

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA
INSTITUTO NACIONAL DE TOXICOLOGÍA Y CIENCIAS FORENSES**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER y PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN**

MODULO DE QUÍMICA ANALÍTICA

MÁSTER EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

***OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO UHPLC PARA
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HEROÍNA EN
MUESTRAS DE ALIJOS DECOMISADOS***

AUTOR: JOSÉ CARLOS RODRÍGUEZ MATAS

DIRECTOR: INÉS CRESPO FERRER (INTCF)

TUTORA: PILAR FERNÁNDEZ HERNANDO (UNED)

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ANALÍTICAS

Junio 2022

AGRADECIMIENTOS

“Aquello que no nos mata nos hace más fuertes”. Friedrich Nietzsche.

“En un mundo podrido y sin ética, a las personas sensibles solo nos queda la estética”. Makinavaja

Y por dónde empezar... este trabajo es el que nunca debió ser y al final fue, es el empeño de mucha gente por que saliera adelante. Es la involucración, el ánimo y el aliento constate de excelentes personas por hacer posible su realización. Es la testarudez y la resiliencia de un gran “equipo”, así os considero a todos, que lo ha hecho posible cuando todo apuntaba en otra dirección.

Gracias Pilar por tu apoyo y consejos, por tu disponibilidad y orientaciones. Nuestro segundo, y espero no el ultimo, proyecto juntos.

Inés, aceptaste la dirección cuando más necesario era, eternamente agradecido.

María, siempre ahí, tu ayuda no tiene precio. Este trabajo no sería el mismo sin ti. Como agradecerlo...

Daniel, esas sesiones “docentes” son impagables...esperemos que la cosa continúe.

Bea... ¿qué te puedo decir? Seguro que sin ti este trabajo no habría salido adelante, has sido la línea maestra que seguir. Tus orientaciones, apoyo, consejos, preocupación constate, tu tiempo aun cuando no lo tenías... no hay forma de que te lo pueda agradecer, simplemente gracias.

Yolanda, Mercedes, Paloma, Laura, Lili... y a todos aquellos que no menciono pues la lista sería interminable, que en mayor a menor grado os implicasteis aunque solo fuera para escucharme en los momentos más difíciles, muchas gracias por vuestra ayuda y apoyo.

Y a todos los que habéis intentado que este barco naufragara...gracias, vuestro empeño por hundirlo ha sido un acicate para reflotarlo y llegar a puerto.

Gracias a todos, los mencionados y los que me haya podido olvidar... Sin vosotros este TFM y su Proyecto de Investigación habrían sido mucho más difíciles de llevar a cabo.

INDICE

GLOSARIO DE TERMINOS/ACRÓNIMOS

- 1. RESUMEN/ ABSTRACT**
- 2. OBJETIVO**
- 3. INTRODUCCIÓN**
- 4. OPIOIDES**
 - 4.1 HEROÍNA.**
 - 4.1.1 ADULTERANTES DE LA HEROÍNA**
 - 4.1.2 EL FENTANILO**
- 5. LOS ALIJOS DECOMISADOS.**
- 6. DETERMINACIÓN DE DROGAS EN ALIJOS**
- 7. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN HEROÍNA Y OTRAS DROGAS EN ALIJOS**
 - 7.1 MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA**
 - 7.2 ANÁLISIS CUALITATIVO. SCREENING**
 - 7.2.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES**
 - 7.3 ANÁLISIS CUANTITATIVO**
 - 7.3.1 CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)**
 - 7.3.2 CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ULTRA-ALTA RESOLUCIÓN (UHPLC/UPLC)**
 - 7.3.3 COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE SEPARACIÓN UPLC VS HPLC**
- 8. PARTE EXPERIMENTAL**
 - 8.1 JUSTIFICACIÓN**
 - 8.2 EQUIPOS Y REACTIVOS**
 - 8.2.1 EQUIPOS**
 - 8.2.2 REACTIVOS Y DISOLVENTES**
 - 8.3 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ACTUAL PARA EL ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE LA HEROÍNA**
 - 8.3.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**
 - 8.3.2 PREPARACION DE LOS PATRONES ESTÁNDAR y CONTROLES DIARIOS**
 - 8.3.3 SCREENING Y CUANTIFICACION**
 - 8.4 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO UPLC**
 - 8.4.1 SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD**
 - 8.4.2 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO UPLC**
 - 8.5 COMPARACIÓN CONDICIONES ÓPTIMAS DE LOS MÉTODOS HPLC vs UPLC**
- 9. CONCLUSIONES**
- 10. BIBLIOGRAFÍA**

GLOSARIO DE TERMINOS/ACRÓNIMOS

CE	Electroforesis capilar
CITCO	Centro de inteligencia contra el terrorismo y el crimen organizado
CG	Cromatografía de gases
DAD	Detecto diodo array
DXM	Dextrometorfano
ECD	Detector de captura de electrones
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
EMIT	Inmunoensayo enzimático multiplicado
ENAC	Entidad Nacional de Acreditación
FID	Detector de ionización en llama
FM	Fase Móvil
FT-MS	Analizadores de masas con transformada de Fourier
FTP	Parches transdérmicos
HPLC	Cromatografía Líquida de alta presión
HRD	Hoja de recogida de datos
ICR-MS	Espectrómetros de masa de resonancia ion-ciclotrónica
INTCF	Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses
IT	Trampas iónicas
JIFE	Junta internacional de Fiscalización de Estupefacientes
LIF	Detección por fluorescencia inducida por láser
LC	Cromatografía Líquida
LPAD	Detector de fotodiodos lineal
6-MAM	6- Monoacetilmorfina
MDMA	3,4-metilendioxi-N-metilanfetamina
MeOH	Metanol
MSD	Detector selectivo de masas
NPD	Detector de nitrógeno y fósforo
NSP	Nueva sustancia psicoactiva
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDA-UV	Detección ultravioleta de matriz de fotodiodos
PNT's	Procedimientos Normalizados de Trabajo
RAE	Real Academia Española de la Lengua
RIA	Radioinmunoensayo
SNC	Sistema Nervioso Central
SPE	Extracción en fase sólida
TLC	Cromatografía líquida en capa fina
TOF	Tiempo de vuelo
UPLC	Cromatografía Líquida de ultra alta presión
UV	Ultravioleta

1. RESUMEN/ABSTRACT

En los últimos años la demanda de análisis a los laboratorios de Toxicología forense por parte de la Administración de Justicia y de los centros de drogodependencia se ha incrementado notablemente, presentándose un escenario de necesidad constante de optimización, tanto de las técnicas de preparación de muestras, como las técnicas de determinación de las distintas drogas de abuso de tráfico ilícito. El objetivo es reducir tiempo, cantidad de muestra así como el coste del análisis, sin reducir la sensibilidad ni reproducibilidad del método analítico.

Las matrices en los alijos decomisados generalmente son muy simples, la propia droga en polvo, presada, líquida..., que no requiere más que una preparación de una disolución, con la cantidad debidamente tasada de sustancia, presuntamente fiscalizada, en el disolvente adecuado para la técnica de análisis. En raras ocasiones se reciben muestras incluidas en matrices complejas, tales como cauchos, gomas, alimentos...que hicieran necesario un complejo tratamiento de extracción del analito de la matriz.

Los métodos de rutina usados en el INTCF para el análisis de las sustancias estupefacientes, basados en técnicas de cromatografía, son lo suficientemente sensibles como para detectar concentraciones de analitos del orden de ng e incluso pg.

En este trabajo Fin de Master y su correspondiente proyecto de investigación se ha realizado la optimización del método de cuantificación de Heroína proveniente de alijos decomisados. Se ha reducido de manera considerable el tiempo de análisis, obteniendo una reducción de costes, y un uso racional de recursos materiales y humanos, que permite, además, la realización de un mayor número de análisis en el mismo tiempo que el método de partida, si fuera necesario.

The demand for analysis in forensic toxicology laboratories by the Justice Administration and drug addiction centres has increased significantly in recent years. Under this framework, an optimisation of both sample preparation techniques and techniques for determining the different illicitly trafficked drugs of abuse emerges as constant need. The aim is to reduce time, sample quantity and the cost of analysis, maintaining the sensitivity and reproducibility of the analytical method.

The matrices in the seized shipments are generally very simple, the drug itself in powder, pressed, liquid, etc., which only requires the preparation of a solution, with a duly calculated quantity of the substance, presumably controlled, in the appropriate solvent for the analysis technique. Rarely, we receive samples included in complex matrices, such as rubbers, rubber, foodstuffs, etc., which would require a complex extraction treatment of the analyte from the matrix.

Routine methods used for the analysis of narcotic substances at the INTCF, based on chromatographic techniques, are sufficiently sensitive to detect analyte concentrations in the order of *ng* or even *pg*.

In this Master's Thesis and its corresponding research project, the method for the quantification of Heroin from confiscated caches has been optimised. The analysis time has been considerably reduced, obtaining a reduction in costs and a rational use of material and human resources. This also allows, if necessary, to carry out simultaneously a greater number of analyses in the same time interval as the initial method.

2. OBJETIVO

En el presente trabajo se lleva a cabo un estudio sobre una de las sustancias psicoactivas más peligrosas y adictivas, la heroína. Su análisis y cuantificación es de suma importancia en los laboratorios forenses por su implicación en diferentes actividades delictivas, lo que conlleva generalmente a su judicialización. Por ello es necesario disponer de un método de análisis que permita por un lado identificar, aparte de la heroína, sus adulterantes y cuantificarlos, para poder conocer el grado de pureza de la misma.

3. INTRODUCCIÓN

El consumo de sustancias psicoactivas se encuentra ligado a la historia del ser humano, cada cultura y cada sociedad han desarrollado e integrado en su seno el consumo de sustancias tóxicas o potencialmente tóxicas, con fines no terapéuticos (mágico-religiosos, religiosos, recreativos, etc.). No obstante, ha sido desde los años 70's del siglo pasado, por la confluencia de una serie de factores (culturales, económicos, medios de comunicación, etc.), cuando el problema del consumo abusivo de sustancias tóxicas ha alcanzado una gran extensión e importancia. Los avances técnicos en este siglo han dado lugar a una manipulación cada vez mayor de dichas sustancias dando lugar a compuestos psicoactivos cada vez más potentes y de mayor pureza, propiciándose, dado el gran beneficio que

genera su comercio tanto legal como ilícito, la aparición de grandes carteles de productores-trafficantes de dichas sustancias.

Actualmente los problemas de salud relacionados con el consumo de drogas constituyen un motivo de consulta frecuente en la práctica clínica llegando a convertirse en un grave problema de salud pública. Aunque epidemiológicamente las conductas adictivas legales tienen mayor relevancia, por su frecuencia y extensión, las ilegales suelen presentar una mayor repercusión social, sanitaria y jurídico-penal.

Cabe destacar que la OMS (1969) define droga como *“toda sustancia que introducida en un organismo vivo por cualquier vía, puede modificar una o varias de sus funciones y es susceptible de crear dependencia y tolerancia”*. Igualmente, la OMS (1982) define droga de abuso como *“aquella de uso no médico con efectos psicoactivos (capaz de producir cambios en la percepción, el estado de ánimo, la conciencia y el comportamiento), y susceptible de ser autoadministrada”*.

Bajo el nombre genérico de drogas de abuso se pueden incluir una larguísima lista de sustancias químicas de diverso origen (natural, semisintético, artificial), que irá desde las más conocidas: alcohol, opiáceos, tabaco y cocaína, hasta todos los psicofármacos que pueden ser susceptibles de consumo con fines no terapéuticos.

La forma de clasificar las drogas de abuso puede hacerse de diversas maneras, según sus efectos sobre el organismo, sus mecanismos de acción, su estructura química...

No sería del todo correcto hacer una clasificación exclusivamente atendiendo a su estructura química dado que podemos encontrar efectos semejantes en sustancias muy diferentes desde el punto de vista de la estructura química, así, la metanfetamina que tiene una estructura similar a la del neurotransmisor dopamina (sustancia del cerebro que cumple una función importante en el refuerzo de conductas placenteras), y la cocaína con estructura muy diferente a la anterior, producen efectos fisiológicos y conductuales similares, debido a algunas diferencias marcadas en sus mecanismos básicos de acción.¹

Por ello podemos clasificarlas en función de sus efectos, así según el efecto psicopatológico producido por el consumo de la sustancia sobre el sistema nervioso central las drogas se clasifican, tal como se indica en la tabla 1, en:

- Depresoras (psicolépticos): inhiben la actividad nerviosa disminuyendo el ritmo de las funciones corporales, siendo especialmente característico su efecto sobre la memoria,

dando lugar a las alteraciones conocidas popularmente como “lagunas”, que corresponden a una amnesia anterógrada, se produce una pérdida de memoria después del consumo de la sustancia.

- Estimulantes (psicoanalépticos): en este caso el efecto es el contrario a las anteriores, aumentan la actividad nerviosa y por lo tanto todas las funciones corporales.
- Alucinógenos (psicodislépticos): este tipo de sustancias alteran el funcionamiento cerebral, dando lugar a distorsiones perceptivas o alucinaciones, caracterizadas por percepciones carentes de objeto.

Tabla 1: Clasificación general de drogas de abuso en función del efecto que producen en el Sistema Nervioso Central.

DROGAS DEPRESORAS DEL SNC	DROGAS ESTIMULANTES DEL SNC	DROGAS ALUCINÓGENAS
<ul style="list-style-type: none">• Alcohol• Opiáceos (opio, morfina, heroína, codeína, metadona)• Psicofármacos (barbitúricos, benzodiacepinas)	<p>Estimulantes mayores:</p> <ul style="list-style-type: none">• Cocaína• Anfetaminas y derivados <p>Estimulantes menores:</p> <ul style="list-style-type: none">• Nicotina• Xantinas (cafeína)	<ul style="list-style-type: none">• Mescalina (peyote)• Cannabis (hachís, marihuana)• Hongos alucinógenos (psilocibina)• Dietilamida del ácido lisérgico (LSD)• Inhalantes (acetonas, bencenos)• Alucinógenos sintéticos diversos (DMT, DET, DPT, STP)

El aumento que se ha producido en los últimos años en las peticiones de análisis a los laboratorios forenses ha hecho necesario la implementación de nuevas técnicas de preparación y determinación de sustancias de abuso, y la optimización de las ya existentes.

En esta memoria se van a describir como se llevan a cabo las determinaciones analíticas de drogas de abuso, en concreto la heroína, en drogas de alijos decomisados. Además, en la parte experimental se describirá la optimización llevada a cabo de un método para la determinación de heroína por UPLC.

En el presente documento las muestras a considerar son los alijos de drogas de abuso decomisadas por las Fuerzas y Cuerpos de Seguridad del Estado, por lo que se realiza a continuación una descripción más detallada de este tipo de muestras.

4. OPIOIDES

El opio es el jugo extraído de las cápsulas de la planta adormidera (*Papaver somniferum*) o amapola (figura 1). Se obtiene por una incisión poco profunda en la cápsula tras lo que aparece el mencionado jugo también llamado látex, de consistencia blanda y pegajosa. De cada cápsula de adormidera pueden recogerse de 10 a 100 mg de opio.



Figura 1: Imagen de la planta adormidera (*Papaver somniferum*) o amapola

Puede consumirse por vía oral, en general masticado, o menos frecuentemente fumado. El opio que es preparado, en general de consistencia más dura, sufre un proceso de extracción de agua y es fumado.

El opio contiene entre un 10 y un 20% de alcaloides, 5-6% de minerales, de azúcares y además, ácidos orgánicos. Los alcaloides presentes en el opio se denominan opiáceos. De ellos los más importantes son: morfina, papaverina, codeína, noscapina y tebaína. Sus efectos farmacológicos más característicos son inducir sueño, reducir la velocidad del tránsito intestinal, aliviar el dolor y reducir la tos. Por extensión, se denominan también así los productos químicos derivados de la morfina. Un ejemplo de ello es la heroína (diamorfina o diacetilmorfina), opiáceo semi-sintético derivado de la morfina.

En cambio, el término opioide se emplea para denominar tanto a los compuestos naturales o sintéticos, endógenos o exógenos, agonistas o antagonistas, que se unen a los receptores opioides. Existe una gran variedad de opioides de síntesis, que actualmente se comercializan en el mercado ilícito, algunos de estos extremadamente potentes ocasionando cuadros de sobredosis con una elevada mortalidad. Todos los opiáceos son opioides, pero no todos los opioides son opiáceos.²

Los opioides por tanto se pueden clasificar en función de su origen en naturales, sintéticos y semisintéticos tal como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Clasificación de los opioides según su origen

Tipos de Opioides	Ejemplos
Naturales (opiáceos)	Codeína, morfina..
Semisintéticos (obtenidos a partir de opiáceos)	Heroína, hidromorfona, oxycodona..
Sintéticos	Fentanilo, metadona, tramadol..
Endógenos (producidos por el organismo de forma natural)	Endorfinas, encefalinas...

A continuación se muestran en la figuras 2, 3 y 4 las estructuras de algunos opiáceos, opioides semisintéticos y opioides sintéticos.

Cabe indicar que en muchas ocasiones los términos opiáceos y opioides se usan de forma intercambiable.

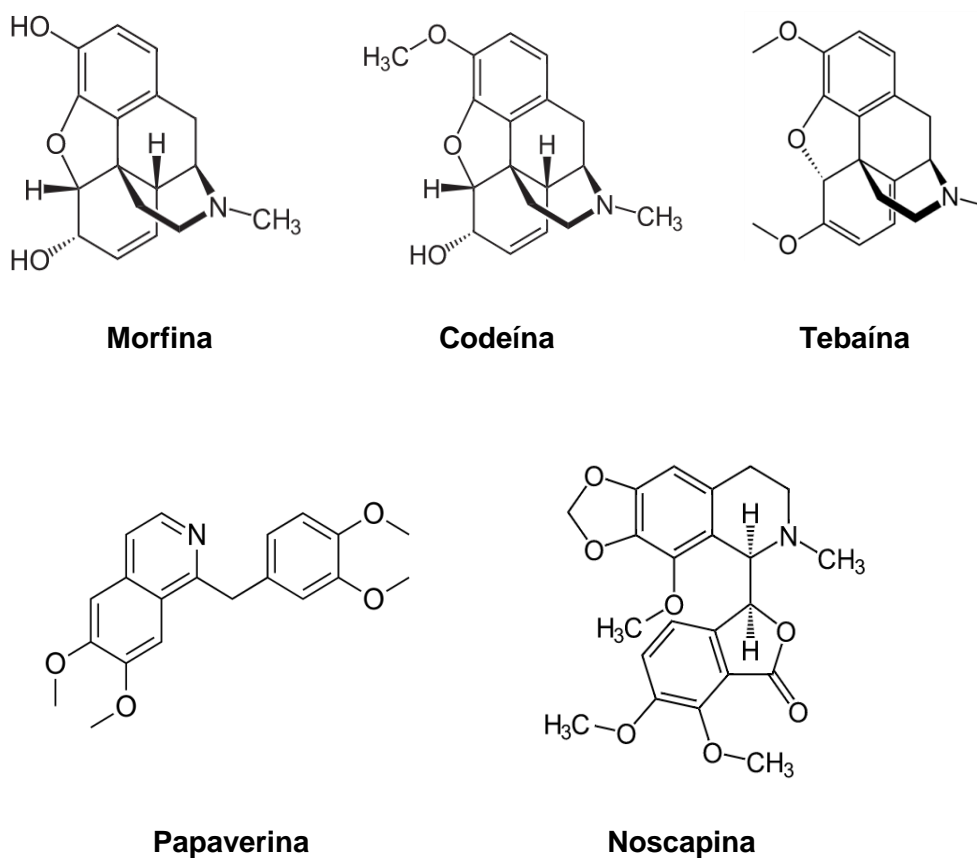
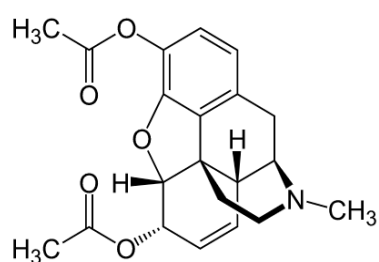
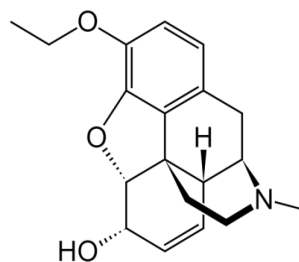


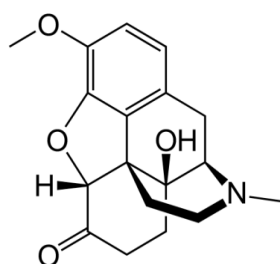
Figura 2: estructuras químicas de algunos opiáceos (opioides naturales)



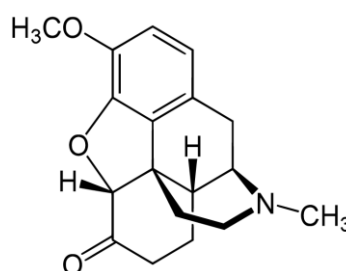
Heroína



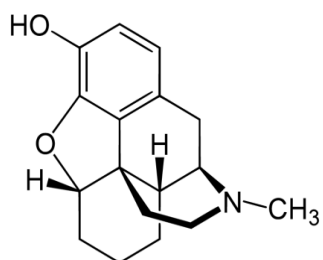
Etilmorfina



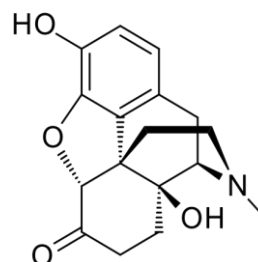
Oxicodona



Hidrocodona

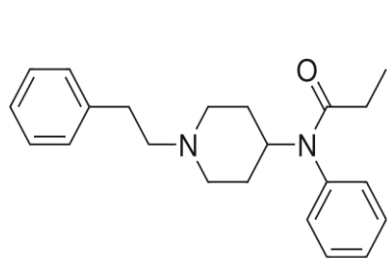


Desomorfina

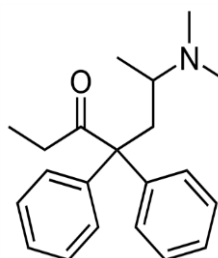


Oximorfona

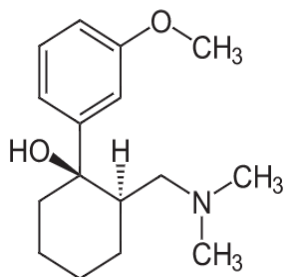
Figura 3: estructuras químicas de opioides semisintéticos



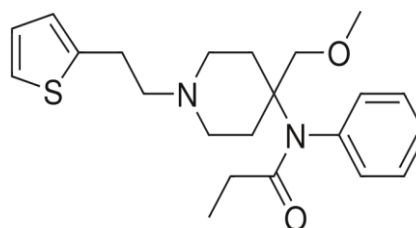
Fentanilo



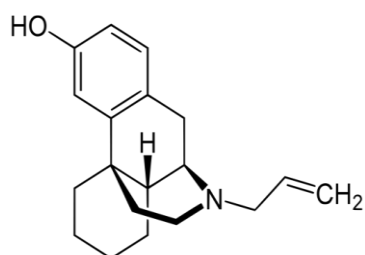
Metadona



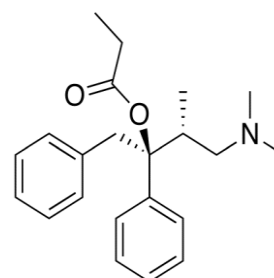
Tramadol



Sufentanil



Levalorfan



Dextropropoxifeno

Figura 4: estructuras químicas Imagen de opiodes sintéticos

4.1 HEROÍNA

Características y síntesis

La diacetilmorfina, más conocida como heroína, es una modificación semisintética a partir de morfina, pero es considerada un opiáceo. Generalmente, la heroína se presenta en forma de un polvo cristalino blanco o café, inodoro y muy fino, pero su aspecto puede variar dependiendo de los procesos de purificación a los que se haya sometido. La figura 5

muestra la estructura química de la heroína. Los nombres más comunes en castellano son “caballo”, “pasta”, “H”, “jaco”, “lenguazo”, “junk” y “goma”. En inglés es conocida como “smack”, “H”, “skag”, “junk”, “black tar”, “horse”, “shit” y “brown”.

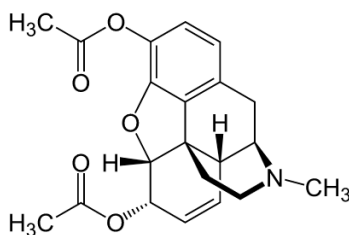


Figura 5: Estructura química de la Heroína

La heroína puede sintetizarse (figura 6) desde la morfina clorhidrato o desde la morfina base. En el caso de utilizar la primera, se le añade anhídrido acético y se calienta. Tras diferentes pasos y filtrados se obtiene la heroína base. Después, puede transformarse en diferentes preparados según su futura utilización.

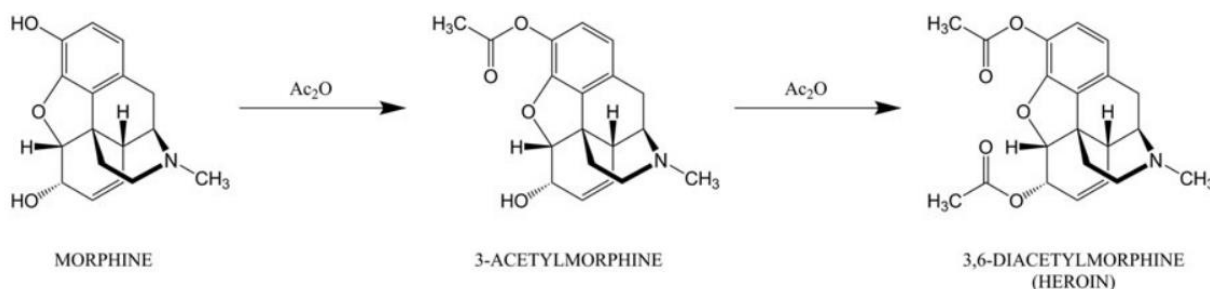


Figura: 6 Proceso de síntesis de heroína a partir de morfina

La heroína se vende mezclada (cortada) con lactosa, glucosa o almidón. Muchas veces se adultera con fármacos como la cafeína, paracetamol, estricnina, quinina, procaína o piracetam. La vía de administración más frecuente de la heroína es la fumada (en pipa, cigarrillo) y la inhalada intrapulmonar (chasing the dragon o chino), después es la intranasal y menos, la intravenosa. Para su uso intravenoso se disuelve el polvo en un poco de agua y se añaden unas gotas de limón o vinagre para aumentar su solubilidad, se calienta en una cucharilla y, se carga en la jeringa a través de un filtro de un cigarrillo o algodón. La combinación de heroína y cocaína o anfetamina administradas por vía intravenosa se denomina speedball.³

La heroína es, aproximadamente, dos veces más potente que la morfina, a igual dosis. Es un potente analgésico y antitusígeno que surgió como medio para curar la dependencia de la morfina, aunque hace ya tiempo que sabemos que no es así. También se utilizó, con

éxito, en los estadios avanzados de las tuberculosis pulmonares, a modo de “remedio heroico. La heroína es altamente adictiva.

Tipos y formas de presentarse la heroína

En base al grado de pureza y origen, la heroína se puede clasificar en varios tipos:

Heroína nº 2: Heroína base o Tsao-ta, procedente del sudeste asiático y fácilmente obtenible. Es de color blanco u oscuro y se usa para inyección o fumada. La heroína base puede sintetizarse desde la morfina clorhidrato o desde la morfina base, tal como se ha indicado, tras mezclarla con anhídrido acético y calentar. Puede, entonces, transformarse en diferentes preparados según su futura utilización. Entre ellos, la heroína para fumar (heroína número 3 ó heroína marrón) y para inyectar (heroína número 4, heroína clorhidrato ó heroína blanca).

Heroína nº 3: Brown Sugar o heroína marrón (figura 7-A). Es la heroína que se emplea para fumar. Aparece mezclada con otras sustancias como cafeína, estricnina, azúcares, etc. Su contenido en heroína oscila entre un 25 y un 50%. La heroína marrón es menos soluble que la blanca, razón por la que se fuma.

Heroína nº 4: Heroína clorhidrato o heroína blanca (figura 7-B). También conocida popularmente como Tailandesa. Su uso es principalmente intravenoso. Tiene el porcentaje más elevado en principio activo, superando muchas veces el 90% de riqueza en origen.

Heroína negra: Conocida en la calle como “goma” o “alquitrán negro” (“black tar heroin”) figura 7-C). De aspecto similar a la brea de color oscuro, es una sustancia negra pegajosa de procedencia americana, con una riqueza del 20%. Se utiliza para inyección.



Heroína marrón

Heroína blanca

Heroína negra

Figura 7: Aspecto de distintos tipos de heroína: A- Heroína Marrón, B- Heroína Blanca y C-Heroína Negra.

Metabolismo de la heroína

La heroína (diacetilmorfina, diamorfina) se transforma mediante desacetilación por esterasas plasmáticas y la carboxilesterasa hepática en 6-monoacetilmorfina (6-MAM) y después en morfina (Figura 8).

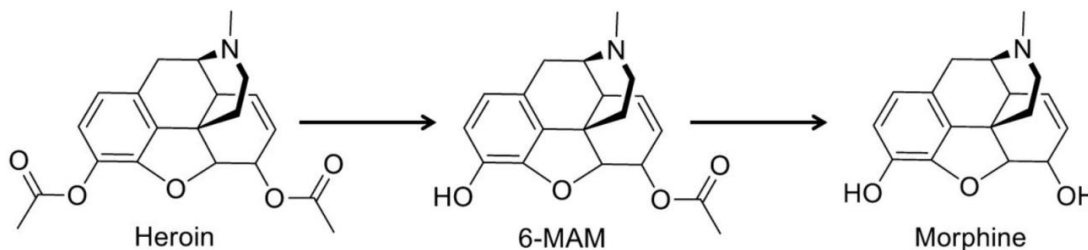


Figura 8: Metabolismo de la heroína

Parece ser que los efectos de la heroína se deben a la 6-MAM y la morfina. La heroína y la 6-MAM tienen una mayor liposolubilidad que la morfina, por lo que si se administra la heroína por vía parenteral puede llegar antes al cerebro y alcanzar allí mayores concentraciones de morfina. Las semividas de eliminación de la heroína y de la 6-MAM son de 3-5 min. y 3-12 min., respectivamente. Cuando la heroína se administra por vía intravenosa las concentraciones máximas de heroína, 6-MAM y morfina se observan a los 1 min., 1 min. y 1-5 min., respectivamente. Si la heroína se administra por vía fumada las concentraciones máximas de heroína, 6-MAM y morfina se observan a los 1-2 min., 2 min. y 1-7 min., respectivamente. Cuando la heroína se administra por vía intranasal, las concentraciones máximas de heroína, 6-MAM y morfina se observan a los 5 min., 5 min. y 12 min., respectivamente. En caso de administrar la heroína por vía oral, no se detectan concentraciones plasmáticas de heroína ni de 6-MAM, y sólo se observan niveles de morfina y sus metabolitos. La biodisponibilidad de la heroína, medida por las concentraciones de morfina, es del 80% por vía intranasal, cuando es fumada del 89%, en caso de inhalación de un chino (chasing the dragon) del 45%, y por vía oral del 20-50%. La heroína ilegal contiene residuos de otros opiáceos, entre ellos la acetilcodeína, que no se encuentran en el caso de la heroína de calidad farmacéutica (la que se emplea en terapéutica) La presencia de acetilcodeína en orina permite diferenciar el consumo de heroína legal de la ilegal.⁴⁻⁷

En muchas ocasiones, la heroína se adultera con fármacos como la cafeína, paracetamol, dextrometorfano, estricnina, quinina, procaína o piracetam, o con otras sustancias tales como leche en polvo.

4.1.1 ADULTERANTES DE LA HEROÍNA

Entre las amenazas y problemas emergentes en relación al consumo y tráfico de drogas, se encuentran los procesos de adulteración de las drogas clásicas y de una variedad de sustancias químicas englobadas en el término de Nuevas Sustancias Psicoactivas (NSP).

Diversos países han avanzado en procesos de caracterización química de las drogas, lo que ha permitido identificar numerosos adulterantes. Desde inicios de este siglo la puesta en funcionamiento de sistemas de alerta temprana en diferentes regiones así como el desarrollo de nuevas técnicas de laboratorio ha permitido el análisis de NSP y de su composición química. Sin embargo resulta necesario avanzar en el conocimiento sobre efectos de los adulterantes en la salud de los consumidores de drogas y de su implicación en la morbilidad y mortalidad por consumo de drogas.

Entre los usuarios de drogas, la pureza es sinónimo de calidad. Sin embargo los usuarios consumen drogas que generalmente no contienen exclusivamente el o los principios activos por el cual se consumen. El grado de pureza y por lo tanto la composición de una droga ilícita varía de acuerdo al lugar donde se obtiene, de una semana a otra, e incluso de un día a otro. Pueden encontrarse numerosas sustancias diferentes a la droga psicoactiva, a través de diferentes mecanismos. Dichas sustancias comúnmente son llamadas adulterantes. En sentido estricto, la palabra adulterante hace referencia a sustancias farmacológicamente activas con propiedades similares a la droga, que son agregadas para compensar la potencia perdida en la dilución.

Los adulterantes se incorporan a las drogas de abuso ilícitas con el objetivo de incrementar su acción, minimizar efectos indeseables o aumentar la cantidad de producto.^{8,9}

Algunos autores clasifican a los adulterantes en: *cortes inactivos* para referirse a los diluyentes y *cortes activos* para referirse a los adulterantes propiamente dichos. La mayoría de los diluyentes carecen de toxicidad aguda, si bien pueden estar involucrados en la patogénesis de algunas enfermedades relacionadas al consumo crónico.¹⁰

Los efectos de las drogas dependen de las propias sustancias consumidas y de las vías de consumo utilizadas, así como del individuo y su entorno. Desde el punto de vista toxicológico la complejidad subyace en que los efectos buscados y aquellos no deseados no solo dependen de un principio activo, sino de una mezcla o variedad de sustancias que pueden incidir en el trastorno adictivo así como en agravar la toxicidad aguda y crónica del compuesto original.

El tipo de adulterante de heroína es un factor que incide en la probabilidad de desarrollar complicaciones, que en algunos casos pueden ser letales. Un estudio realizado en la ciudad de Viena, Austria, mediante el análisis de 415 muestras de heroína incautadas en 1999, reveló una pureza que oscilaba entre 0 y 47 %, con diluyentes como lactosa y predominancia de cafeína y paracetamol como adulterantes.

Entre los principales compuestos que pueden utilizarse como adulterantes de la heroína destacan la cafeína, paracetamol y dextrometorfano, cuyos efectos al mezclarse con la heroína se describen a continuación.¹¹

Cafeína

La cafeína es un alcaloide de la familia metilxantina, cuyos metabolitos incluye los compuestos teofilina y teobromina, con estructura química similar y efectos similares (aunque de menor intensidad). Su estructura química se muestra en la figura 9.

La cafeína es el compuesto psicoactivo más consumido a nivel mundial. A dosis bajas no tóxicas en el ser humano, potencia la atención, el estado de alerta y la vigilia; mientras que a dosis más altas provoca ansiedad, nerviosismo, insomnio, palpitaciones, irritación gástrica o incluso convulsiones si se ingieren dosis tóxicas.

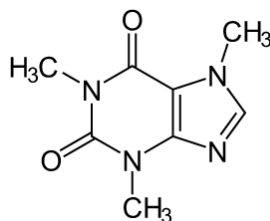


Figura 9: Estructura química de la cafeína

El mecanismo de acción principal de la cafeína a nivel cerebral se basa en el bloqueo competitivo no selectivo de receptores de adenosina, fundamentalmente receptores A1 y A2A. Por otro lado, su efecto estimulante motor se fundamenta en el bloqueo de receptores A2, disminuyendo así la inhibición ejercida por la adenosina endógena sobre la transmisión dopaminérgica en el estriado.

La cafeína puede vaporizar la heroína a temperaturas más bajas y así ser más fácilmente fumada. Además su efecto psicoactivo como estimulante y reforzador positivo también podría explicar su alta prevalencia en dichas muestras.¹²

PARACETAMOL

El paracetamol es un analgésico muy común de venta sin receta. Es fácil de adquirir y relativamente barato. Sus leves propiedades analgésicas y su sabor amargo podrían disimular heroína de menor calidad. El uso de paracetamol como adulterante para la heroína se ha documentado en muchos países y regiones. Su estructura química se muestra en la figura 10.¹³

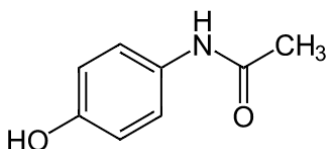


Figura 10: Estructura química del paracetamol

El paracetamol (acetaminofén) es un analgésico de uso corriente. Actúa inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, sustancias responsables en el organismo de la aparición del dolor. También produce efectos antipiréticos (reducción de la fiebre), ya que actúa en el centro hipotalámico regulador de la temperatura.

El paracetamol es el principio activo de muchos productos disponibles para combatir los síntomas del resfriado y de la gripe.

El paracetamol en dosis altas es **tóxico para el hígado** (hepatotoxicidad). Se consideran dosis altas una dosis única de paracetamol de 10 gramos, dosis continuadas de 5 gramos al día en personas no consumidoras de alcohol con buena salud o 4 gramos al día en consumidoras habituales de alcohol. Sin un tratamiento adecuado en el momento oportuno, la **sobredosis de paracetamol** puede dar como resultado un fallo hepático seguido de la muerte al cabo de unos días.

No es recomendable mezclar con alcohol pues puede provocar daños en el hígado, ya que comparte metabolismo hepático con el alcohol. Esto es importante porque muchas personas utilizan la cocaína, el *speed* u otras drogas junto con alcohol para combinar sus efectos y, a veces, el paracetamol se utiliza para adulterar diversas drogas.¹⁴

DEXTROMETORFANO

El dextrometorfano (DXM) es un fármaco ampliamente utilizado desde hace más de 40 años. El dextrometorfano es el dextro-isómero del éter metílico del levorfanol (Figura 11), un análogo de la codeína y un derivado semisintético de la morfina.

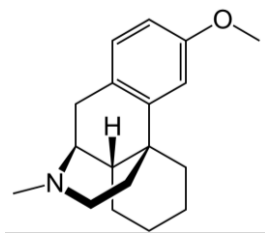


Figura 11: Estructura química del dextrometorfano

A pesar de ser un derivado del levorfanol, un agonista mu-opioide, no produce todos los efectos del sistema nervioso central (SNC) habituales en los agonistas opiáceos, ni los efectos típicos de los opiáceos, incluida la dependencia.

A dosis terapéuticas, el dextrometorfano produce efectos mínimos analgésicos y antitusivos y se ha utilizado para aliviar la tos causada por infecciones víricas leves del tracto respiratorio superior o por irritantes inhalados, y se cree que es más eficaz para la tos crónica, pero no productiva.

A diferencia del isómero levo, fiscalizado este último en la lista I de la Convención Única sobre Estupefacientes del JIFE, Junta internacional de Fiscalización de estupefacientes, carece de actividad analgésica y capacidad de producir depresión respiratoria. Existe, no obstante, cierto riesgo de abuso, sobre todo en adolescentes.¹⁵

El dextrometorfano no suele considerarse una de las denominadas y más comunes "drogas recreativas", como el MDMA (3,4-metilendioxi-N-metilamfetamina) o el éxtasis, la ketamina, la metanfetamina u otras drogas utilizadas principalmente por los jóvenes para aumentar la percepción y los efectos recreativos.

Para muchos jóvenes, el dextrometorfano puede ser una droga atractiva de potencial uso indebido debido a una multiplicidad de factores, entre los que destacan su coste relativamente barato y su disponibilidad sin receta médica. Esta facilidad de acceso y de adquisición "a la carta" puede contribuir involuntariamente a su presunción de seguridad. Los consumidores ocasionales de carácter recreativo no presentan de una clara dependencia física o de un síndrome de abstinencia. Aquellos que utilizan frecuentemente el dextrometorfano como droga de abuso tienen síntomas de abstinencia leves que son similares a los de la abstinencia de los opiáceos. Sin embargo, existe una importante tolerancia al dextrometorfano que es necesario superar para conseguir el "subidón" deseado. La euforia del dextrometorfano se ha descrito como una euforia del tipo de la fenciclidina, lo que ha llevado a referirse al dextrometorfano en la calle como el "éxtasis de los pobres".¹⁶

4.1.2 FENTANILO

El fentanilo se sintetizó por primera vez hace más de 40 años. Es un fuerte opioide sintético similar a la morfina, pero hasta 100 veces más potente que esta y 50 que la heroína, existiendo análogos al mismo, como el carfentanilo, que llegan a ser hasta 10000 veces más potentes que la morfina.¹⁷

Se utiliza como complemento analgésico narcótico en la anestesia general y regional, así como en el tratamiento del dolor crónico persistente y grave.

El fentanilo se vende habitualmente en forma de polvo para disolver e inyectar, fumar o inhalar, como aerosoles nasales, líquidos o en forma de pastillas.

Hay dos fuentes principales de fentanilo en el mercado de las drogas "recreativas". La primera, la más común, combina el fentanilo fabricado ilícitamente a partir de fuentes clandestinas con heroína ("falsa heroína") para aumentar su potencia a un bajo coste, o se incluye, con menos frecuencia, en productos de cocaína. También puede mezclarse y venderse en forma de comprimidos que contienen oxycodona, hidrocodona o alprazolam. La otra forma de obtener fentanilo es a través del desvío de medicamentos que contienen fentanilo, especialmente los parches transdérmicos (FTP).

El fentanilo funciona al unirse a los receptores opioides del cuerpo, los cuales son encontrados en las áreas del cerebro que controlan las emociones y el dolor. Cuando las drogas opioides se unen a estos receptores, ellos pueden incrementar los niveles de la dopamina en las áreas de recompensa en el cerebro, produciendo un estado de euforia y relajación.

Los receptores opioides también son encontrados en las áreas del cerebro que controlan el ritmo de respiración. Dosis altas de opioides, especialmente los opioides potentes como el fentanilo, pueden causar que la respiración se ralentice mucho o se pare completamente, lo que puede dar lugar a una hipoxia, que puede producir un estado de coma, causar graves daños cerebrales e incluso la muerte. La alta potencia del fentanilo aumenta enormemente el riesgo de tener una sobredosis, especialmente si una persona que usa drogas no sabe que un polvo o una pastilla contiene el fentanilo.

En los últimos años se ha producido un aumento sin precedentes de las intoxicaciones relacionadas con el fentanilo, algunas de ellas mortales, en diversas partes del mundo. La mayoría se ha atribuido al consumo de heroína mezclada con fentanilo ilícito, un opioide

mucho más potente. Algunos consumidores no son conscientes de esta adulteración, por lo que el riesgo de sobredosis y envenenamiento es muy alto. Dado que los problemas sanitarios, sociales y económicos relacionados con el fentanilo (así como con sus análogos y otros opioides sintéticos) no dejan de crecer, se necesitan urgentemente nuevas estrategias y tecnologías integradoras y eficaces a gran escala destinadas a la reducción de la oferta y al mantenimiento de las sobredosis.^{18, 19}

5. LOS ALIJOS DECOMISADOS

Según la R.A.E los alijos son “conjunto de géneros o efectos de contrabando” y decomisar “incautarse de algo que ha caído en decomiso”, por tanto, etimológicamente hablando, los alijos decomisados son aquellos productos con los que se trafica, se realiza contrabando, que son intervenidos por las fuerzas de orden público.

Si atendemos a parámetros estadísticos, durante el año 2020 se produjo un leve descenso de las detenciones por tráfico de drogas (0,24%), observándose un gran aumento de las incautaciones de productos del cannabis (hachís, marihuana e incluso plantas), de las drogas sintéticas (muy espectacular en el caso del MDMA, 483% de aumento), leve disminución en el caso de la cocaína (2,5%) y más acusado este descenso en la heroína (23,5 %) y sobre todo de las NSP (67%).

El Citco considera como principales indicadores del tráfico de drogas, entre otros, las detenciones llevadas a cabo y el número de denuncias relacionadas con el consumo y tenencia de drogas. Así, según la memoria anual de dicho organismo, se produce un total de 24114 detenciones durante el año 2020, prácticamente las mismas que el 2019, frenándose así el progresivo aumento que se venía produciendo durante años anteriores (Figura 12).²⁰

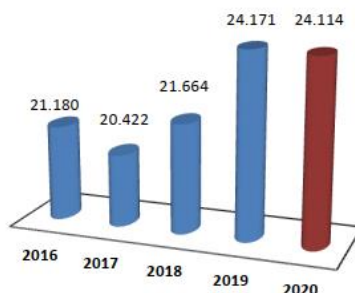


Figura 12: Detenciones memoria CITCO pagina 14

En la Figura 13 podemos observar el número de detenciones por familias de sustancias, de las que el 6,11% corresponden a opiáceos, mayormente heroína

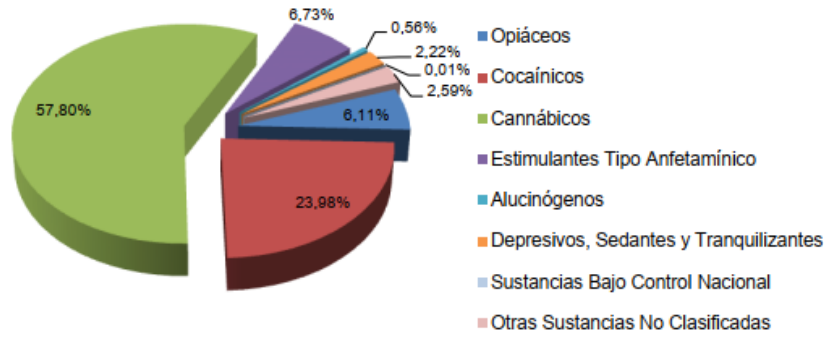


Figura 13: Opiáceos por familias, memoria CITCO página 14

Igualmente, En la Figura 14 se muestra en la gran disminución de las denuncias por consumo y tráfico de estupefacientes con respecto a años anteriores y en la figura 15 se observa la distribución de denuncias por Comunidades Autónomas en el año 2020.



Figura 14: Denuncias formuladas en la aplicación de la L.O. 4/2015 de Protección de Seguridad Ciudadana

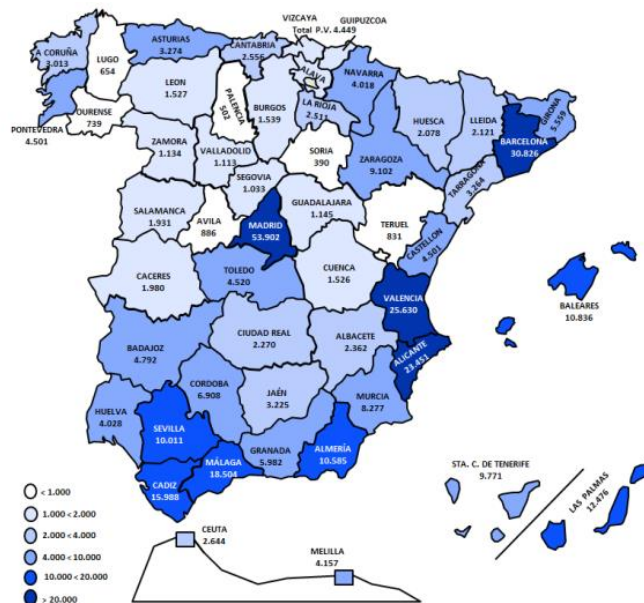


Figura 15: Número de denuncias por provincias CITCO pagina 15

Debemos tener en cuenta que estos datos están afectados por la situación que se vivió a nivel mundial durante todo el año 2020, con la aparición de la pandemia del Coronavirus, no siendo España una excepción en este particular, y que provocó el cambio de hábitos en el consumo de sustancias estupefacientes. Basta con observar las noticias en los diarios (tanto escritos, como tv, radio...) y darnos cuenta de cómo influyó la pandemia en la distribución de las drogas, con numerosos “riders”, repartidores de comida a domicilio, implicados sin tener conocimiento de ello, y convirtiéndose en las improvisadas “mulas” de la red de distribución de las mencionadas sustancias.²¹

Lo anteriormente indicado está sustentado en los informes de la UNODC, que nos indica que la oferta y el tráfico de drogas demostraron ser resistentes a los cambios relacionados con la COVID-19, así después de las interrupciones iniciales, la producción mundial de drogas en gran medida no se vio afectada por la pandemia.

Ciñéndonos a los opiáceos, su producción continuó prácticamente sin cambios. Una combinación entre el momento de las cosechas en Myanmar y México y sobre todo las estrategias de producción o adoptadas por los agricultores en Afganistán (el mayor productor del mundo, cerca del 85%), con una mayor implicación familiar, mujeres y niños, así como de trabajadores locales dio lugar a que la producción en 2020 prácticamente no se viera afectada. Además como no existen indicios de ninguna interrupción en la disponibilidad de precursores químicos para fabricar heroína, es probable que su producción mundial tampoco se haya visto afectada por la pandemia.

Se observó un aumento de las incautaciones de heroína en el Océano Índico (*Ruta Meridional*), las rutas terrestres de transporte hacia Europa se habrían vuelto muy arriesgadas durante la pandemia, esto indicaría un cambio de tendencia en las estrategias de las organizaciones de tráfico de drogas, resultado de las medidas por el COVID-19.²²

La tabla 3 nos muestra que, a pesar de las dificultades sobrevenidas por la pandemia, durante el año 2020 el “menudeo” de heroína sigue siendo bastante elevado, a pesar de representar tan solo poco más del 2% de toda la cantidad incautada de la citada sustancia.

Tabla 3: Heroína incautada en España. Kg por tipo de trafico Cltco pagina 61

	Nº Detenciones	Nº Denunciados	Cantidad Incautada (kg)
Pequeño tráfico y consumo	9.584	1.206	4
Mediano tráfico	9	1.186	27
Gran tráfico	0	125	141

Pequeño Tráfico y Consumo
Menos de 10 gramos

Mediano Tráfico
De 10 gramos a 1 kilogramos

Gran Tráfico
Desde 1 kiloqramos

6. DETERMINACIÓN DROGAS EN ALIJOS

Las drogas de uso ilícito, consumidas con el propósito final de alterar el estado de conciencia o percepción, forman parte de las llamadas sustancias controladas, cuyo análisis confiable es muy importante en diferentes ramas de la ciencia, por ejemplo, en medicina, toxicología, control de doping, asuntos legales (ciencias forenses), pruebas para empleo o supervisión laboral, accidentes de tráfico, programas de rehabilitación, entre otras áreas. Existen diferentes escenarios posibles, cuando se necesita determinar la presencia de sustancias ilícitas (drogas) y cuantificarlas. Se han desarrollado diferentes protocolos de análisis (muestreo, extracción, determinación cualitativa y cuantitativa) de estas sustancias, que se encuentran tanto en forma (relativamente) pura (ej., clorhidrato de cocaína), como en mezclas complejas (street drugs, drogas de la calle o de diseño) o a nivel de trazas (superficies de contacto, fluidos fisiológicos).

En general, los analitos (sustancias controladas, sus derivados o metabolitos) se podrían dividir en dos grupos grandes: (1) muestras bulk (en volumen), por ejemplo, la droga incautada, pastillas distribuidas al por menor (street drug) en la calle, productos fabricados en un laboratorio clandestino, entre otros y (2) a nivel de trazas; entre estos últimos figuran muestras toxicológicas (fluidos, órganos, tejidos), muestras recolectadas de las superficies de contacto con la droga, manos, empaques, tapetes, ropa, etc. Un grupo de analitos muy *sui generis* lo representan las sustancias encontradas en los laboratorios clandestinos, donde se extrae (ej., cocaína, morfina) o se sintetiza la droga de uso ilícito (ej., anfetaminas). En estos laboratorios clandestinos, los materiales de partida, los disolventes o los productos de síntesis obtenidos pueden tener rótulos o etiquetas en los recipientes muy

distintos a su verdadero contenido y hay que tener mucha precaución para llevar a cabo la marcha analítica y la determinación de la naturaleza química de las sustancias.

Los análisis de sustancias controladas pueden dividirse en dos grandes grupos, según el propósito o alcance final: (1) pruebas presuntivas (preliminares o de tamizaje, screening) y (2) pruebas confirmatorias. Las pruebas presuntivas comprenden las reacciones de color, que se realizan in situ con un kit de reactivos específicos (por ejemplo, reactivo de Ehrlich, prueba de Marquis, reactivo de Mandelin, prueba de Scott, entre otros) que se usan, por ejemplo, en aeropuertos, puertos marítimos, aduanas, etc.; la cromatografía de capa fina (TLC, Thin-Layer Chromatography, por sus siglas en inglés), sobre todo, la TLC de alta eficiencia, que se practica en muchos laboratorios toxicológicos, por ser un método rápido, relativamente sencillo, para establecer la presencia de una droga, ej., en casos de intoxicaciones, sobredosis, etc.; los inmunoensayos (por ejemplo, RIA, Radioimmunoassay; ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Enzyme-multiplied immunoassay technique, EMIT, por mencionar algunos), que permiten seleccionar, de un gran número de muestras, aquellas con la respuesta positiva, para seguir luego con su análisis confirmatorio. La cromatografía de gases tradicionalmente es el método más empleado para análisis de drogas de control y sus metabolitos; típicamente se usan detectores convencionales, ej., FID (detector de ionización en llama), NPD (detector de nitrógeno y fósforo) o ECD (detector de captura de electrones, para derivados), se comparan los tiempos de retención (t_R) de las sustancias (drogas) con los del material de referencia (patrones); la coincidencia de los t_R de los analitos (drogas y sustancias-patrón) resulta ser un evento necesario, pero no suficiente para la identificación confirmatoria de la sustancia. Para la confirmación positiva es necesario no solamente tener el material de referencia, sino disponer de un sistema de detección espectroscópica. Entre los más usados, un detector selectivo de masas (MSD), que permite obtener y comparar los espectros de masas de la sustancia "X" y del compuesto-patrón.²³

A la hora de elegir la muestra adecuada para realizar los análisis de muestras de drogas de abuso, existen diferentes factores a considerar para obtener la información requerida. Así, habrá que tener en cuenta si se desea obtener una información meramente cualitativa o también cuantitativa de las sustancias objeto del estudio, el tipo de las mismas (cannabinoides, opiáceos, NPS...), o la matriz en la que se halla inmersa la muestra.

Este último aspecto, la matriz, es especialmente relevante, y más para el objeto del presente documento. Evidentemente, no es lo mismo tener que determinar drogas de abuso sobre

matrices biológicas, cabello, orina, sangre..., que sobre alijos decomisados. La problemática que surge en uno u otro caso es completamente distinta.

7. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN HEROÍNA Y OTRAS DROGAS EN ALIJOS

Como ya hemos comentado, la sustancia objeto de este trabajo es la heroína, opiáceo ilícito de mayor consumo, proveniente del tráfico de estupefacientes e intervenido por las fuerzas policiales. Se encuentra fiscalizada en las lista I y IV de la Convención Única sobre Estupefacientes del JIFE, Junta internacional de Fiscalización de estupefacientes. La lista I hace referencia a sustancias que son muy adictivas o de probable uso indebido y precursores que se pueden convertir en estupefacientes que son igualmente adictivos y también de probable uso indebido. La lista IV, sustancias sujetas a especiales medidas de fiscalización, corresponde a determinadas sustancias enumeradas en la lista I consideradas “particularmente nocivas por sus propiedades adictivas” y con escaso o nulo valor terapéutico.²⁴

7.1. MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La preparación de la muestra es aún un paso vital del proceso analítico ya que asegura que las muestras sean adecuadas para la determinación cromatográfica. Las técnicas actualmente usadas dependen del estado de agregación de la muestra a ser analizada y de la naturaleza de los analitos (ejemplo, volatilidad y estabilidad térmica). Entonces, en la aplicación de CG-EM a drogas de abuso y otras drogas en fluidos corporales, es de fundamental importancia la preparación y/o la concentración de la muestra, y más aún el método elegido para hacerlo, que tiene que ser preciso y reproducible. Originalmente, el método más común de extracción de la droga de la muestra era la extracción líquido-líquido. Sin embargo, en años recientes, particularmente como el ensayo de drogas se hizo más común en lugares de trabajo y en áreas atléticas, se comenzó a usar la extracción en fase sólida (solid-phase extraction: SPE). Casi todas las determinaciones realizadas por CG requieren varios pasos de extracción, limpieza y preconcentración. Los inconvenientes de estas etapas se pueden superar mediante automatización. Entre las diferentes alternativas de extracción/ limpieza/preconcentración, la extracción en fase sólida (SPE) es la preferida para el pretratamiento de muestras ambientales, de alimentos y biológicas.²⁵

En el presente trabajo se determina heroína procedente de alijos, por tanto la matriz de la muestra es la droga en si misma, evidentemente en la casi totalidad de las ocasiones, con

diferentes acompañantes, sustancias de corte, adulterantes, productos provenientes de su elaboración y degradación... esto simplifica enormemente el tratamiento de la matriz y generalmente basta con una simple disolución de la muestra en el disolvente adecuado para su análisis por, en el caso que nos ocupa, cromatografía de gases y cromatografía de líquidos de alta resolución, en contraposición con el tratamiento a realizar, como ya se ha indicado, en caso de tener que determinarla en muestras biológicas.

7.2. ANÁLISIS CUALITATIVO. SCREENING

En este trabajo, para el análisis cualitativo de las muestras pulverulentas sólidas procedentes de alijos se emplea la cromatografía de gases con detector selectivo de masas como método de screening. Esta técnica es una de las técnicas más frecuentemente utilizadas para la identificación de muestras de drogas con fines forenses, debido a que realiza una identificación exacta y la cuantificación de las sustancias de abuso o sus metabolitos. Como técnica combinada con espectrometría de masas, aúna el poder de discriminación y la sensibilidad de un cromatógrafo de gases (GC) con la especificidad para la muestra analizada que aporta una técnica espectroscópica. Además puede proporcionar datos espectrales altamente específicos de las distintas sustancias presentes en una mezcla compleja sin necesidad de aislarlos previamente.

7.2.1 Cromatografía de gases

La cromatografía es una técnica de separación, su gran capacidad para resolver muestras complejas la hace idónea para usarla como técnica analítica. Se basa en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una estacionaria y otra móvil. Esto ha llevado al desarrollo de una instrumentación que puede operar en continuo, con mayor eficacia en la separación y mayor control de las condiciones cromatográficas para incrementar la reproducibilidad de los resultados.

La cromatografía de gases es una técnica que se desarrolló hace cinco décadas, se empleó inicialmente para compuestos volátiles que no se descompusieran al calentarse, pero actualmente se ha extendido a polímeros que al calentarse producen monómeros volátiles.

Su rapidez y buena resolución se han aplicado al análisis de mezclas complejas de hidrocarburos, pesticidas en el suelo y productos vegetales, drogas en sangre, solventes de uso industriales y sustancias ecotóxicas derivadas de los pesticidas, que se consideran contaminantes ambientales, aromas, saborizantes empleados en alimentos, fragancias

empleadas en la industria de perfumes y en ciencias forenses para identificar sustancias inflamables causantes de incendios.

Para que la aplicación de ésta técnica tenga éxito es necesaria una cuidadosa selección de las columnas cromatográficas empleadas. En general, la cromatografía de gases las columnas y detectores son más específicos que los de la cromatografía líquida, empleándose también volúmenes de muestra menores debido a la menor capacidad de las columnas.

La cromatografía de gases es la técnica cromatográfica usada con fines analíticos de más amplia utilización debido a su capacidad de separación o sensibilidad a la hora de analizar compuestos volátiles^{26, 27}

Las técnicas de cromatografía de gases (GC) y espectrometría de masas (MS), unidas es un poderoso tándem, GC-MS, ya que son herramientas imprescindibles en los análisis ambiental, forense, de productos naturales, control de doping, alimentos, toxicología y en muchas más áreas de investigación.

El MSD (detector selectivo de masas) es un sistema de detección cromatográfica que a través de un espectro de masas (junto con los índices de retención cromatográficos permite elucidar la estructura del analito. Lo más interesante del MSD es su capacidad de funcionar como un sistema de detección universal, detector selectivo o detector específico. La transmisión por el analizador, la separación y el registro de todos los iones que se forman y emergen de la cámara de ionización en función de tiempo, llamado el modo de full scan (barrido completo), permite el funcionamiento del MSD como detector cromatográfico universal. Los espectros de masas obtenidos para cada pico cromatográfico pueden ser comparados con los de las bases de datos (bibliotecas de espectros) comerciales.

Los detectores selectivos de masas se dividen en dos grandes grupos. El primero, lo constituyen los analizadores de barrido (Scanning Analyzers). Entre éstos se encuentran los analizadores sectoriales, ej., de deflexión magnética de un enfoque o de dos enfoques, cuando se agrega otro analizador, electrostático, y los analizadores cuadripolares. El segundo grupo lo conforman analizadores de transmisión de iones simultánea. Entre éstos, figuran los de tiempo de vuelo (TOF), diferentes tipos de trampas iónicas (IT) y analizadores de masas con transformada de Fourier (FT-MS, Fourier Transform Mass Spectrometers, por sus siglas en inglés), concretamente, espectrómetros de masa de resonancia ion-ciclotrónica (ICR-MS, Ion-Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, por su siglas en inglés); los últimos han adquirido últimamente popularidad en el campo de técnicas de acoplamiento

tanto de cromatografía líquida como de gases. Los detectores selectivos de masas se diferencian entre sí por sus propiedades o especificaciones técnicas y alcances analíticos.²⁸

7.3. ANÁLISIS CUANTITATIVO

A continuación se describen muy brevemente las técnicas analíticas de separación y detección empleadas en la determinación de heroína y otras drogas haciendo mayor hincapié en la Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UPLC) por ser la empleada en la parte experimental de esta memoria.

7.3.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La Cromatografía de líquidos, es una técnica de análisis químico ampliamente utilizada, la cual permite separar físicamente y cuantitativamente los distintos componentes de una solución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla, consta de dos fases, una fija que suele llamarse fase estacionaria, y una móvil (fase móvil) que fluye permanente durante el análisis, y que en este caso es un líquido.²⁹

Existen distintos tipos de cromatografía líquida, que se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Tipos de cromatografías de líquidos.

Tipo	Fase Móvil	Fase estacionaria	Método de fijación de la fase estacionaria
Partición	Líquido	Líquido	Adsorbida en un sólido sostenido en una columna tubular
Adsorción	Líquido	Sólido	Sostenida en una columna tubular
Papel	Líquido	Líquido	Sostenida en papel
Capa fina	Líquido	Sólido o Líquido	Sólido sostenido en placa de vidrio o líquido absorbido sobre partículas
Gel	Líquido	Líquido	Sostenido en un polímero sólido
Intercambio iónico	Líquido	Sólido	Resina de intercambio iónico en una columna tubular

Para realizar una cromatografía líquida tan solo es necesario disponer de las dos fases implicadas en el proceso y de la columna, la moderna cromatografía de líquidos de alta eficacia debido al pequeño diámetro de las partículas de la fase estacionaria que se utilizan, requiere de la utilización de unos dispositivos que constituyen el cromatógrafo.

Como detectores, uno de los utilizados es el detector de fotodiodos (detector de fotodiodos lineal (LPAD) o detector de matriz de diodos (DAD) que fue introducido en el mercado por Hewlett-Packard en 1982. Sin embargo, Las técnicas de ionización a presión atmosférica han revolucionado la detección en LC-MS. La combinación de la cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC- MS, *liquid chromatography-mass spectrometry*) tiene gran potencial, y se aplica cada vez a más campos, con el objetivo de separar, identificar y cuantificar componentes de bajos pesos moleculares, y caracterizar productos de altos pesos moleculares.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica cromatográfica líquida más utilizada en el análisis cualitativo y cuantitativo de medicamentos y drogas. También se utiliza para la identificación y cuantificación de compuestos en el proceso de desarrollo de fármacos y se ha utilizado en todo el mundo desde hace décadas.

Sin embargo, ciertas necesidades analíticas no pueden ser satisfechas por el método HPLC, como es la determinación de muestras complejas: muestras biológicas, productos de degradación, impurezas, excipientes, metabolitos de fármacos e isómeros de fármacos.

En HPLC surgen problemas relacionados con la determinación de analitos a baja concentración (0,1%), velocidad de análisis y resolución por unidad de tiempo. Para lograr una mejora en la resolución, la velocidad y la sensibilidad en LC, se ha desarrollado un nuevo diseño de sistema con un avance significativo en la instrumentación y la tecnología de columnas basado en partículas de menos de 2 micras llamado cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) que, también se conoce como UPLC.^{30, 31}

Hoy en día las industrias farmacéuticas se centran en nuevas formas de aumentar la economía y acortar el tiempo de desarrollo de fármacos.

7.3.2 Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UPLC)

Cada vez es más necesario disponer de métodos de separación rápidos y ultrarrápidos con buena eficacia y resolución. UPLC, también conocida como cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC), es una nueva técnica, derivada de HPLC, que ofrece una nueva vía para la cromatografía líquida ya que mejora la capacidad de dicha cromatografía en cuatro áreas principales como son el aumento de la velocidad, la sensibilidad, la resolución y la precisión.

La cromatografía líquida de ultra rendimiento/resolución (UPLC) se ha convertido en una técnica muy utilizada, que aprovecha al máximo los principios cromatográficos para realizar la separación, utilizando columnas cortas empaquetadas con partículas más pequeñas (sub-

2 μm), lo que permite que la fase móvil tenga mayor flujo a través de la columna para que se produzca una separación más rápida, sensible y con mayor resolución. Esto por tanto, ha permitido reducir el tiempo de análisis, mejorar la eficiencia de los picos (anchura de los mismos), mejorar la resolución y disminuir el uso de disolventes en comparación con la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) convencional. Además, el sistema UPLC permite la detección de analitos a concentraciones muy bajas debido a la mejora de la relación señal/ruido.

El volumen de inyección en UPLC puede reducirse significativamente sin pérdida de sensibilidad. Sin embargo, el uso de columnas cortas (50-100 mm), empaquetadas con partículas de menos de 2 μm en la cromatografía líquida (LC) convencional, está limitado por el aumento de la contrapresión de la columna (>40 MPa) que no es compatible con la instrumentación convencional. La necesidad de utilizar instrumentación dedicada a la UPLC es una limitación de esta técnica.^{32, 33}

Para la instrumentación del equipo de UPLC se tiene un carrusel o una bandeja, donde se coloca la muestra, un dispositivo para suministro del eluyente que incluye una bomba, dispositivo de inyección, la columna UPLC, detectores, una botella de desechos y el registrador de datos, como se muestra en la Figura 16.

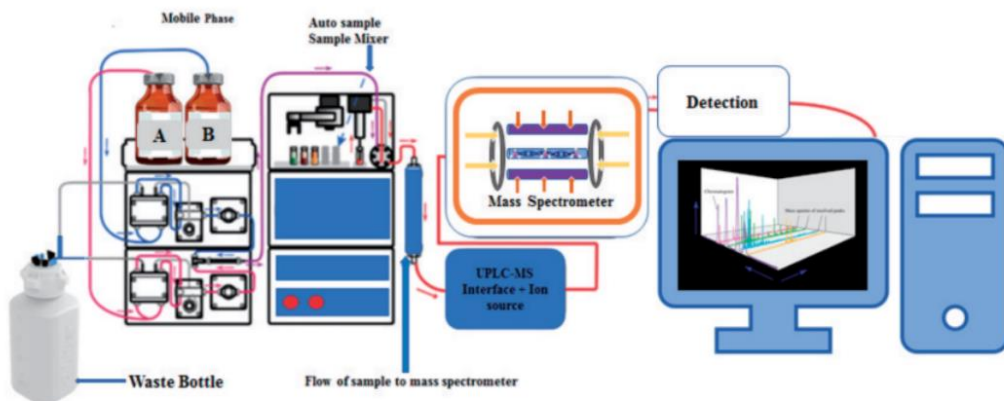


Figure 1.
Flow diagram of ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry.

Figura 16: Esquema de los componentes principales de un UPLC.

En cromatografía líquida las muestras a inyectar tienen que pasar previamente por un proceso de preparación para que puedan estar en solución, para eso se puede diluir, disolver o añadir un estándar.

Los tipos de muestras a usar son carbohidratos, aminoácidos, pesticidas, fármacos, vitaminas, azúcares, alimentos, así como muestras de agua y suelo.

Los detectores utilizados dependen de la muestra que va a ser inyectada y la propiedad de esta que será aprovechada, entonces pueden ser aquellos que responden a una propiedad de la disolución, es decir de la fase móvil, como son: índice de refracción, electroquímico. También se tienen aquellas que aprovechan una propiedad del soluto tal como: absorbancia UV-Visible, fluorescencia, absorbancia, radioactividad, infrarrojo entre otros. En nuestro caso el cromatógrafo UPLC, utiliza detectores de fluorescencia o de arreglo de diodos.³⁴

En la cromatografía tiene una gran importancia la temperatura, dado que permite trabajar con flujos mayores, diluye la viscosidad de la fase móvil lo que incrementa la rapidez de circulación del flujo. Para el UPLC, como antes fue mencionado, la presión es importante dado que agiliza el análisis, sin embargo, a largo plazo reduce la vida útil de las columnas y requiere mayor mantenimiento.³⁵

En los últimos años, UPLC se ha convertido en una parte integral de cualquier laboratorio ya que reduce el tiempo de funcionamiento, así como el costo para cualquier análisis.

Entre las aplicaciones de la cromatografía líquida en la industria se puede destacar: detección de drogas ilícitas, toxicología forense, tecnología alimenticia, ciencia clínica, manufacturas productos para que tenga mayor pureza.

7.3.3. Comparación de las técnicas de separación UPLC vs HPLC

El tamaño de partícula y la presión de bombeo son las dos principales diferencias entre HPLC y UPLC. El principio subyacente que hace que UPLC mejore a HPLC es el empleo de un tamaño menor de partícula del relleno de la columna, menor de 2 μm de diámetro, lo que hace que el tiempo de retención sea menor y por tanto mejora la eficiencia, aumenta la velocidad, precisión, sensibilidad y, por tanto, la resolución.

Con respecto a la presión, UPLC, como su nombre indica (ultra rendimiento o ultra-presión) trabaja a muy alta presión, hasta 1200 bares, mientras que en HPLC la presión de la bomba no supera, generalmente, los 300-400 bares.

UPLC ha adquirido importancia dentro de las aplicaciones de la cromatografía líquida debido a su mayor sensibilidad y poder de separación en comparación HPLC, haciendo que disminuya el tiempo y el coste de los análisis. Entre sus aplicaciones encontramos el análisis de compuestos de alimentos y plantas, por ejemplo, vitaminas, fenoles y alcaloides. En el

campo de la seguridad alimentaria, la UPLC se utiliza para la determinación de residuos de pesticidas y sus metabolitos, y de aminas aromáticas heterocíclicas. Las principales aplicaciones de la UPLC en los análisis farmacéuticos incluyen el control de calidad y la supervisión de la estabilidad de los productos, el descubrimiento y el desarrollo de fármacos

En resumen, ambas técnicas HPLC y UPLC tienen ciertas ventajas: un corto tiempo de análisis, resultados de alta resolución y sensibilidad, automáticas, entre otras. Eso hace que por ejemplo la industria farmacéutica las use constantemente para el control de la calidad de los fármacos elaborados y a su vez verificar la pureza de los componentes que conforman los antibióticos. De la misma manera, son aprovechadas por otras industrias como la alimentaria, la química, ambiental entre otras. No obstante resultan ser técnicas muy costosas, en especial UPLC. Además, sus manejos son muy complejos y precisa de expertos para manipularlas.³⁶⁻⁴¹

A continuación en la figura 17, se comparan dos cromatogramas de ambas técnicas.

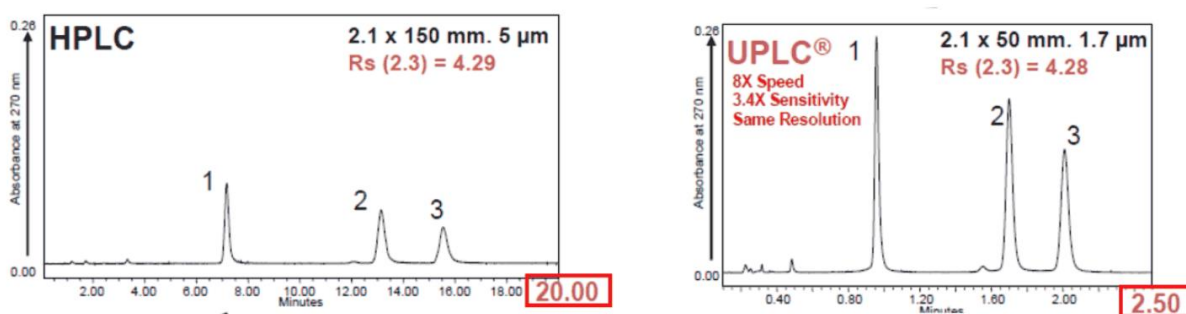


Figura 17: Comparación cromatogramas HPLC vs UPLC.

Como se puede observar en UHPLC, el tiempo de análisis ha sido menor manteniendo una separación satisfactoria de los compuestos. En UHPLC los tres compuestos se separan en 2,5 minutos mientras que en HPLC en 20 minutos.⁴²

Aunque la GC capilar ofrece la mayor capacidad de picos de las técnicas de separación disponibles, puede ser problemática para los solutos que son térmicamente degradables, altamente polares o no volátiles. Las técnicas de separación en fase líquida, como la electroforesis capilar (CE) y la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), que también ofrecen una detección sensible, no sufren las limitaciones anteriores y se han utilizado ampliamente para la elaboración de perfiles de heroína. La CE, que tiene una capacidad de pico menor que la GC capilar, se ha investigado con detección ultravioleta de matriz de fotodiodos (PDA UV) y la detección por fluorescencia inducida por láser (LIF). La

HPLC, que tiene menor capacidad de pico que la CE, se ha utilizado con detección UV y PDA UV y detección por fluorescencia y electroquímica.⁴³⁻⁴⁹

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1 JUSTIFICACION

El presente documento surge de una colaboración entre el INTFC y la UNED. El INTCF en su servicio de drogas, y más concretamente en la sección de alijos, que es la que nos atañe, realiza de manera rutinaria el análisis de miles de muestras correspondientes a incautaciones realizadas por las Fuerzas y cuerpos de Seguridad de Estado, de las cuales una buena parte son, presuntivamente, de heroína.

El método utilizado actualmente, para el análisis utiliza dos técnicas, la CG y la HPLC y está debidamente validado y acreditado por ENAC, pero presenta varios inconvenientes: precisa un amplio tiempo para el análisis de cada muestra, que además debe realizarse por duplicado, con lo que ello supone a nivel de coste, tanto económico, como de recursos humanos e incluso a nivel medioambiental.

Todo ello hace, que se busque nuevas alternativas para hacer los análisis rutinarios de drogas y en especial de heroína. Se ha decidido optimizar un método de Ultra Cromatografía de Líquidos (UPLC) aprovechando las características del equipo de Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) que permite trabajar en condiciones de UPLC, y partiendo de las características del método actual existente, HPLC con objeto de desarrollar un nuevo método mejorado.

Para poder apreciar las mejoras que se proponen con el nuevo método de UPLC se va a realizar una breve descripción del método de determinación de heroína que se emplea actualmente de Cromatografía de Gases (CG) y de HPLC.

8.2 EQUIPOS Y REACTIVOS

8.2.1 Equipos

La separación cromatografica para el screening se realizó utilizando un sistema de cromatografía de gases Agilent Technologies, modelo 7890B GC System.

Para la identificación, el GC fue acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Technologies, modelo 5977A MSD. El gas portador es He.

LA cuantificación se llevo a cabo mediante cromatografía de líquidos de ultra alta presión, para lo que se uso un sistema UHPLC de Agilent Tehcnologies modelo 1290 Infinity II,

equipado con bomba cuaternaria y acoplado a un detector DAD, adquiriendo datos en unas longitudes de onda entre 180 y 380nm, aunque la cuantificación se realiza a 210nm, donde mejor absorbe la heroína.

8.2.2 Reactivos y disolventes

Para las fases móviles: El acetonitrilo (ACN) y el ácido ortofosfórico proceden de Fisher Scientific (Loughborough, UK). El Formiato amónico y ácido fórmico se obtuvieron de Scharlab (Barcelona, España). el dihidrógeno fosfato potásico y el metanol se compraron a Merck Millipore (Madrid, España)

El hidrogeno fosfato de potasio es de Panreac (Barcelona, España)

Para los patrones y soluciones estándar: La cafeína, fenacetina, y el paracetamol se adquirieron en Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). La cocaína, acetilcodeína, heroína, morfina, noscapina y papaverina son de Lipomed (Cambridge, USA). El dextrometorfano es de Cerilliant (Texas, USA). La 6-monoacetilmorfina y el fentanilo son de LGC (Barcelona, España). La tetracaina, lidocaína y procaina son de Supelco (Madrid, España)

El H₂O de grado HPLC se obtuvo purificando agua desmineralizada en un sistema Milli-Q plus de Millipore. Todos los reactivos utilizados fueron de grado HPLC

8.3. DESCRIPCION DEL METODO ACTUAL PARA EL ANALISIS Y CUANTIFICACION DE HEROÍNA

Actualmente en el INTCF se utiliza un método de cuantificación de heroína debidamente validado y que cuenta con acreditación de ENAC. Todos los procedimientos, desde la recepción las muestras, custodia, preparación para análisis, análisis propiamente dichos y custodia post-análisis están recogidos en PNT's elaborados exprofeso, y en las correspondientes HRD's. Dichos documentos, además, serán necesarios para llevar a cabo las diferentes auditorias tanto internas como externas que permiten aseguran los estándares de calidad del procedimiento y fiabilidad de los resultados informados, así como detectar cualquier desviación, fuente de error, que deba ser propuesta para una acción correctiva.

8.3.1. Preparación de las muestras.

Como ya se ha comentado en el presente trabajo, las muestras con las que trabajaremos provienen de alijos decomisados, bien sean papelinhas o similares preparadas para consumo

propio o venta para el mismo (“menudeo”, “trapicheo”), o, muestras mayores tipo “cilindros”, “bellotas”, bolsas de plástico con polvo en su interior... destinadas a un tráfico de estupefacientes a mayor escala.

Las muestras, como norma general, suelen corresponder a una sustancia de aspecto pulverulento-sólido y de color marrón/beige en algunas ocasiones mezcladas con otras sustancias como podría ser cocaína con lo cual el polvo puede presentar zonas de otro color, normalmente blanco.

La heroína suele venir adulterada con otras sustancias, tales como cafeína, paracetamol, dextrometofano... y en no pocas ocasiones, producto de su degradación, entre los que por ejemplo se encuentra la 6-MAM.

La preparación de las muestras para análisis consiste en la disolución de la cantidad estipulada de la misma en el disolvente adecuado que no interfiera en la determinación cromatográfica. En este caso concreto se pesan entre 10 y 14 mg de muestra en la balanza analítica y se llevan a matraz aforado de 25 ml que se enrasa con Metanol. El matraz se lleva a baño de ultrasonidos, se sónica en torno a 2-3 minutos y se transfiere en torno a 1 ml del preparado a un microvial que se encapsula. El vial se mantendrá congelado hasta su análisis.

8.3.2 Preparación de las soluciones estándar para la recta de cuantificación y controles diarios.

Preparación solución madre:

- Heroína de aproximadamente 120 mg/100 ml:

Se pesa una cantidad exacta del patrón certificado de heroína dependiendo de la riqueza en heroína base que tenga dicho patrón, de manera que queden alrededor de 12 mg de heroína de base y se diluye en un matraz aforado de 10 ml con metanol. Posteriormente, se calcula la concentración exacta de heroína en % de base.

Preparación de las diluciones de solución madre para obtener los puntos de la recta de calibrado.

- Se preparan disoluciones de heroína de 40 - 20 -10 - 2,5 -1 y 0,5 mg/100mL tomando el volumen correspondiente de la disolución madre (120mg/100mL) Y llevándolo a un volumen de 10 ml con metanol. posteriormente se calcula la concentración de heroína en % de base.

Todas las disoluciones se mezclan utilizando el agitador vortex y se pasan a un tubo topacio que se guarda en el congelador.

- Los controles diarios se podrán preparar de diferentes formas según su disponibilidad:
 - ❖ Utilizando una disolución patrón de concentración baja (1mg/100 ml) intermedia (10 mg/100 ml) y alta (40 mg/ 100 ml) preparada como hemos comentado previamente, pero partiendo de una disolución madre diferente a la empleada para preparar la recta.
 - ❖ Utilizando una disolución patrón de concentración baja (1mg/100 ml), intermedia (10 mg/ 100 ml) y alta (40 mg/100 ml) preparada partiendo de un lote diferente del material de referencia certificado al empleador para preparar la recta.
 - ❖ Utilizando un material de referencia sobrante de ejercicios de intercomparación con concentración conocida, en un rango lo más cercano posible al punto de concentración baja (1mg/ 100 ml), intermedia 10 mg/ 100 ml y alta (40 mg/100 ml) o por dilución del punto alto obtener los demás. El material de referencia seleccionado no debe superar los dos años de antigüedad desde su recepción.

- También se preparan los controles de la forma anteriormente indicada y previamente (por ejemplo una semana antes) a la preparación de una nueva recta, para garantizar con antelación su correcta preparación. Para ello se comprobará con la recta de calibrado en vigor que cumplen los requisitos establecidos.

8.3.3 Screening y cuantificación.

Tal como se indica en el PNT del INTCF que hace referencia al screening, sobre cada muestra se hará un screening general por CG-MS o CL-DAD. En los casos en los que la GC-MS no de resultados se podrá realizar un análisis por otra técnica tal como HPLC. espectrometría infrarroja (FTIR) u ORBITRAP para la correcta identificación de las sustancias.

Una vez que las muestras estén debidamente identificadas se procederá a elegir aquellas que deban ser cuantificadas y realizar dicha cuantificación por el procedimiento adecuado. En este caso nos centramos en la heroína, cuya identificación cualitativa mediante su espectro de masas en librerías deberá dar al menos una concordancia del 90%.

La cuantificación de la heroína se llevara a cabo por la técnica HPLC-DAD, con estándar externo mediante recta de calibrado. La correcta identificación de la sustancia se hará tanto por su tiempo de retención debidamente fichado, así como por su espectro de UV. El propio

programa del cromatógrafo nos dará la concentración de la heroína de la alícuota, por lo que a la hora de cuantificar se deberán tener en cuenta las diluciones realizadas y el peso de muestra cogido. El intervalo de trabajo se encuentra entre 3,5% y 100% de heroína base. En cada secuencia que se ponga con muestras para cuantificar se pondrán también tres controles, concentración baja, media y alta, preparados de distinta solución madre que la empleada para preparar la recta calibración. Los límites de control para cada nivel serán de 10% para la concentración baja, 4,4% para la media y 3,1% para la alta.

8.4 OPTIMIZACIÓN DEL METODO UPLC

Como ya hemos visto anteriormente la heroína se deriva de la acetilación de la morfina obtenida del opio. Este preparado sintético contiene impurezas procedentes del opio y de la acetilación de los alcaloides del opio. Las principales impurezas básicas de la heroína incluyen la morfina, la codeína, la noscapina, la papaverina, la acetilcodeína, la 6-monoacetilmorfina y 3-monoacetilmorfina. Las impurezas ácidas y neutras se encuentran, generalmente, presentes en niveles más bajos que las básicas y apenas interfieren en las determinaciones.

El objetivo principal de este trabajo es poner a punto un método de cuantificación de heroína por UHPLC, partiendo del método ya validado para HPLC, trasladando este al anterior y optimizando todos los parámetros necesarios para conseguir una mejor separación cromatográfica de manera que no existan interferencias en la resolución de los picos cromatográficos en la separación de la heroína, sus impurezas y sustancias de corte acompañantes habituales.

- Durante el proceso de optimización de la separación cromatográfica se evaluaron los diferentes parámetros que podían influir en la misma, como son la columna de separación utilizada, la composición de la fase móvil, la velocidad de flujo y la temperatura de la columna.
- Para la elección de columna y fase móvil se ensayaron las diferentes columnas cromatográficas de separación con distintos tamaños y rellenos. Se probaron cuatro fases móviles diferentes para cada una de las columnas ensayadas, variando el flujo y la temperatura de manera que la presión de la columna y el equipo se mantuvieran por debajo de 1100 bares en las condiciones más adversas. Tanto el equipo como las columnas ensayadas soportan 1200 bares, por tanto se cuenta con un margen de seguridad, aun así se busca en todo caso trabajar en condiciones UPLC pero a la

presión más baja posible, con objeto de alargar tanto la vida del instrumento como de las columnas.

Con respecto a las columnas, uno de los factores a tener en cuenta es la disponibilidad de las mismas en el laboratorio, así entre las disponibles se decide emplear columnas con relleno C-18, pues es idónea para la cromatografía en fase reversa. La fase estacionaria C18 ofrece una interacción hidrofóbica muy simple. A medida que los solutos en la fase móvil viajan por los poros de sílica, pueden ser atraídos y retenidos por el hidrocarburo mediante una interacción hidrofóbica (y fuerza de Van der Waal) relativamente débil.⁵⁰

En la tabla 5 se observa las características de las columnas ensayadas

Tabla 5: Características de las columnas UPLC utilizadas

Nombre comercial	Relleno	Tamaño de partícula	Longitud (mm)	diámetro interno (mm)
InfinityLab poroshell 120	EC-C18	1,9 µm	100	2,1
InfinityLab poroshell 120	EC-C18	1,9 µm	50	2,1
Zorbax eclipse plus	C18	1,8 µm	50	2,1

En la presente optimización lo que nos interesa es dilucidar la concentración de heroína sin la interferencia de otras sustancias, ya sean adulterantes o productos del metabolismo de la heroína. La amplia experiencia del INTCF en dicha determinación nos permite conocer de antemano que la sustancia que puede interferir en la cuantificación de la heroína pues puede coeluir con esta en función de las condiciones cromatográficas, es la acetilcodeína. El resto de sustancias, se retienen más o menos de una manera apreciable, de modo que no dificultan nuestros análisis, aunque siempre será interesante que puedan ser identificados de una manera relativamente clara.

Por lo expuesto, para la optimización en cada ensayo se inyectara en el equipo UHPLC un *pool de heroína/acetilcodeína* en proporción 10/1, porcentaje que es una relación bastante habitual en muestras reales.

Cada columna de ensayo con cuatro fases móviles (FM) distintas, que son:

- FM 1: tampón fosfato soódico (5mM pH 2,8) : ACN
- FM 2: tampón fosfato sódico (5mM pH 2,8) : metanol
- FM 3: tampón fórmico/formiato (5mM/0,1% pH 4) : ACN
- FM 4: tampón fórmico/formiato (5mM/0,1% pH 4) : metanol

Para la selección de la fase móvil se tiene en cuenta que la heroína y sus impurezas más importantes son alcaloides. Además se tiene en cuenta la disponibilidad de los reactivos en el laboratorio y la que se ha encontrado en la bibliografía en referencia a estas fases móviles, para la determinación de heroína y sus impurezas, ya sea en isocrático o gradiente.^{51, 52}

Con cada columna y fase móvil se hacen diversas variaciones de la concentración de la fase móvil así como de los flujos de la misma y temperatura de la columna. En la siguientes tablas se muestran los estudios realizados, para la optimización de la separación y determinación de la heroína utilizando diferentes columnas (Tabla 6: columna Poroshell 10 cm, tabla 7: columna Zorbax Eclipse Plus y tabla 8: columna Poroshell 5cm), diferentes composiciones de la fase móvil, temperaturas (55 y 60°C). Se muestra, además, los tiempos de retención y la anchura de los picos obtenidos y si es o no posible la resolución de los picos para la determinación de heroína.

Tabla 6: Separación de los picos de Heroína/acetilcodeína columna Poroshell 10cm (todas isocraticas)

		Composición FM (tampón/F.Org aníca)	flujo (mL/min)	T(°C)	T _R heroína	Ancho pico heroína	Tiempo entre máximo (min)	resuelve
1P10cm	FM1	90/10	1,0	55	3,17	0,50	0,27	No resuelve
2P10cm	FM1	90/10	0,8	55	3,95	0,45	0,34	No resuelve
3P10cm	FM1	91/9	1,0	55	3,92	0,42	0,35	Resuelve
4P10cm	FM1	91/9	0,8	55	4,85	0,51	0,45	Resuelve
5P10cm	FM2	80/20	0,4	60	3,57	0,50	0,26	No resuelve
6P10cm	FM2	80/20	0,5	60	2,89	0,40	0,20	No resuelve
7P10cm	FM2	85/15	0,5	60	6,20	0,58	0,71	Resuelve
8P10cm	FM2	85/15	0,6	60	5,17	0,47	0,57	Resuelve

9P10cm	FM3	80/20	0,5	60	1,20			Coeluyen
10P10cm	FM3	80/20	0,8	60				Coeluyen
11P10cm	FM3	85/15	0,7	60	1,56			Coeluyen
12P10cm	FM3	85/15	0,5	60	2,41		0,11	Coeluyen parcialmente
13P10cm	FM3	90/10	0,9	60	3,82	0,5	0,35	Resuelve
14P10cm	FM3	90/10	0,7	60	5,01	0,54	0,46	resuelve
15P10cm	FM4	80/20	0,5	60	3,38	0,5	0,26	resuelve
16P10cm	FM4	80/20	0,6	60	2,91	0,46	0,21	No resuelve
17P10cm	FM4	85/15	0,8	60	4,88	0,57	0,58	resuelve
18P10cm	FM4	85/15	0,9	60	4,28	0,48	0,49	resuelve
19P10cm	FM4	90/10	0,8	60	7,74			Mal pinchado

* código de la composición de la fase móvil indicado en la página 37

Tabla 7: Separación de picos de Heroína/acetilcodeína columna Zorbax Eclipse Plus (FM1 y FM2 gradiente, FM3 y FM4 Isocratico)

		Composición FM (tampón/ F.Organica)	flujo (mL/min)	T (°C)	T _R heroína	Ancho pico heroína	Tiempo entre máximo (min)	resuelve
1Zb	FM1	90/10	0,6	55	3,03	0,42	0,24	No resuelve
2Zb	FM1	90/10	0,8	55	2,18	0,33	0,17	No resuelve
3Zb	FM1	95/5	0,8	55	4,61	0,38	0,32	Resuelve
4Zb	FM1	95/5	1,0	55	4,31	0,22	0,30	Resuelve
5Zb	FM1	95/5	1,2	55	3,61	0,28	0,28	Resuelve

6Zb	FM1	95/5	1,5	55	3,34	0,26	0,27	Resuelve
7Zb	FM2	75/5	0,4	50	1,42			coeluyen
8Zb	FM2	75/5	0,5	50	0,91			coeluyen
9Zb	FM2	80/20	0,5	55	2,17	0,34	0,19	No resuelve
10Zb	FM2	80/20	0,6	55	1,76	0,30	0,15	No resuelve
11Zb	FM2	80/20	0,8	60	1,18	0,21	0,09	No resuelve
12Zb	FM2	85/15	0,6	55	3,39	0,69	0,43	resuelve
13Zb	FM2	85/15	0,7	55	3,10	0,38	0,37	resuelve
14Zb	FM2	85/15	0,8	60	2,01	0,35	0,22	No resuelve
15Zb	FM2	90/10	0,5	60	6,28	1,15	0,93	resuelve
16Zb	FM2	90/10	0,6	60	6,13	0,90	0,78	resuelve
17Zb	FM3	85/15	0,6	55	1,59			coeluyen
18Zb	FM3	90/10	0,6	55	3,48	0,65	0,40	No resuelve
19Zb	FM3	90/10	0,8	55	2,92	0,42	0,31	No resuelve
20Zb	FM4	50/50	0,4	55	0,74			coeluyen
21Zb	FM4	75/25	0,4	55	1,44			coeluyen
22Zb	FM4	75/25	0,6	55	1,18		0,06	Coeluyen parcialmente
23Zb	FM4	75/25	0,8	55	0,74			coeluyen
24Zb	FM4	80/20	0,5	55	2,31	0,45	0,30	No resuelve
25Zb	FM4	80/20	0,6	55	2,08	0,39	0,2	No resuelve
26Zb	FM4	80/20	0,8	55	1,39	0,25	0,13	No resuelve
27Zb	FM4	85/15	0,6	55	3,88	0,83	0,58	resuelve
28Zb	FM4	85/15	0,8	55	3,34	0,45	0,46	resuelve

* código de la composición de la fase móvil indicado en la página 37

Tabla 8: Separación de los picos de Heroína/acetilcodeína columna Poroshell 5 cm (FM1 en gradiente, resto fases isocrático)

		Composición FM (tampón/F.Organica)	flujo (mL/min)	T(°C)	T _R heroína	Ancho pico heroína	Tiempo entre máximo (min)	resuelve
1P5cm	FM1	90/10	0,6	55	2,42	0,38	0,22	No resuelve
2P5cm	FM1	90/10	0,8	55	1,73	0,25	0,13	No resuelve
3P5cm	FM1	90/10	1,0	55	1,36	0,19	0,10	No resuelve
4P5cm	FM1	95/5	0,8	55	3,80	0,37	0,29	Resuelve
5P5cm	FM1	95/5	1,0	55	3,36	0,30	0,29	Resuelve
6P5cm	FM1	95/5	1,2	55	2,96	0,28	0,23	Resuelve
7P5cm	FM1	95/5	1,5	55	2,52	0,26	0,21	resuelve
8P5cm	FM2	85/15	0,6	55	3,03	0,36	0,34	resuelve
9P5cm	FM2	85/15	0,7	55	2,49	0,33	0,29	resuelve
10P5cm	FM2	90/10	0,6	55	7,17	1,00	1,29	resuelve
11P5cm	FM2	90/10	0,8	55	6,25	0,93	1,1	resuelve
12P5cm	FM3	70/30	0,8	55	0,30			coeluyen
13P5cm	FM3	80/20	0,5	55	0,65			coeluyen
14P5cm	FM3	88/20	0,8	55	0,41			coeluyen
15P5cm	FM3	85/15	0,5	55	1,42			coeluyen
16P5cm	FM3	85/15	0,8	55	0,72			coeluyen
17P5cm	FM3	90/10	0,6	55	2,99	0,50	0,27	No resuelve
18P5cm	FM3	90/10	0,8	55	2,11	0,56	0,22	No resuelve
19P5cm	FM4	80/20	0,5	55	1,87	0,30	0,16	No resuelve

20P5cm	FM4	80/20	0,6	55	1,49		0,13	Coeluyen parcialmente
21P5cm	FM4	85/15	0,6	55	3,05	0,60	0,42	resuelve
22P5cm	FM4	85/15	0,8	55	2,48	0,45	0,31	resuelve

* código de la composición de la fase móvil indicado en la página 37

Para una mejor y más visual comprensión de las pruebas realizadas, se muestran en la figuras 18, 19 y 20 los cromatogramas de algunas de las experiencias anteriores para las diferentes columnas y fases móviles empleadas.

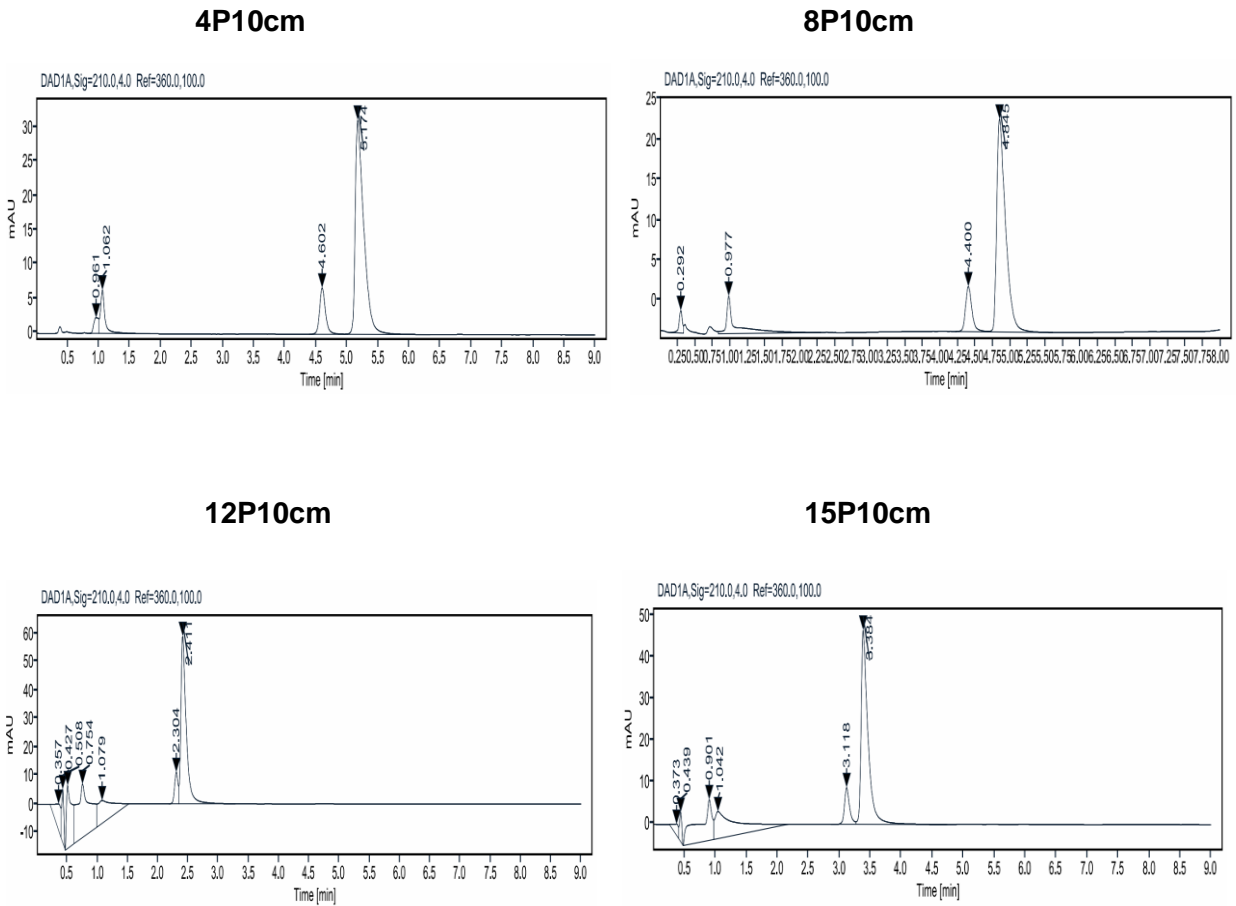


Figura 18: Cromatogramas obtenidos empleando la columna Poroshell 10 cm

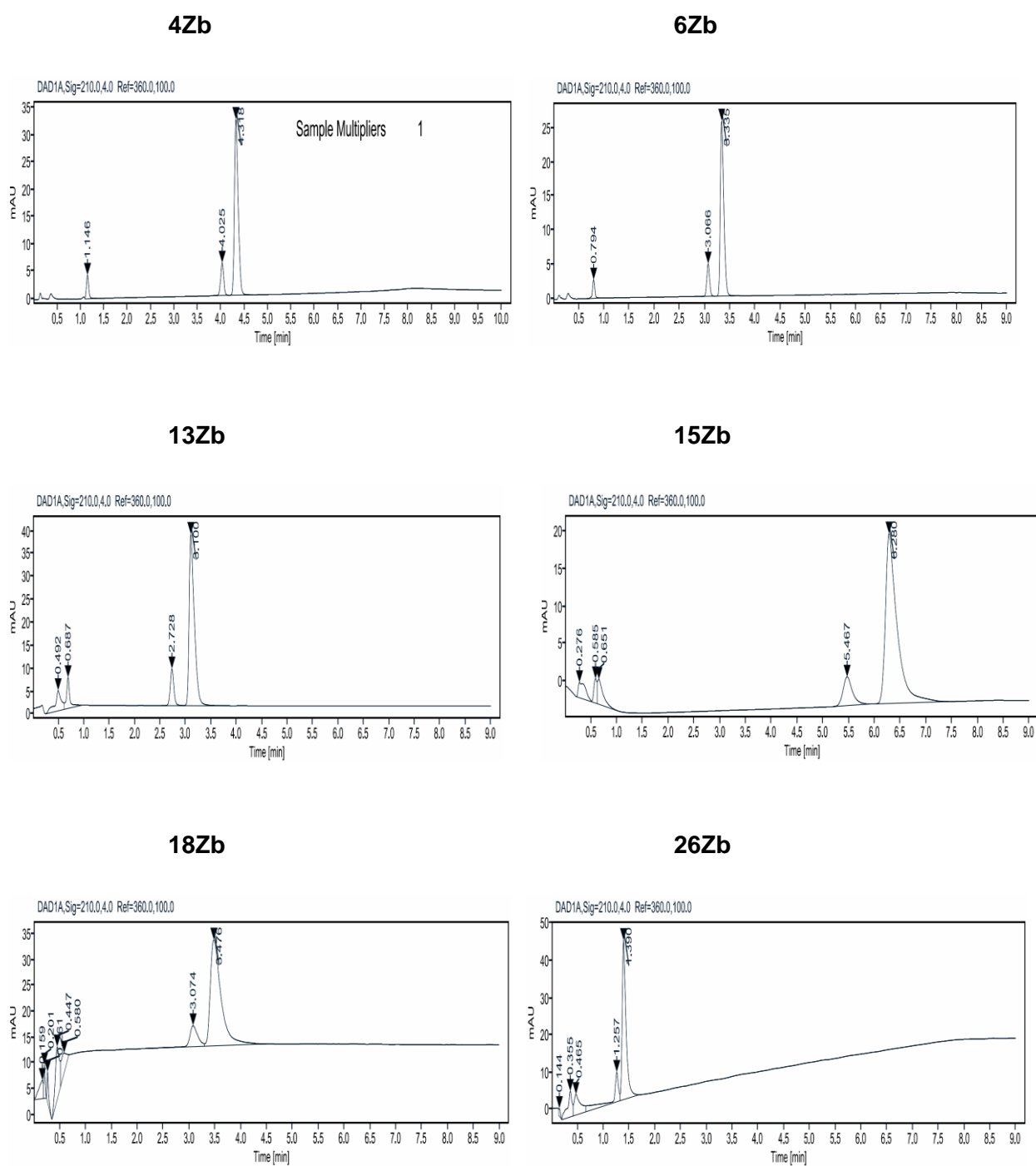


Figura 19: Cromatogramas obtenidos empleando la columna Zorbax Eclipse Plus

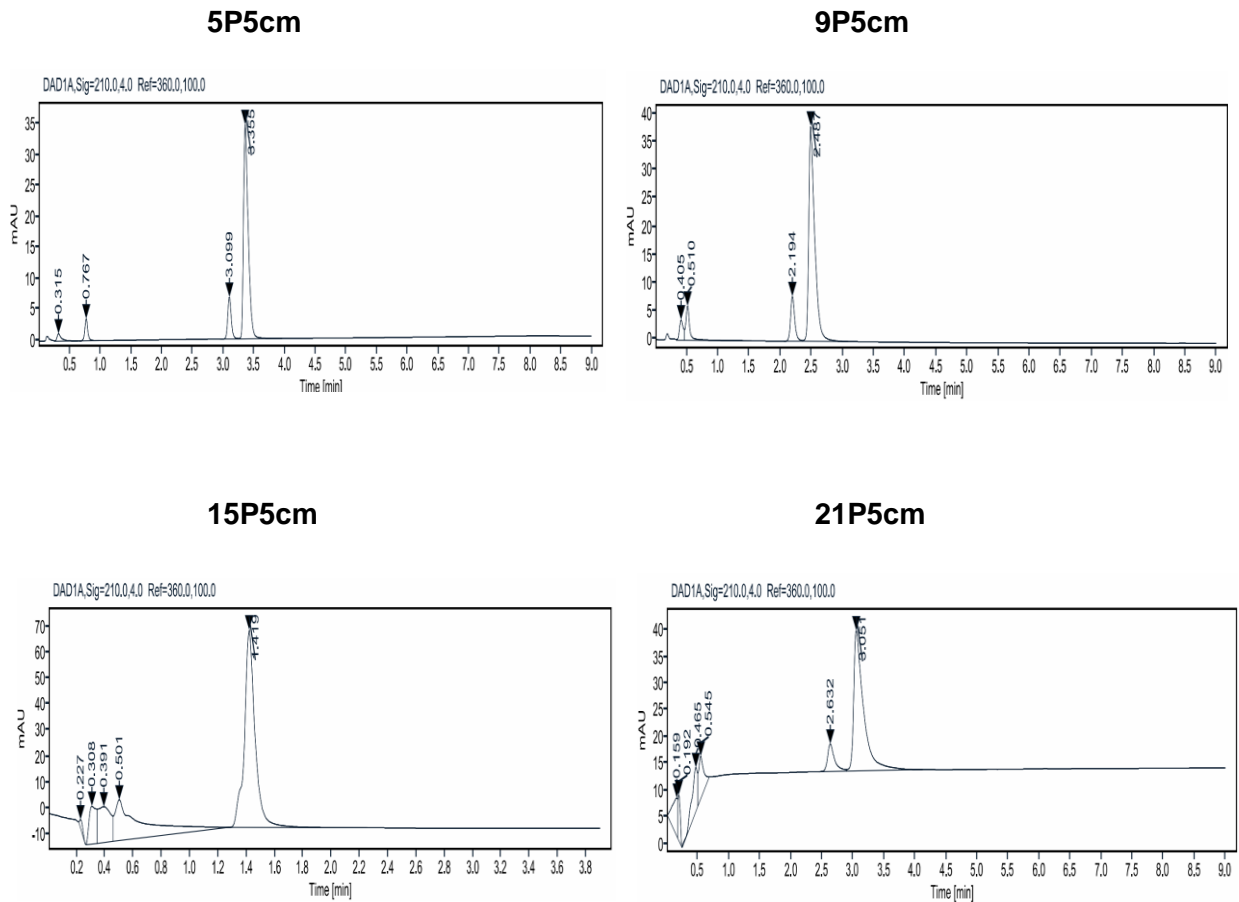


Figura 20: Cromatogramas obtenidos empleando la columna Poroshell 5cm

Como ya se ha indicado en varias ocasiones, a la hora de seleccionar las experiencias a realizar se tiene en cuenta la disponibilidad de los reactivos y materiales en el laboratorio, de manera que no suponga un gasto adicional excesivo, al trabajo habitual del mismo.

A la vista de los resultados obtenidos se deduce que las condiciones óptimas se tiene para los siguientes parámetros:

- El tiempo del método empleado en todas las experiencias son 9 minutos para la elución y 2 minutos de post-run.
- La temperatura de trabajo en el método de rutina es de 42°, en este caso trabajaremos por encima de 50° siempre con objeto de aumentar la fluidez de la fase móvil y reducir así la presión. La columna de 10 cm evidentemente da mayores presiones, su longitud es el doble por lo que en este caso la temperatura de trabajo será aún mayor que en el caso de las de 5cm.

- Por el mismo motivo también los flujos de trabajo serán más bajos en la columna de 10 cm, a flujos inferiores obtenemos presiones inferiores. Además dicha columna, permite una mayor separación de los picos a menores flujos pues es el doble.
- En cuanto al gradiente utilizado se deduce que en la columna Poroshell de 10 cm la elución se realiza en isocrático, esto queda debidamente justificado por la longitud de la misma, que amplía el intervalo de separación entre los diversos analitos. En las columnas de 5 cm se realiza previamente una prueba en cada columna y fase móvil para decidir si las experiencias se realizan en gradiente o en isocrático. En aquellas pruebas en las que la heroína y acetilcodeína y los adulterantes (dextrometorfano, fentanilo y fentaniloides) presenten mayor tiempo de retención, se pierde la ventaja de la reducción del tiempo con respecto al método actual, por lo que se decide aplicar un gradiente con objeto de adelantar dichos tiempos. Dicho gradiente es el resultante de llegar desde las condiciones iniciales de concentración, indicadas en la tabla para cada experiencia, hasta llegar a una concentración de 85/15 (tampón/fase orgánica), que son las condiciones del método actual a mejorar, que se mantienen hasta el final de la elución, recuperando las condiciones iniciales durante el postrun.

En la Figura 21 se comparan dos cromatogramas de la misma experiencia con y sin gradiente, en éste último se observa tanto un ensanchamiento en los picos como un aumento en los tiempos de retención del cromatograma.

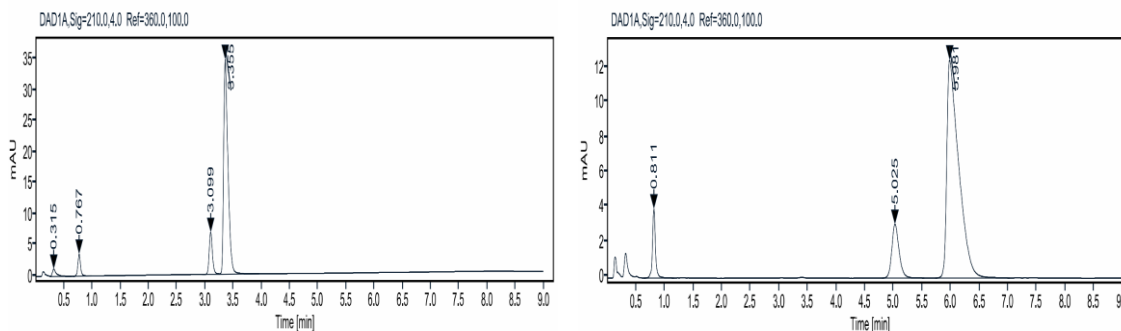


Figura 21: Poroshell 5cm 95T/5ACN 1mL con gradiente y sin gradiente.

- Los parámetros a valorar son, el tiempo de retención de la heroína (10,8 min en HPLC con el método de referencia el ancho de la base del pico (W) (el menor posible), la diferencia entre los tiempos de retención de la heroína y de la acetilcolina (que debe ser lo más grande posible) y la capacidad de resolución entre ambas sustancias en las condiciones del ensayo, que viene dada por la fórmula: $R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_2 + w_1}$, donde t_2 y t_1 corresponden al tiempo de retención y al ancho de la base del pico de la heroína y de la acetilcodeína respectivamente.

Además, respecto a la columna, a tenor de los datos obtenidos, en las tablas y cromatogramas mostrados anteriormente podemos deducir que:

- Para la columna Poroshell de 10 cm ninguna de las experiencias se consideran óptimas. Los tiempos de retención de la heroína en muchos casos han disminuido respecto al método de referencia entre el 55 y el 60%. El ancho de pico de la heroína en la gran mayoría está por encima de 0,35 minutos (21 segundos), que es el valor que pretendemos como máximo. Aunque la separación entre la heroína y la acetilcodeína en varias experiencias es buena, si tenemos en cuenta todos los factores obtenemos el resultado ya indicado.
- Además en esta columna la presión es muy alta, en algunos casos superior a 1000 bares incluso llegando a alcanzar los 1100 bares en algunas ocasiones, un valor muy próximo al límite operativo de columnas y equipo, lo que obliga a trabajar en varios casos a 60 grados también en este caso un valor muy cerca del límite de temperatura de las columnas. Aunque el método que estemos usando sea UPLC, esto no justifica trabajar a esos valores de presión, ya que tenemos experiencias que nos muestran que se puede trabajar a valores menores de presión en UPLC. Todo lo indicado es fácilmente justificable por la longitud de la columna.
- Con respecto a las columnas de 5 cm, tanto la Zorbax como la Poroshell presentan en general un comportamiento análogo con todas las fase móviles, si bien la Poroshell presenta tiempos de retención algo menores que la Zorbax, esta última separa más los picos de heroína y acetilcodeína, es decir, resuelve más. El hecho de que los tiempo de retención sean menores no es necesariamente una ventaja, por lo que aunque estén en verde en la tabla, a partir de una mejora del 55 ó 60% con respecto al método de partida, tiempos de retención por debajo de 3 minutos podríamos considerar que no permiten discernir adecuadamente los adulterantes y demás sustancias que acompañan a la heroína, lo cual en un momento dado podría dificultar un posible *profiling*, y tiempos aún más cortos la pérdida de diversos analitos. En estas columnas, en las experiencias con fases móviles 3 y 4, se observa, además del comportamiento ya descrito antes un marcado ensanchamiento de los picos y la tendencia a aparecer colas en los mismos. Esta tendencia a la aparición de colas también se da en la fase móvil 2 pero de una manera mucho menos acusada.
- Con respecto a la comparación entre las fases con la misma fase orgánica pero diferente tampón, FM1 comparada con FM3 y FM2 con FM4, lo que podría ser la influencia del pH, observamos que las fases con tampón fosfato, pH más ácido, (FM1 y FM2) dan picos más finos y con un tiempo de retención algo menor respecto a su

análoga con tampón formiato. Las sustancias objeto del presente documento son alcaloides, por tanto a pH ácido serán más hidrosolubles, estarán más polarizadas y por tanto eluirán antes, lo cual justifica el comportamiento antes descrito con respecto al pH.

Con todo lo indicado realizamos la tabla 9 con las mejores experiencias.

En la tabla 9 se resume con las condiciones óptimas obtenidas tras los estudios realizados.

Tabla 9: Condiciones cromatográficas óptimas

		Composición FM (tampón/F.Or ganica)	flujo (mL/min)	T(°C)	T _R heroína	Ancho pico heroína	Tiempo entre máximo (min)	resuelve
4Zb	FM1	95/5	1,0	55	4,31	0,22	0,30	Resuelve
5Zb	FM1	95/5	1,2	55	3,61	0,28	0,28	Resuelve
6Zb	FM1	95/5	1,5	55	3,34	0,26	0,27	Resuelve
5P5cm	FM1	95/5	1,0	55	3,36	0,30	0,29	Resuelve
9P5cm	FM2	85/15	0,7	55	2,49	0,33	0,29	resuelve

Finalmente, a la vista de los datos de la tabla resumen anterior se deduce que la metodología y condiciones utilizadas en la experimentación 4Zb es la óptima. A pesar de presentar el tiempo de retención más alto en todos los ensayos, éste es muy bajo en relación al método de referencia utilizado (10,7 min) y supone una ostensible mejora

La experiencia 9P5cm es la peor de las seleccionadas, y la 5Zb y 6Zb aun siendo también buenas no mejoran las condiciones de la columna seleccionada, además, a un flujo mayor, los que aumenta la presión.

La 5P5cm se valora pues también presenta buenos resultados y la columna Poroshell da menores presiones que la Zorbax, a igualdad de longitud, sin embargo, la diferencia de presión se encuentra en los 75 bares y estamos trabajando en torno a 675 bares, lejos del límite de operatividad. Además, la menor anchura de pico hace mas adecuada la Zorbax.

Para corroborar estos hechos se pasó un patrón de heroína de un 41,3% repitiendo ambas experiencias para comprobar que no se satura el detector y comprobar los anchos de pico. Los resultados se muestran en la figura 22.

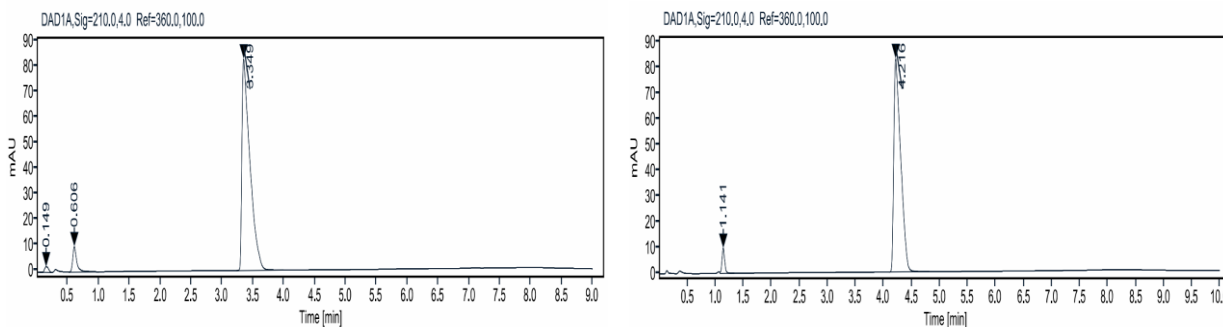


Figura 22. Cromatogramas de patrón de heroína de concentración alta 5P5Cm y 4Zb

Observando la figura queda patente que el detector no se satura y que el ancho de pico es algo menor en la columna Zorbax, 0,36 frente a 0,42, se reafirma pues la elección de la experiencia 4Zb como óptima.

Por tanto el método elegido es el correspondiente a la experiencia 4Zb, cuyas características y condiciones óptimas son las siguientes:

- Columna Zorbax eclipse plus
- FM: Tampón fosfato/acetonitrilo en gradiente de 95/5 a t=0 hasta 85/15 a t=7,5
- Volumen de inyección 0,5 μ l
- Flujo: 1mL/min
- Temperatura 55°
- Tiempo total 12 minutos: 10 de elución y 2 de post-run.

Se decide ampliar el tiempo de elución 1 min para poder resolver los adulterantes que salen más tarde, el fentanilo y los posibles fentaniloides.

- La presión máxima que se alcanza es de 660 bares. Oscila entre 610 y 660 bares debido al gradiente aplicado.

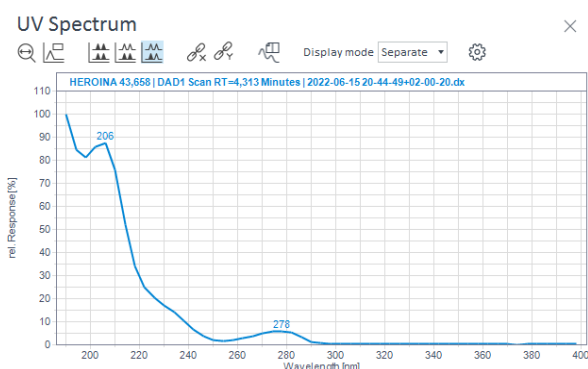
Por ultimo una vez seleccionado el método de optimización, se procede a pasar con el mismo método patrones de los adulterantes y acompañantes, productos de degradación más habituales de la heroína. También, por motivos que se indicarán más adelante, se pasa también patrones de cocaína y sus correspondientes adulterantes más comunes. Se procede a determinar los tiempos de retención de dichas sustancias en el método, así como sus correspondientes espectros de UV, con objeto de conseguir una identificación de los compuestos. En la tabla 10 se muestran los correspondientes tiempos de retención.

Tabla 10. Tiempos de retención de las sustancias ensayadas.

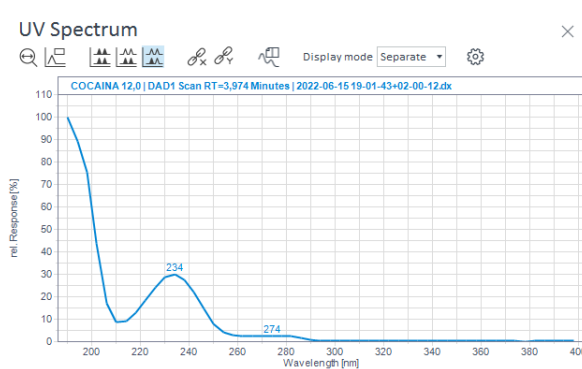
analito	heroína	morfina	6-MAM	Codeína	Acetilcodeína	Paracetamol	Cafeína	Dexametorfano	Fentanilo	Noscapina	Papaverina	Cocaína	Tetracaína	Procaína	Lidocaína	Levamisol	Fenacetina
T _R	4,35	0,24	1,09	0,66	4,04	0,39	1,05	8,15	9,05	6,69	6,82	3,97	3,78	0,3	1,68	0,76	3,86

Si observamos los datos de la tabla, nos damos cuenta que a pesar de haber algunas sustancias que llegan a estar muy próximas y coeluir, lo cual es justificable por la corta longitud de la columna y las condiciones del método, no hay ninguna sustancia que interfiera en la determinación de la heroína. Igualmente se ve que aun en las muestras con cocaína y heroína que pueden representar en torno a un 10%, la primera no interfiere en la determinación de la segunda y no sería necesario la puesta a punto de un método distinto para su cuantificación.

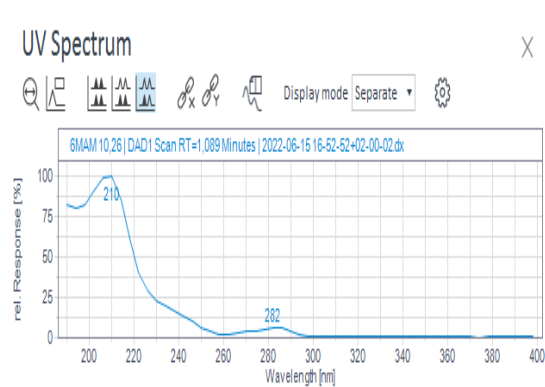
En la figura 23 podemos ver los espectros ultravioletas de las citadas sustancias



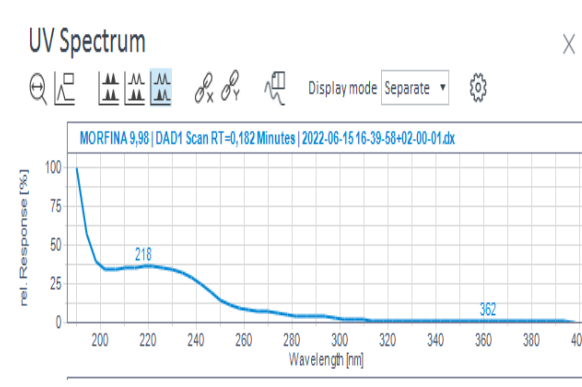
(1) Heroína



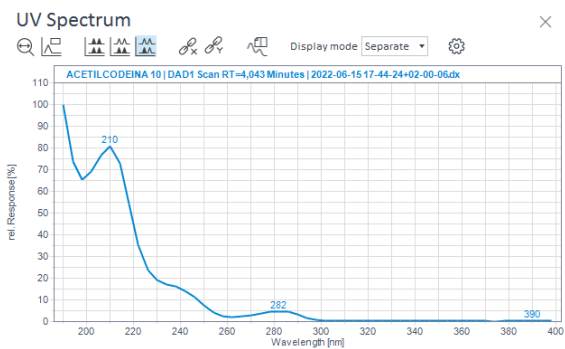
(2) Cocaína



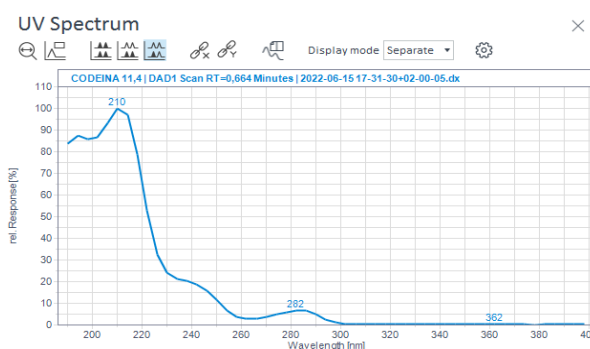
(3) 6-MAM



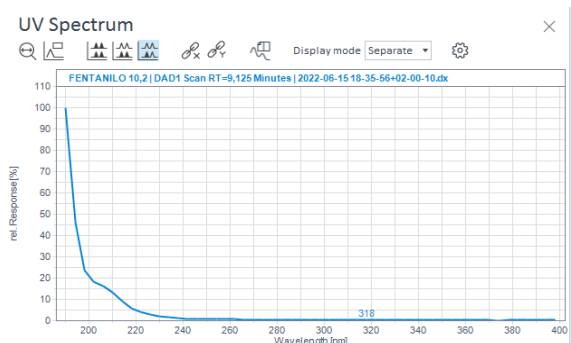
(4) Morfina



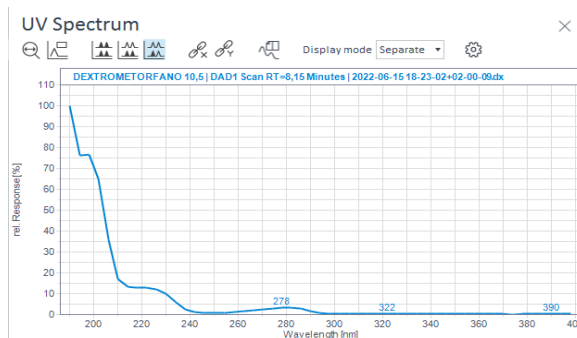
(5) Acetilcodeína



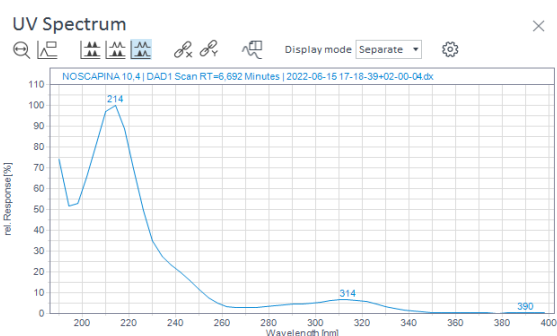
(6) Codeína



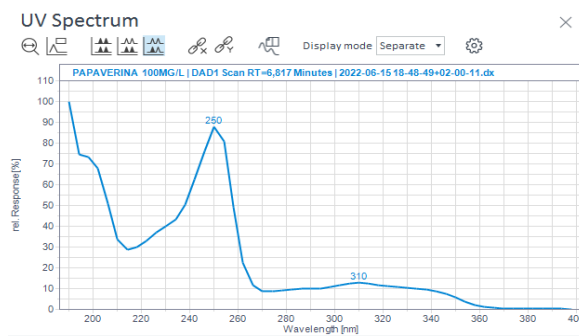
(7) Fentanilo



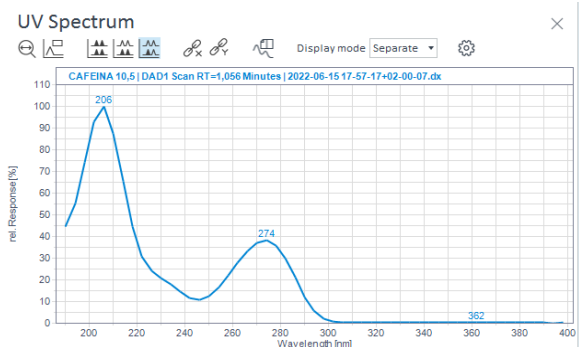
(8) Dextrometorfano



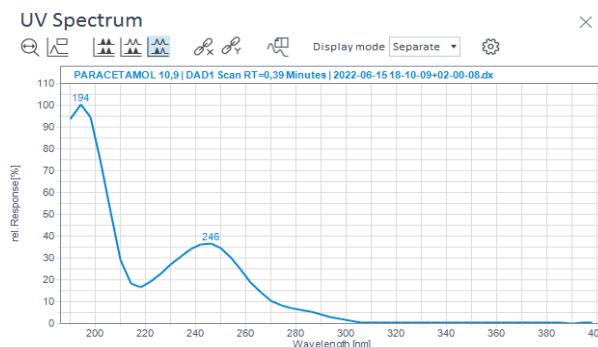
(9) Noscapiña



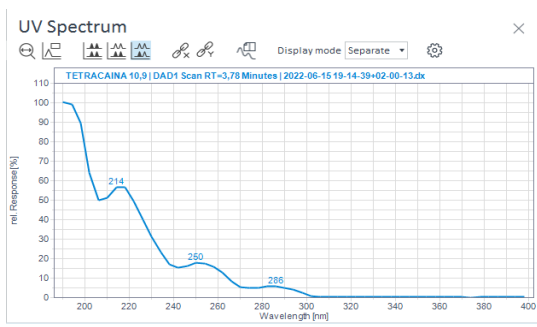
(10) Papaverina



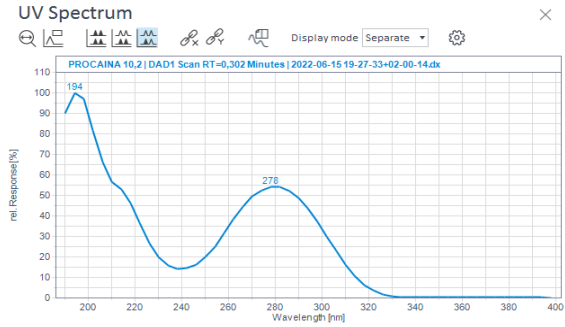
(11) Cafeína



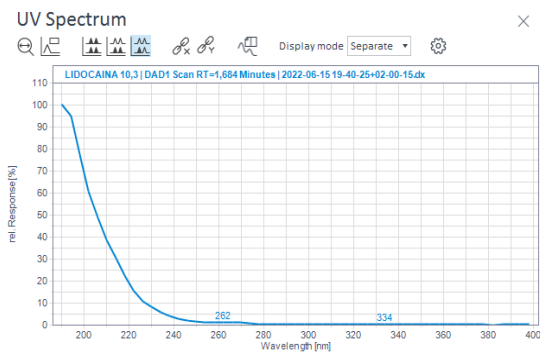
(12) Paracetamol



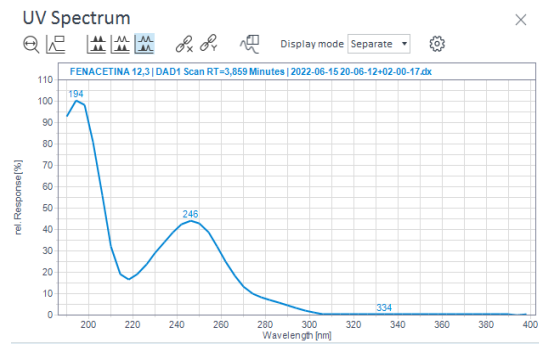
(13) Tetracaína



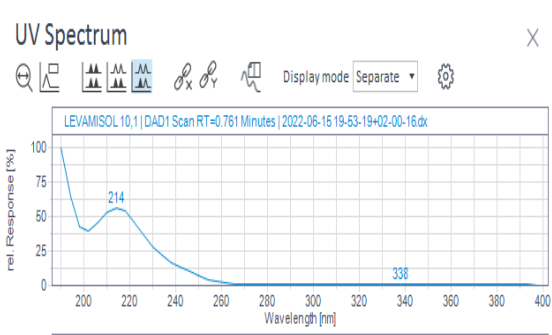
(14) Procaína



(15) Lidocaína



(16) Fenacetina



(17) Levamisol

Figura 23. Espectros UV-Visible obtenidos para las sustancias interferentes de la heroína mostradas en la tabla 10.

8.4.1 Selectividad/especificidad

Dado que el objetivo del trabajo es poner a punto una metodología UPLC que nos permita cuantificar heroína partiendo de un método HPLC validado y acreditado, que actualmente está en uso en el INTCF.

Entre los valores que debemos tener en cuenta y los límites que se nos exigen para dar por válida la metodología están:

- *Selectividad o factor de separación* que se calcula a partir de α , tal como vemos en la figura 24, y que en nuestro caso debe ser $1 < \alpha < 2$.

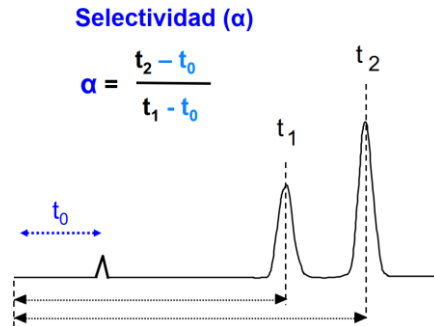


Figura 24. Factor de separación o selectividad

- *Resolución*: deberá ser mayor o igual a 1,5. Se calcula con la fórmula de la figura 25.

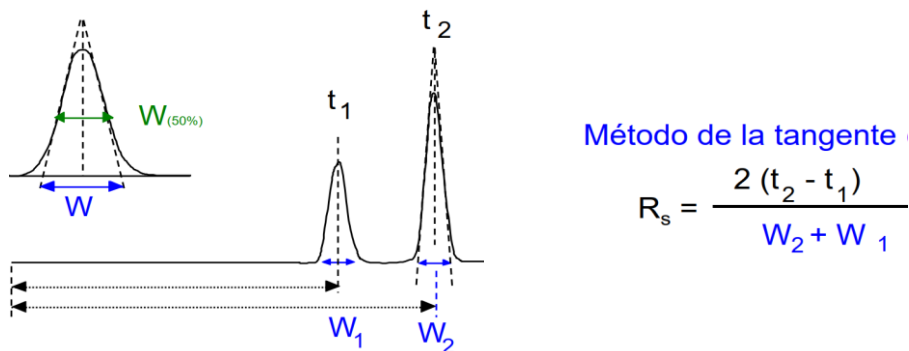


Figura 25. Resolución

Para poder cuantificar será necesario que el valor de R_s sea mayor a 1,5. Valores inferiores de R_s pero con $\alpha > 1$ permite la identificación pero no la cuantificación.

Debemos observar que estos valores se obtienen entre dos picos consecutivos. En nuestro caso la heroína, que es la que eluye después respecto a la acetilcodeína que eluye antes.

Concretamente en nuestro método los valores obtenidos son $\alpha = 1,1$ y $R_s = 2,2$, tal como vemos en la figura 26.

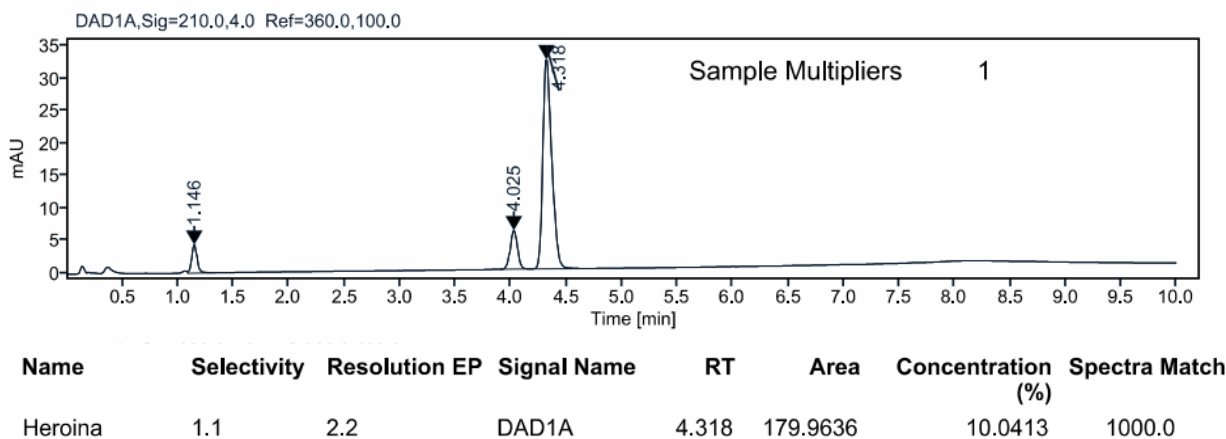


Figura 26. Cromatograma de heroína con selectividad y resolución

8.4.2 Características analíticas del método UPLC

Es importante establecer las características analíticas del método recién optimizado de UPLC. Para ello se calculan los siguientes parámetros:

- Recta de calibrado
- Límite de detección y cuantificación
- Precisión
- Exactitud

Se prepara una recta de calibrado con las concentraciones de heroína indicadas en los apartados anteriores con objeto de cuantificar el analito. El proceso es el siguiente:

- Se inyectara en el cromatógrafo patrones de las concentraciones preparadas al efecto según el punto 8.3.2.
- Se representa la concentración teórica frente al área, ajustando la recta ($y= mx + n$) por mínimos cuadrados.
- De todos los medidas se realizan 5 réplicas para calcular la desviación estándar (SD) y el % del coeficiente de variación (%CV)
- El coeficiente de variación del factor respuesta (concentración teórica del patrón/área del mismo) no debe superar el 5%.
- La diferencia, en términos de exactitud, entre la concentración teórica preparada y la real calculada no debe exceder los límites establecidos a partir de un histórico de rectas. Un 10% para la concentración de aproximadamente un 1mg/100mL, 5% para las dos siguientes concentraciones y un 2% para las de mayor concentración.

En las siguientes tablas 11 y 12 y en la figura 27 se recogen los datos indicados anteriormente, de las experiencias realizadas para la elaboración de la recta de calibrado y establecimiento de los parámetros analíticos.

Tabla 11. Sensibilidad, precisión

Concent. del Patrón (x)	Área de Patrón (y)	Sensibilidad (factor respuesta)
0,624	11,4840	0,054336
1,248	22,1412	0,056366
3,121	55,0275	0,056717
6,242	108,2970	0,057638
12,484	222,3102	0,056156
24,968	454,6880	0,054912
43,693	775,7174	0,056326
media FR		0,056064

Tabla 12. Exactitud

ESTUDIO DE EXACTITUD			
conc preparada	conc calculada	Dif en %	
0,624	0,640	-2,534	
1,248	1,237	0,900	CORRECTO
3,121	3,079	1,350	CORRECTO
6,242	6,063	2,873	CORRECTO
12,484	12,449	0,280	CORRECTO
24,968	25,465	-1,992	CORRECTO
43,693	43,447	0,562	CORRECTO

CV% FR 2,0% CORRECTO

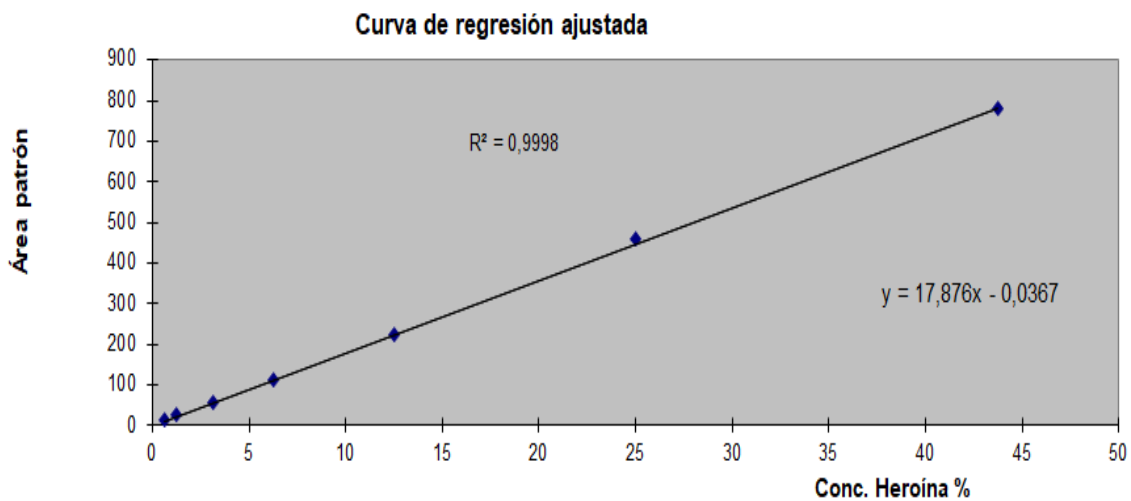


Figura 27: Recta de calibrado

- El límite de cuantificación debe ser el más bajo que permita el método. Analíticamente se calcula⁵³: $LC = \frac{10Sb}{pendiente\ curva\ calibracion}$

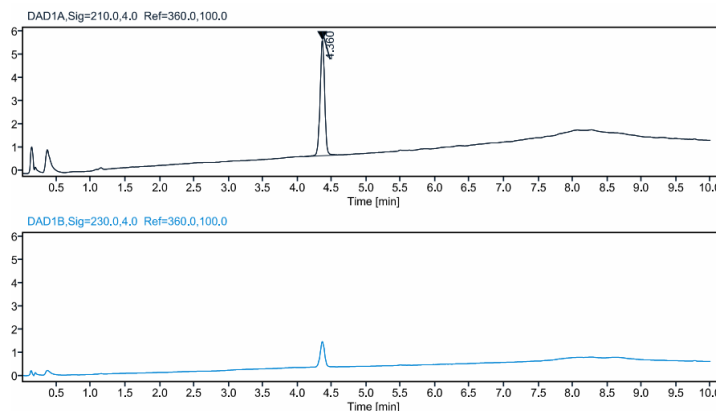
Además en nuestro caso y siguiendo los procedimientos establecidos en el INTCF, debe de estar por debajo del actual método establecido (3,5%). Para su estudio se empleará un patrón de baja concentración de heroína, 3,5% o menos, se ensayará no menos de 5 veces, no pudiendo diferir el resultado de las repeticiones más de un 20%.

La siguiente tabla 13 muestra los distintos ensayos para validar el límite de cuantificación, así como una de las experiencias realizadas en la imagen adyacente.

Tabla 13: Ensayos para validar el límite de cuantificación.

	% heroína	Dif. en %
1	1,234	3,2
2	1,195	0,0
3	1,183	1,1
4	1,182	1,1
5	1,182	1,1
Media	1,195	0,0

Figura 28. Cromatograma de la heroína



Time	Signal Name	RT	Area	Concentration (%)	Spectra Match
4.360	heroína	4.360	22.8630	1.2335	999.8

El valor de la concentración preparada de heroína es 1,179%, se ve claramente que cumple con los requisitos antes indicados, siendo además un resultado muy reproducible.

8.5 COMPARACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE LOS MÉTODOS DE HPLC vs UPLC

Para llevar a cabo la comparación del método de referencia de HPLC, que ha servido como métodos de partida para poner a punto el nuevo métodos UPLC desarrollado y optimizado en el presente trabajo, se realizó un estudio comparativo de 10 muestras reales, correspondientes a alijos decomisados, que se elegirán al azar de entre todas aquellas que llegan al INTCF.

Ambos métodos son métodos de separación y de cuantificación de heroína, por lo que previamente a la cuantificación por el correspondiente método HPLC y su comparativa con el de UPLC, se realizara un screening previo de las muestras mediante la técnica GC-MS. Aquellas muestras que contengan heroína serán las susceptibles de ser analizadas por este método. El resto de muestras que no contengan el analito en cuestión serán analizadas por otros métodos, fuera del objeto de estudio de este documento.

Las muestras a analizar son muestras reales con el perfil de analito objetivo y adulterantes que desconocemos hasta el análisis cualitativo previo por GC-MS, que posteriormente cuantificaremos por nuestro método.

Cabe valorar que si bien el objeto principal del método es la cuantificación de heroína, el método se ha optimizado de manera que seamos capaces de discernir también gran parte de las sustancias acompañantes, tanto adulterantes como provenientes de la degradación de la heroína. Además, de manera teórica, se ha visto que también en el caso que la heroína puede venir mezclada con cocaína, lo cual ocurre con cierta frecuencia, el método seguiría siendo válido para cuantificar la heroína sin mayores complicaciones, lo cual trataremos de comprobar con algunas muestras donde vengan mezcladas ambas drogas.

Por otro lado, la exactitud del método también podrá ser comprobada con los datos de concentración obtenidos por el método de rutina con los del método de estudio. El valor obtenido por UPLC deberá estar incluido en la incertidumbre del valor reportado por el método acreditado.

A continuación, se muestra en la tabla 14 el porcentaje de heroína usando el método optimizado vs el método actual en uso, así como los adulterantes y acompañantes que también se detectan. Podemos observar la similitud entre UPLC y HPLC a nivel del porcentaje de heroína calculado, así como la detección de acompañantes adulterantes y demás, como objetivo secundario.

Tabla 14. Comparativa de:

muestra	UPLC y HPLC		Cumple exactitud	Adulterantes GC-MS y UPLC	
	% heroína hplc (informado)	% heroína uplc		Adulterantes detectados CG-MS	Adulterantes detectados por UPLC
1	32,4± 1,5	31,6± 1,5	✓	Paracetamol Cafeína Noscapina Acetilcodeína	Paracetamol Cafeína Noscapina Acetilcodeína
2	10,7± 1,0	10,7± 0,9	✓	Acetilcodeína Cafeína fentanilo 6MAM	Acetilcodeína Cafeína fentanilo 6MAM
3	21,2± 1,1	20,6± 0,9	✓	Paracetamol Cafeína 6-MAM noscapina acetilcodeína	Paracetamol Cafeína/6-MAM (coeluyen) noscapina acetilcodeína
4	9,0± 0,9	8,80± 1,0	✓	Cafeína Paracetamol Acetilcodeína noscapina	Cafeína Paracetamol Actilcodeína noscapina
5	32,9± 1,5	32,0± 1,1	✓	Paracetamol Cafeína 6-MAM acetilcodeína noscapina	Paracetamol Cafeína/6-MAM (coeluyen) Acetilcodeína Noscapina
6	16,6± 1,2	16,2± 1,3	✓	Paracetamol Cafeína Acetilcodeína Noscapina	Paracetamol Cafeína Acetilcodeína Noscapina
7	12,6± 1,0	12,6± 1,1	✓	Paracetamol Cafeína Nospina	Paracetamol Cafeína Noscapina

8	31,8± 1,6	30,1± 1,2	X	Paracetamol Cafeína Acetilcodeína Noscapina 6-MAM	Paracetamol Cafeína Acetilcodeína Noscapina 6-MAM
9	3,8± 0,9	3,4± 1,2	✓	Paracetamol Cafeína 6-MAM Acetilcodeína	Paracetamol Cafeína/6-MAM (coeluyen) Noscapina
10	19,2± 1,2	19,3± 0,7	✓	Paracetamol Cafeína Acetilcodeína noscapina	Paracetamol Cafeína Acetilcodeína Noscapina
11	4,4± 1,2	3,8± 1,3	✓	Paracetamol Fenacetina Cocaína Cafeína 6-MAM	Paracetamol Fenacetina/cocaína (coeluyen) Noscapina Cafeína 6-MAM
12	13,5± 1,0	13,3± 0,6	✓	Paracetamol Cafeína 6-MAM Acetilcodeína Noscapina Fentanilo Ibuprofeno AC. salicilico	Paracetamol Cafeína 6-MAM Acetilcodeína Noscapina Fenanilo

En las siguientes imágenes se muestran comparativas de cromatogramas entre las diversas técnicas empleadas:

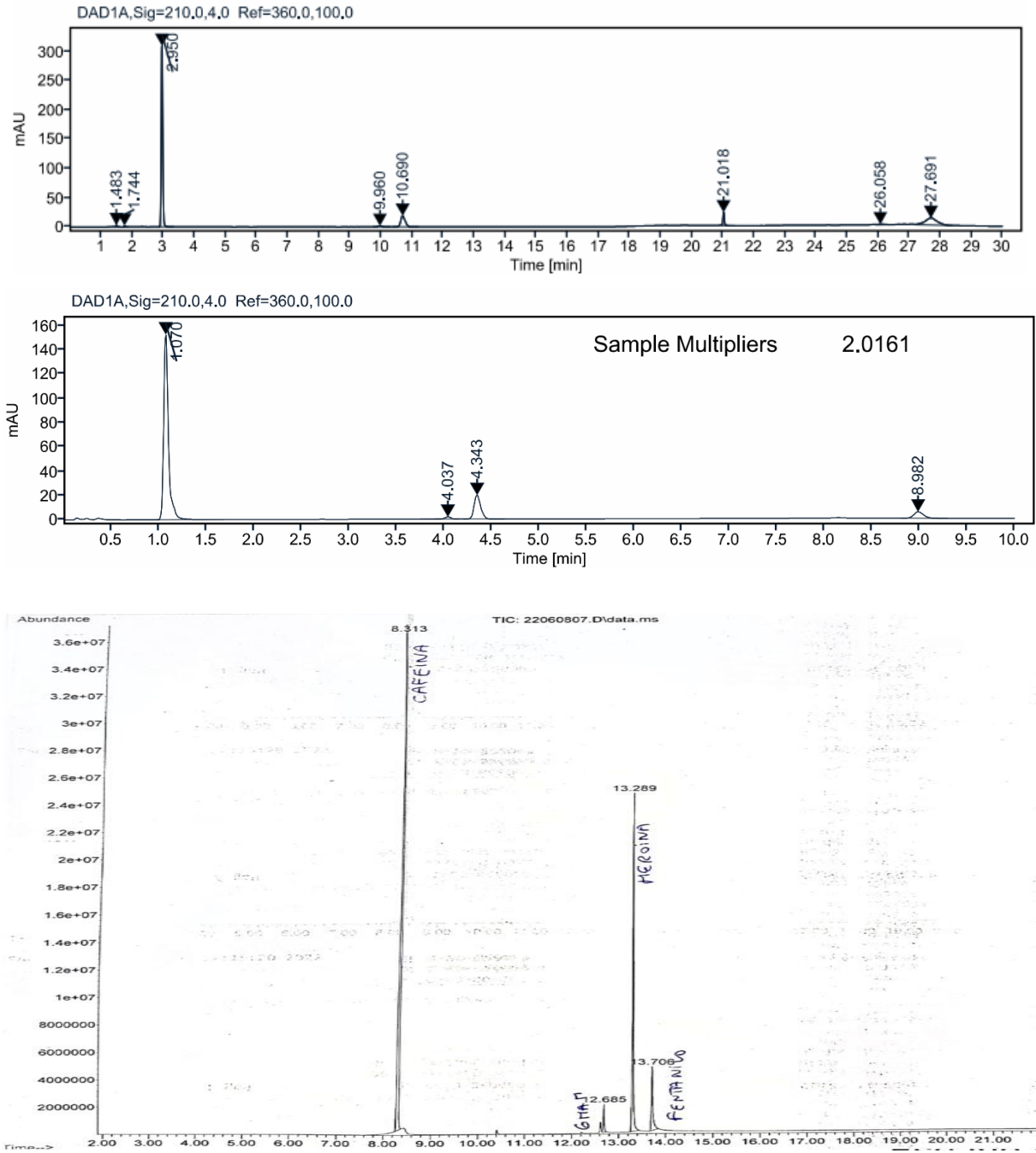


Figura 29: Cromatogramas de la muestra 2 por HPLC, UPLC y GC, respectivamente.

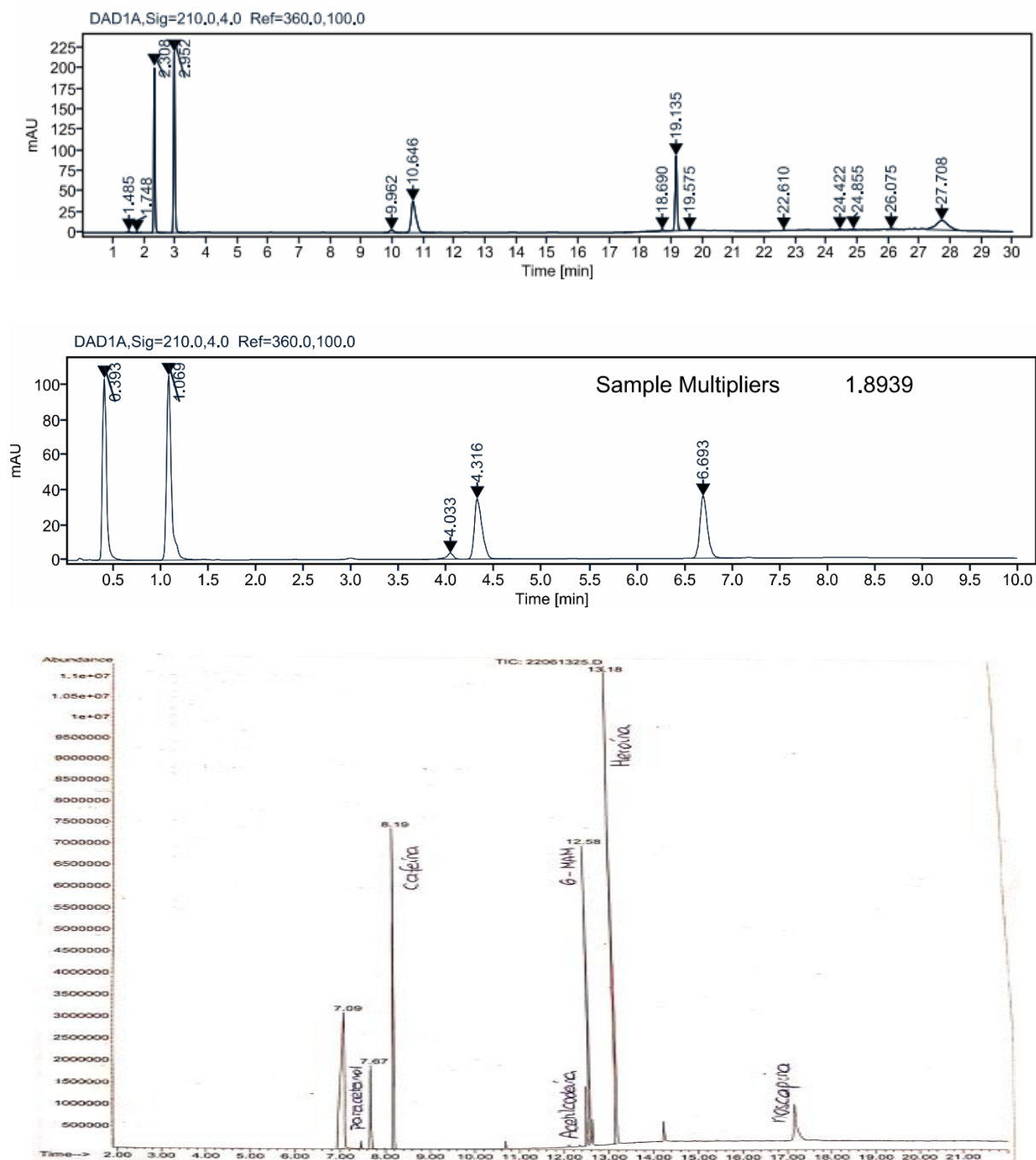


Figura 30: Cromatogramas de la muestra 3 por HPLC, UPLC y GC, respectivamente.

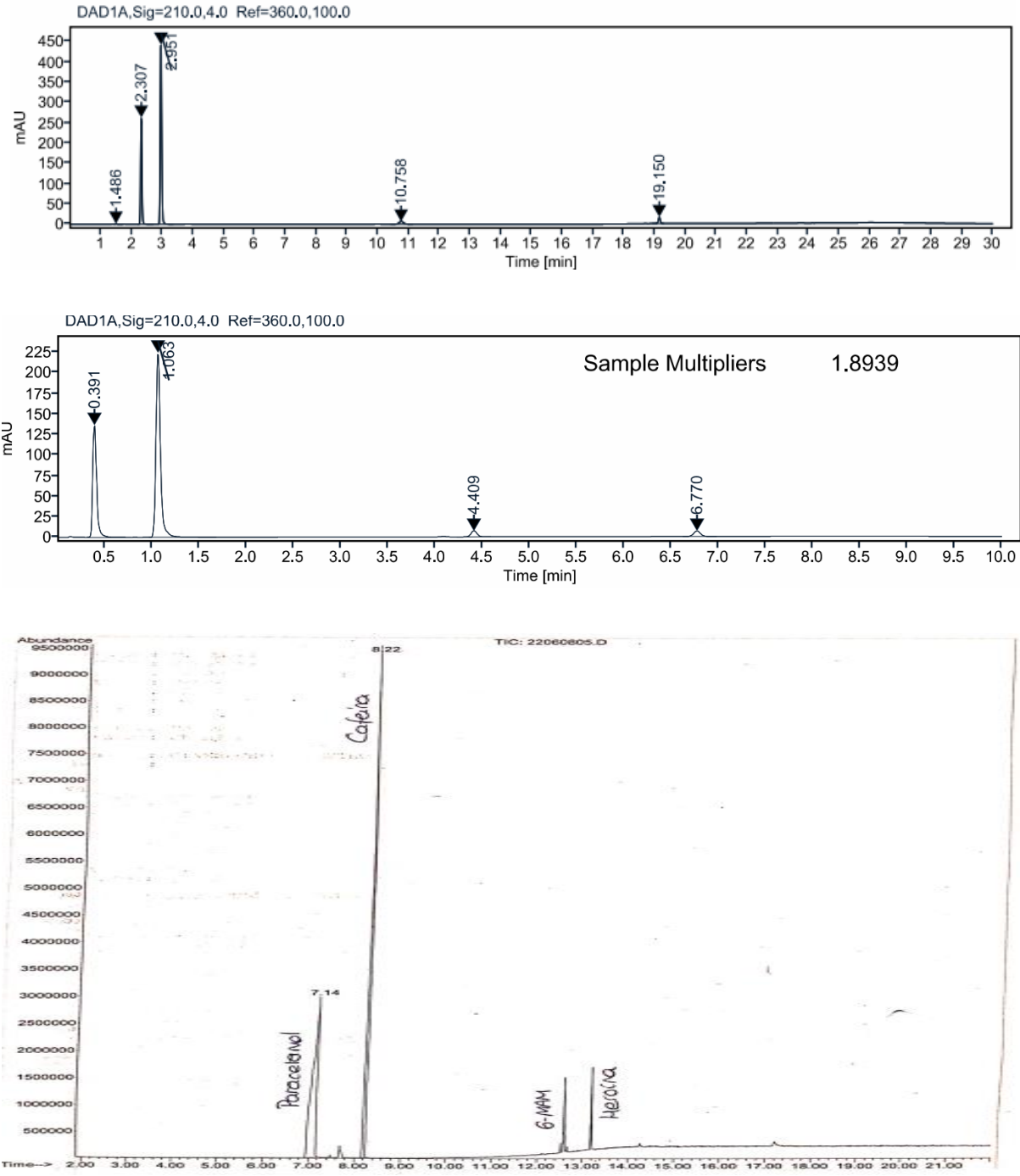


Figura 31: Cromatogramas de la muestra 9 por HPLC, UPLC y GC, respectivamente.

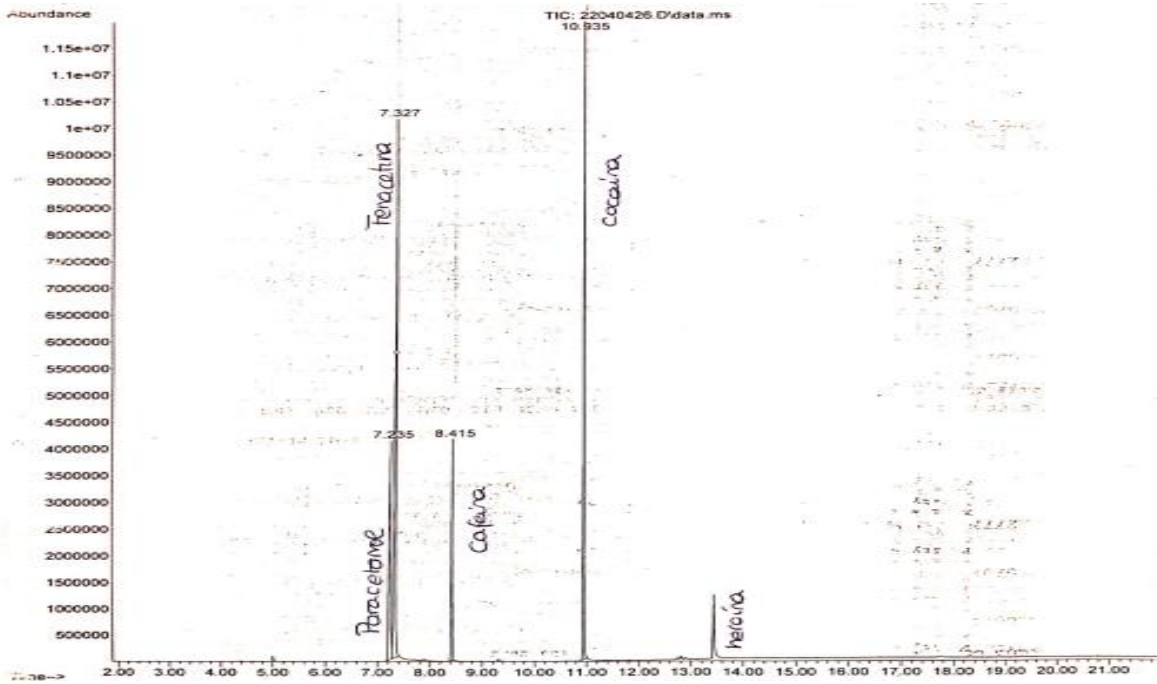
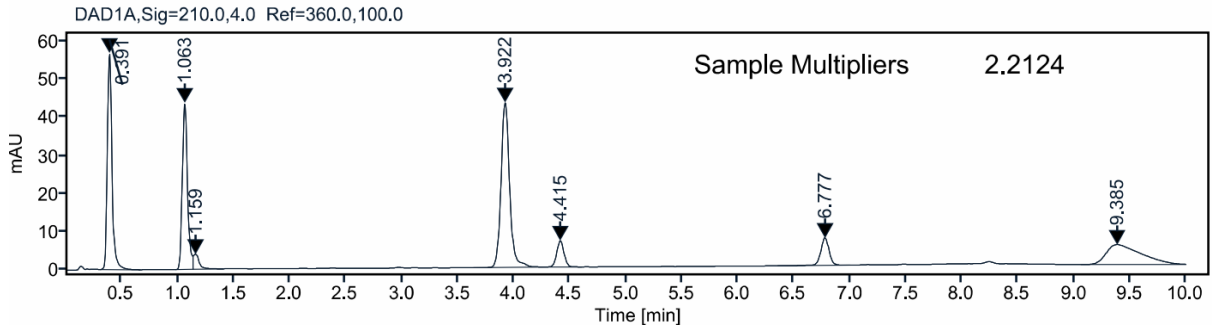


Figura 32: Cromatogramas de la muestra 11 (cocaína/heroína) por UPLC y CG respectivamente

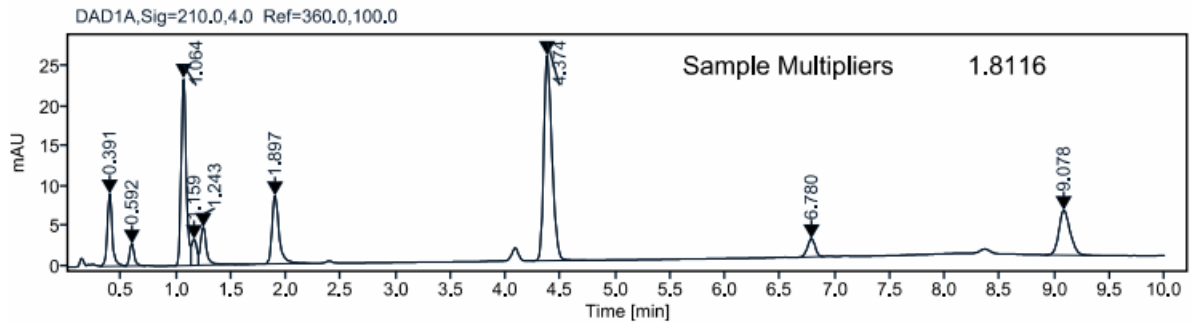


Figura 33: Cromatogramas UPLC muestra 12 (picos no identificados)

Se observa que la única muestra que no presenta exactitud es la muestra 8. El motivo puede deberse a múltiples causas, desde técnicas, hasta operativas. La muestra 11 tiene cocaína y heroína no interfiriendo la primera en la determinación de la segunda, tal como esperábamos. Se observa la aparición de fentanilo en algunas muestras, 2 y 12, lo cual como ya indicamos en la parte teórica puede suponer un grave problema de salud pública. En la muestra 12 se detectan, además, por GC-MS ácido salicílico e ibuprofeno, no estando fichados en nuestro método, pero aparecen picos a 1,9 y 1,2 minutos, no identificados, que bien podrían ser los citados compuestos. Bastaría con pasar un patrón de los mismos y comprobar los tiempos de retención y los espectros UV para confirmarlo..

De la observación de los cromatogramas de HPLC vs UPLC queda claro que se acortan los tiempos de elución, como ejemplo, la heroína, pasa de 10,8 minutos a 4,4, la noscapina pasa de 19,1 minutos a 6,7 minutos, y el fentanilo de poco más de 21 minutos a 9.

9. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha optimizado un método para cuantificación de heroína en muestras de alijo por UPLC partiendo de uno ya existente por HPLC y establecido como métodos de referencia.

En este trabajo se ha llevado a cabo el desarrollo de la utilización de un nuevo método UPLC, estudiando en los parámetros de fase móvil, flujo, columna, temperatura, etc.. Se han obtenido una serie de ventajas frente al método de HPLC de referencia:

1. La preparación de las muestras para análisis es bastante sencilla dado que la matriz es simple, la propia droga, evitando los problemas de las matrices biológicas.
2. La ventaja más patente del UPLC respecto al HPLC es el ahorro de tiempo de análisis, pasamos de 40 minutos actualmente por HPLC a 12 minutos por UPLC.
3. Se ha conseguido desarrollar el método de tal manera que sea posible identificar gran parte de los adulterantes, acompañantes, productos de degradación... que suelen acompañar a las muestras.
4. Los parámetros de selectividad, resolución, límite de cuantificación y exactitud se han cumplido perfectamente en base a los criterios que se pedían para poder considerar la metodología como punto de partida para su posible validación y acreditación para su uso.

Si se tiene en cuenta las más de 1000 muestras de alijos de heroína que anualmente se cuantifican por HPLC, eso arroja una cifra de más de 28000 minutos, cerca de 470 horas menos de funcionamiento por la técnica UPLC. El ahorro es considerable en todos los aspectos, tanto a nivel de recursos humanos como materiales, lo que permite, si fuera necesario, realizar una mayor cantidad de análisis.

Como conclusión final podemos decir que la técnica desarrollada muestra gran potencial para poder ser utilizada en un futuro sin pérdida de calidad en los análisis realizados, y con una fiabilidad y confiabilidad comparables a la actual.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. NIDA. "Panorama general" . National Institute on Drug Abuse 2019.
2. Informes de la Comisión Clínica. Heroína.
3. Álvarez Y and Farré M. Farmacología de los Opioides. Adicciones 2005.
4. Redinbo MR, Bencharit S, Morton CL, et al. Structural basis of heroin and cocaine metabolism by a promiscuous human drug-processing enzyme. Nature structural & molecular biology 2003.
5. Hendriks VM, Van Den Brink W, Blanken P, et al. Heroin self-administration by means of 'chasing the dragon': pharmacodynamics and bioavailability of inhaled heroin. European Neuropsychopharmacology 2001; 11: 241.
6. Brenneisen R, Hasler F and Würsch D. Acetylcodeine as a Urinary Marker to Differentiate the Use of Street Heroin and Pharmaceutical Heroin. Journal of Analytical Toxicology 2002..
7. Florez J. *Farmacología humana* . 3ª ed: Masson, 1998, p.571.
8. Jones L and McVeigh J. CUT: A Guide to Adulterants, Bulking Agents and Other Contaminants Found in Illicit Drug Anabolic steroids and other image and Performance enhancing drugs (IPEDS) View project Bariatric care View project 2010.
9. Cole C, Jones L, McVeigh J, et al. Adulterants in illicit drugs: a review of empirical evidence. Drug testing and analysis 2011.
10. Wurcel AG, Merchant EA, Clark RP, et al. Emerging and Underrecognized Complications of Illicit Drug Use. Clinical infectious diseases 2015.
11. Observatorio Interamericano sobre Drogas. Adulterantes de las drogas y sus efectos en la salud de los usuarios: una revisión crítica. Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas 2019.

12. Jesús M and Ruiz N. FACULTAD DE FARMACIA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE TRABAJO FIN DE GRADO ADULTERANTES DE DROGAS ILÍCITAS.
13. *Informe mundial sobre las drogas 2013*. New York: United Nations, 2013.
14. Paracetamol, <https://energycontrol.org/sustancias/paracetamol/>.
15. Velazquez. *Farmacología Básica y Clínica*. 18 ed, 2008, p.720.
16. Banken JA and Foster H. Dextromethorphan. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008.
17. Commission on Narcotic Drugs takes decisive step to help prevent deadly fentanyl overdoses, <http://www.unodc.org/unodc/en/frontpage/2017/March/commission-on-narcotic-drugs-takes-decisive-step-to-help-prevent-deadly-fentanyl-overdoses.html>.
18. Qué es el fentanilo y cuáles son sus riesgos. *Clarín*, Feb 2022,.
19. Kuczyńska K, Grzonkowski P, Kacprzak Ł, et al. Abuse of fentanyl: An emerging problem to face. *Forensic science international* 2018.
20. CITCO. Estadística Anual Sobre Drogas 2020. Centro de Inteligencia Contra el Terrorismo y el Crimen Organizado 2021.
21. Mahtani N. 'Riders', las mulas involuntarias de droga durante el confinamiento. *El País*, April,20,.
22. Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito. COVID-19 y la Cadena de Suministro de Drogas: de la Producción y el Tráfico al Consumo . UNODC RESEARCH 2020.
23. Stashenko EE. GC-MS: herramienta fundamental para el análisis de drogas de uso ilícito. *Scientia Chromatographica* 2012.
24. Por P, Junta L and De Fiscalización De Estupefacientes, Internacional. 2008, año internacional del planeta Tierra. Una nueva iniciativa convergente con los objetivos de la década de la educación por un futuro sostenible. *Revista Eureka sobre enseñanza y divulgación de las ciencias* 2008.
25. Pomilio AB and Vitale AA. Técnicas para la determinación cuali/cuantitativa de drogas de abuso en fluidos biológicos.. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 2006.
26. Barquero Quirós M. *Principios Y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases*. 1º ed: UCR, 2006.
27. Bouchonnet S. *Introduction to GC-MS Coupling*. 1ª ed: CRC Press Taylor & Francis Group, 2013.
28. Stashenko EE. GC-MS: Más de un Analizador de Masas, ¿para qué?. *Scientia Chromatographica* 2012.

29. Técnicas Cromatográficas . Departamento de Química Física.Universidad Autónoma de México 2007.
30. CERT A, MOREDA W and GARCIA-MORENO J. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia . Grasas y aceites (Sevilla) 1997.
31. Sri RS, Sri KB and Mounika C. A Review on Comparative study of HPLC and UPLC. Research journal of pharmacy and technology 2020.
32. Nanda Srivastva A. *Analytical Chemistry: Advancement, Perspectives and Applications*, 2021, p.33.
33. ACQUITY UPLC System Quick Start Guide . Waters Corporation 2010.
34. Gomis Yagües V. Cromatografía de líquidos de alta resolución. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Alicante 2008.
35. Guillaume D. *UHPLC in Life Sciences*: The Royal Society of Chemistry, 2012.
36. Klimczak I and Gliszczyńska-Świgło A. Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. Food chemistry 2015.
37. Sankar R. HPLC APPLICATIONS QUICK SEPARATION GUIDE Characterization of chalcone derivatives View project A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation View project.
38. Guillaume D, Nguyen DT-, Rudaz S, et al. Recent developments in liquid chromatography—Impact on qualitative and quantitative performance. Journal of Chromatography A 2007.
39. de Villiers A, Lestremau F, Szucs R, et al. Evaluation of ultra performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A 2006. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.05.071.
40. Grand-Guillaume Perrenoud A, Veuthey J and Guillaume D. Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical compounds. Journal of Chromatography A 2012.
41. NOVAKOVA L and VLCKOVA H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. Analytica chimica acta 2009.
42. Chimactiv, <http://chimactiv.agroparistech.fr/en/bases/hplc/savoir-plus/8>.
43. Perillo BA, Klein RFX and Franzosa ES. Recent advances by the U.S. Drug Enforcement Administration in drug signature and comparative analysis. Forensic Science International 1994.
44. Moore JM, Allen AC and Cooper DA. Determination of neutral manufacturing impurities in heroin by capillary gas chromatography with electron capture detection after reduction with lithium aluminum hydride and derivatization with heptafluorobutyric anhydride. Analytical chemistry (Washington) 1986.

45. Toske SG, Cooper SD, Morello DR, et al. Neutral Heroin Impurities from Tetrahydrobenzylisoquinoline Alkaloids. *Journal of forensic sciences* 2006.
46. Lurie IS, Chan KC, Spratley TK, et al. Separation and detection of acidic and neutral impurities in illicit heroin via capillary electrophoresis. *Journal of chromatography. Biomedical applications* 1995.
47. Lurie I and Allen A. Isolation, separation and detection via high-performance liquid chromatography of acidic and neutral acetulated rearrangement products of opium alkaloids . *Journal of Chromatography* 1984.
48. Grogg-Sulser K, Helmlin H and Clerc J. Qualitative and quantitative determination of illicit heroin street samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography: method development by CARTAGO-S. *Journal of Chromatography, A* 1995.
49. Dams R, Benijts T, Günther W, et al. Sonic Spray Ionization Technology: Performance Study and Application to a LC/MS Analysis on a Monolithic Silica Column for Heroin Impurity Profiling. *Analytical chemistry (Washington)* 2002. DOI: 10.1021/ac0112824.
50. SCIENCE UNFILTERED, <https://phenomenex.blog/2019/10/09/fase-estacionaria>.
51. Guillarme D. *UHPLC in Life Sciences*: RSC Publishing, 2012, p.321.
52. Lurie IS, Driscoll SE, Cathapermal SS, et al. Determination of heroin and basic impurities for drug profiling by ultra-high-pressure liquid chromatography. *Forensic science international* 2013.
53. La esencia del Límite de Cuantificación en métodos analíticos por HPLC, <https://deappharma.com/la-esencia-del-limite-de-cuantificacion-en-metodos-analiticos-por-hplc/>