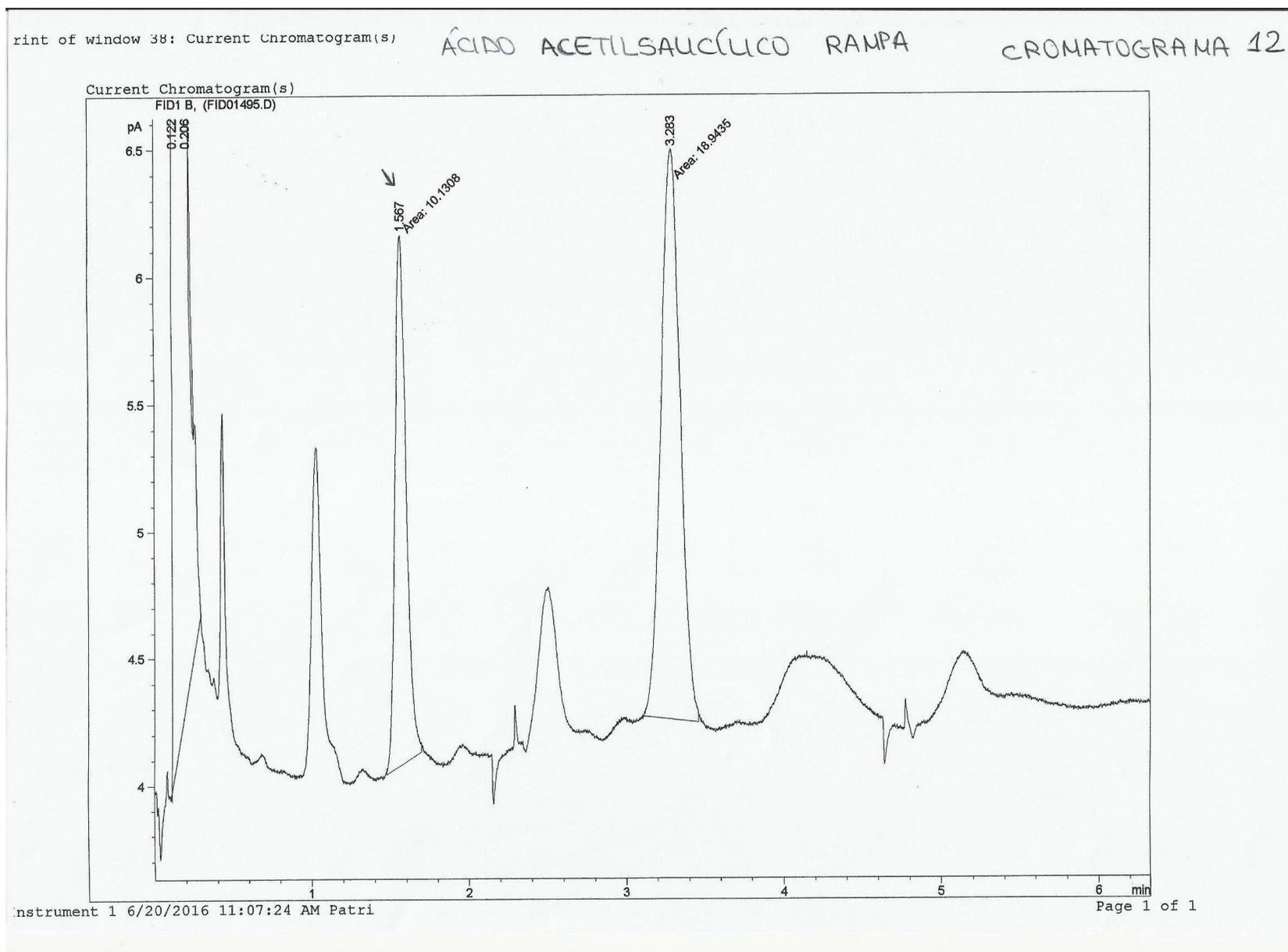
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.557	BV	0.0513	13.98376	4.26699	0.6724
2	3.130	BB	0.0882	2065.63477	363.09076	99.3276

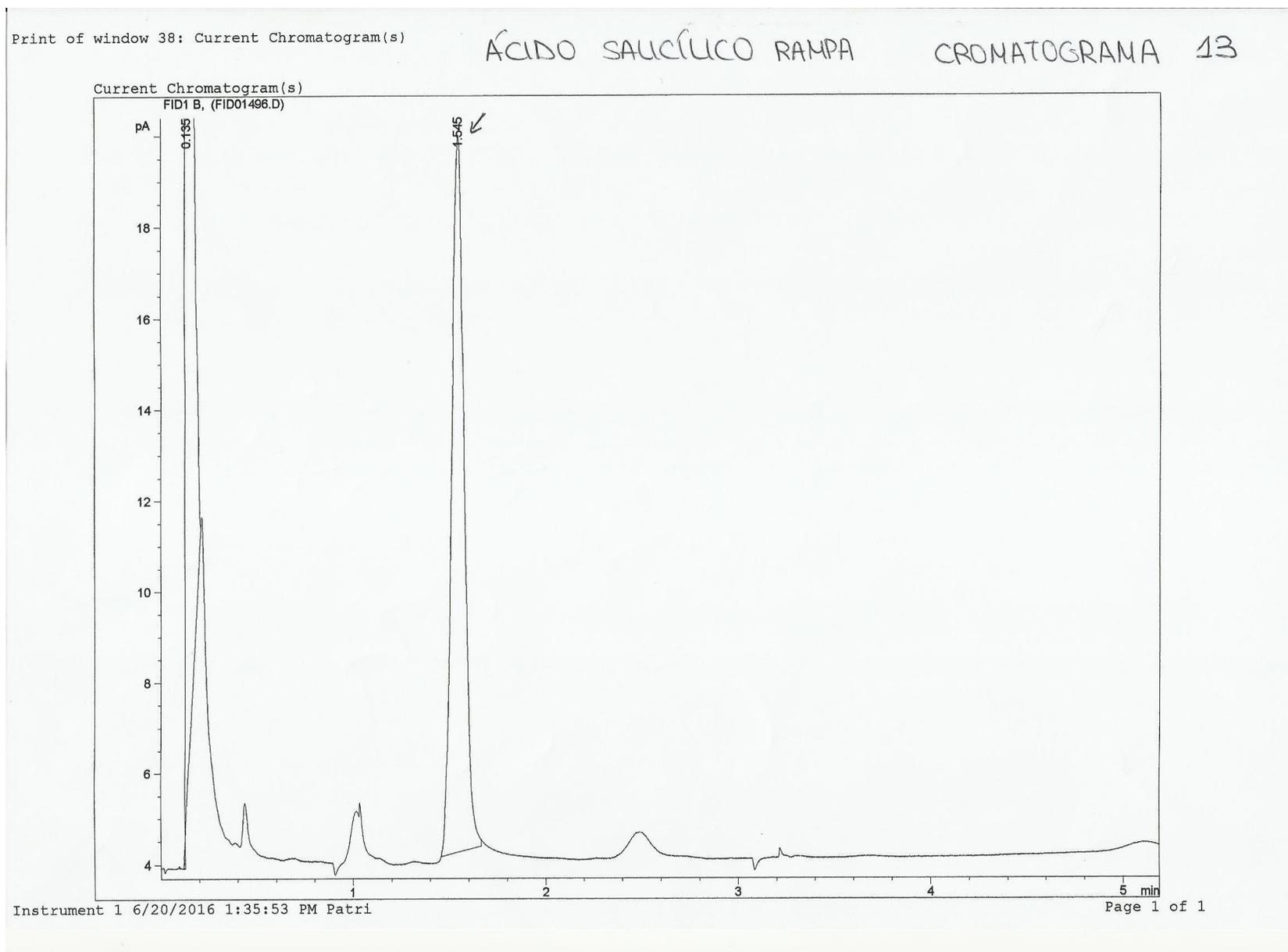
Totals : 2079.61853 367.35775

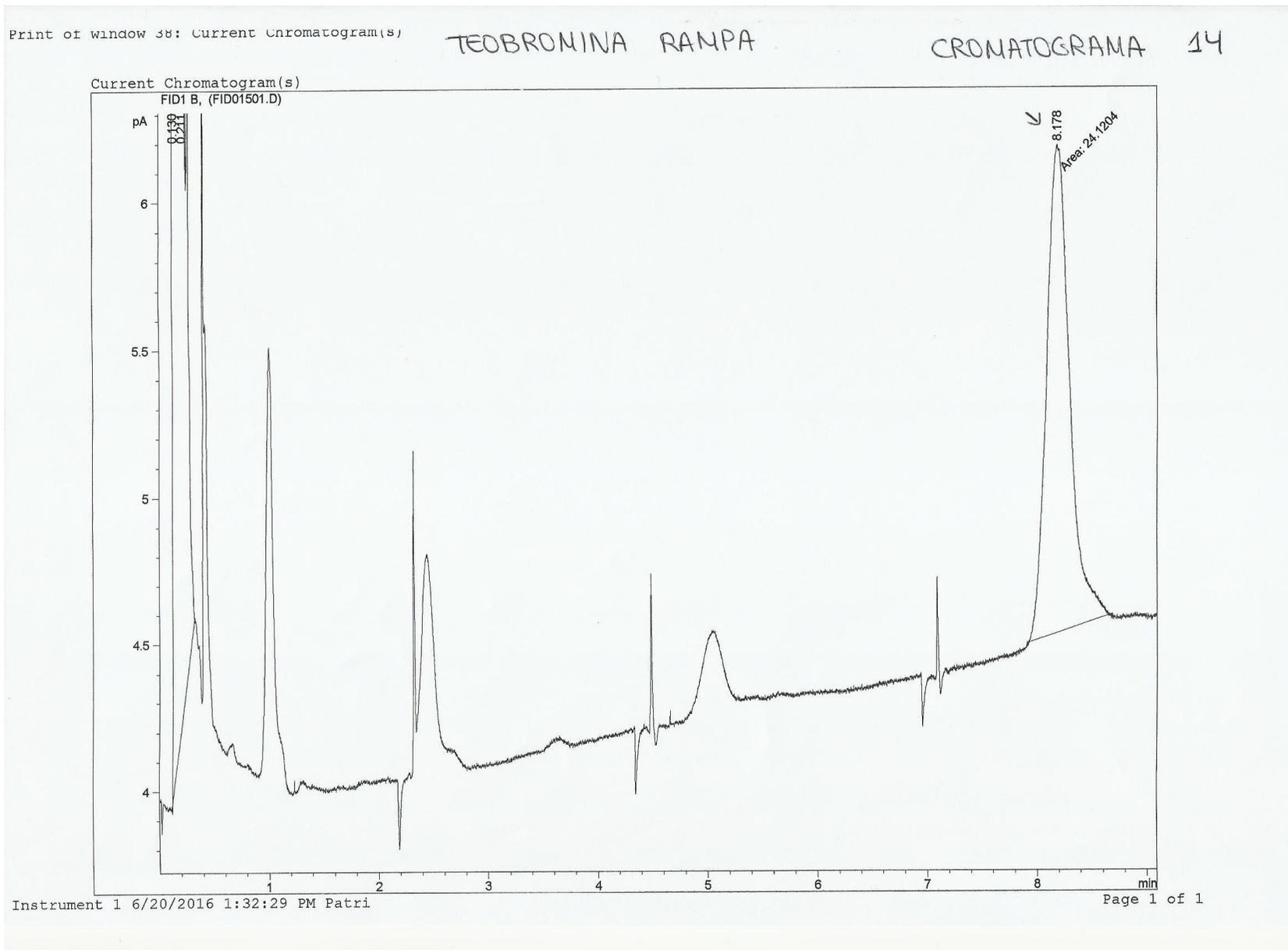
6.2. Cromatografía de gases con detector FID (CG-FID)

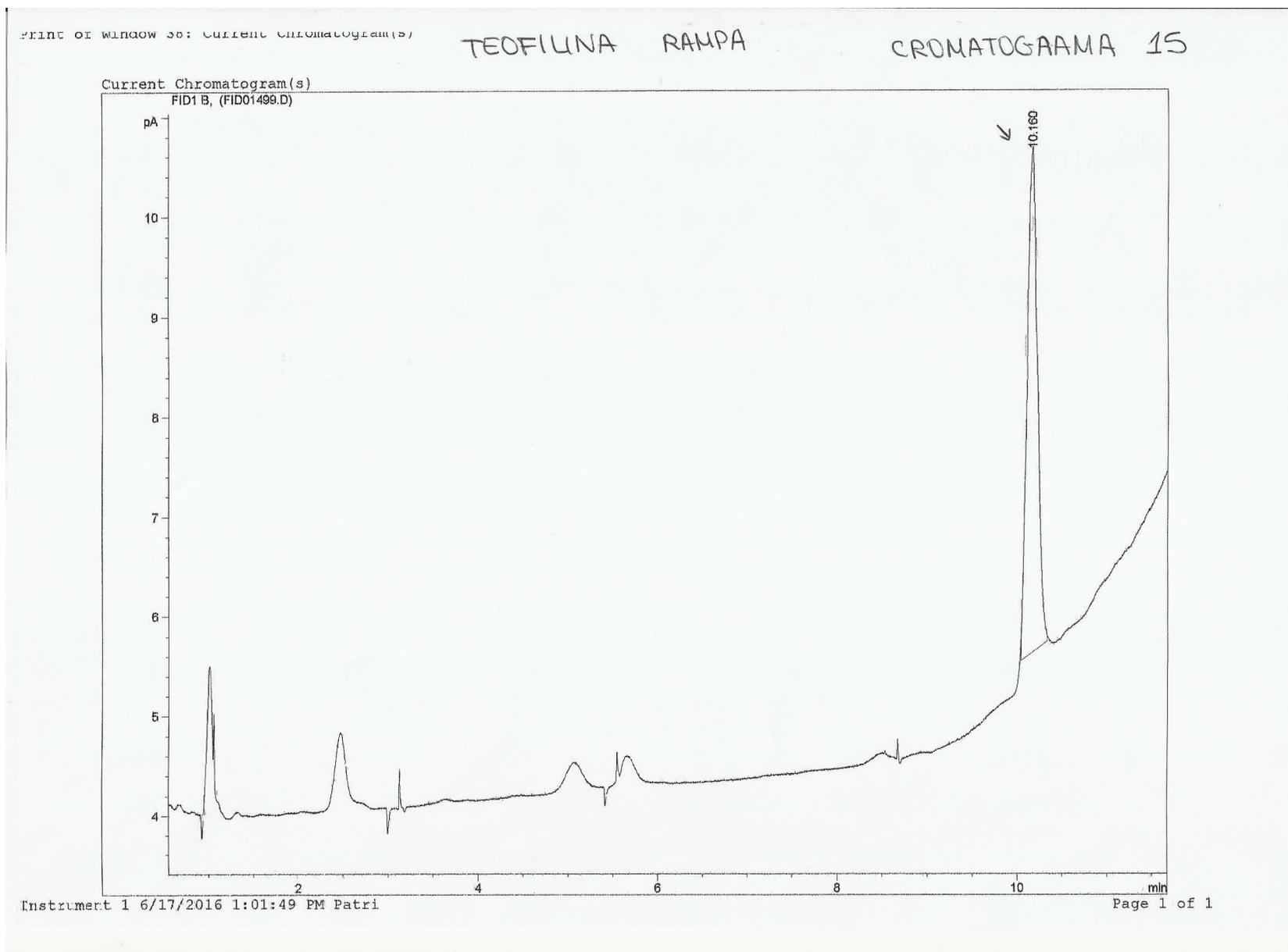


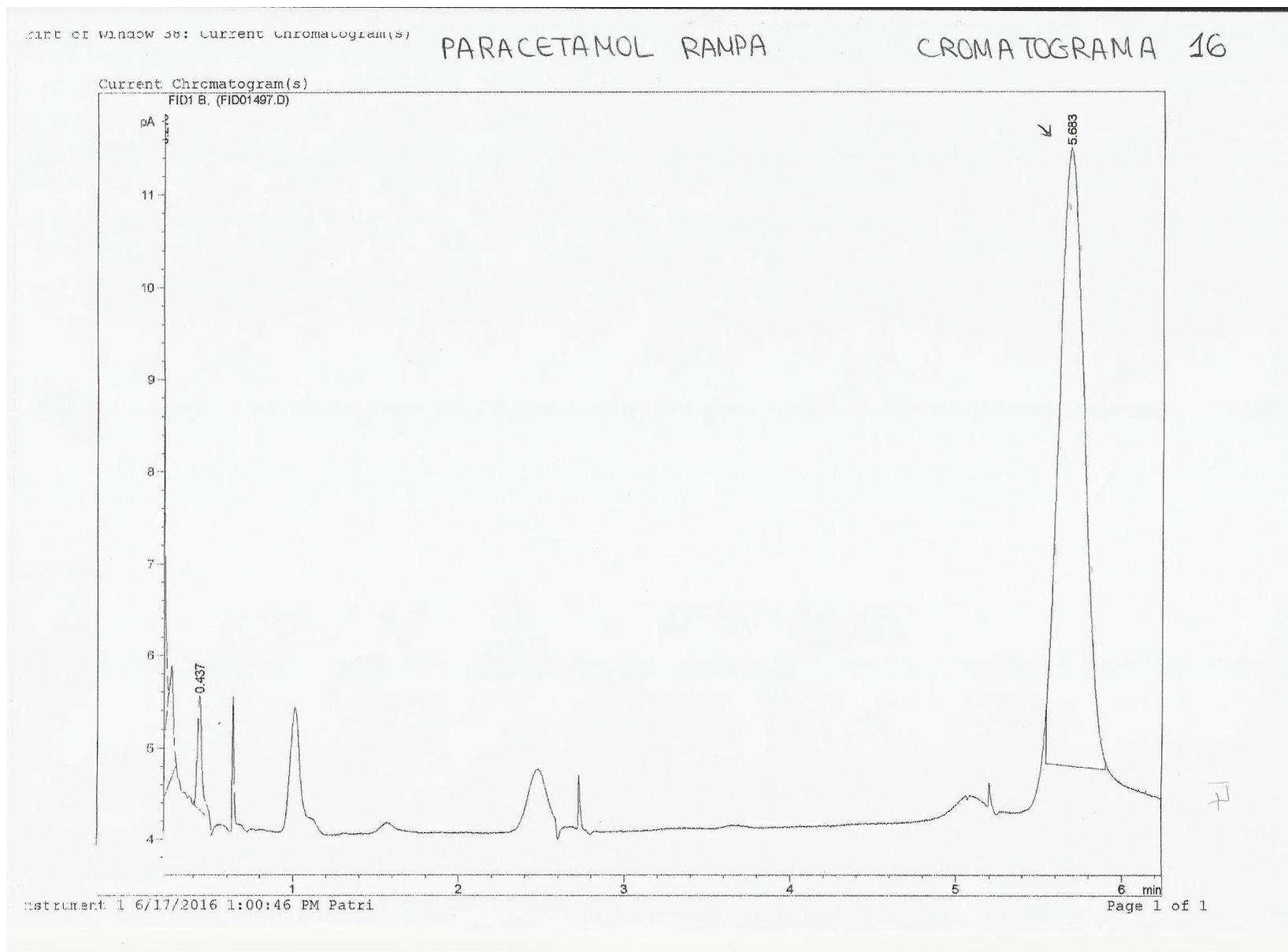




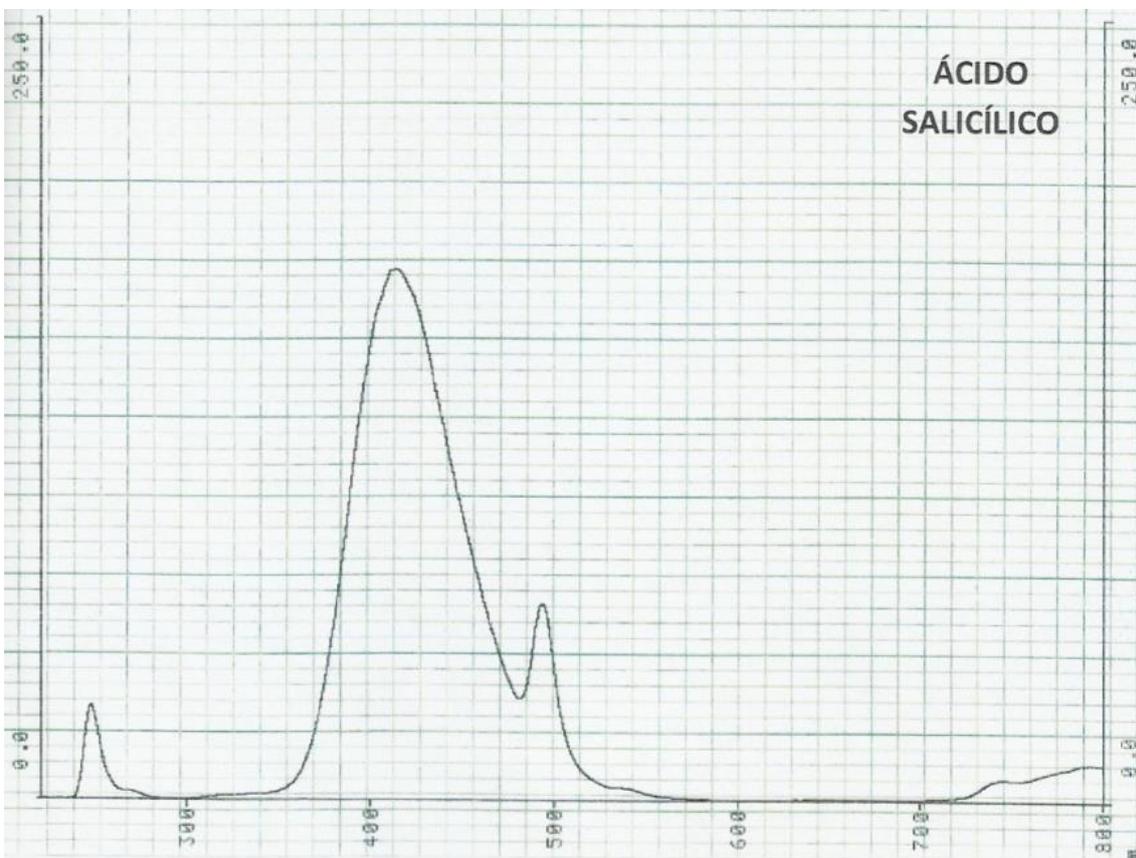
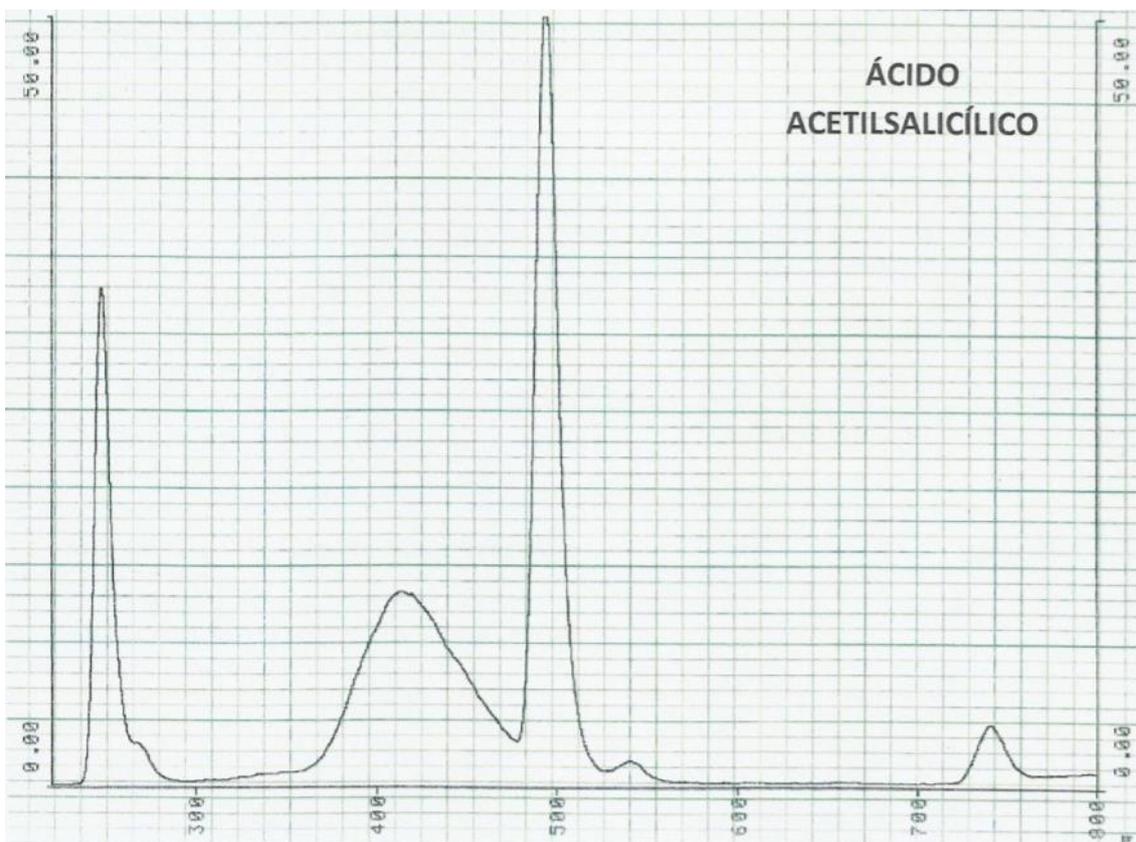








6.3. Espectroscopía de fluorescencia



6.4. Espectroscopía Raman

