UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

"DETERMINACIÓN DE MODAFINIL POR CLAR"

DIPLOMADO DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

TESINA DE LICENCIATURA PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

MARÍA FERNANDA MORALES GUERRERO

ASESOR*:* Dr. JUAN CARLOS VÁZQUEZ LIRA.

México, D.F., Noviembre 2009.

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

Página

INDICE GENERAL i

ÍNDICE DE ABREVIATURAS vi

I. INTRODUCCIÓN 1

II. MARCO TEÓRICO 2

1. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN 2

2. ORIGEN DE LA CROMATOGRAFIA 4

3. DEFINICIÓN 5

4. OBJETIVO DE LA CROMATOGRAFÍA 5

5. VENTAJAS DE CLAR 6

6. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA 7

7. MECANISMO DE LA SEPARACIÓN 8

8. CLASIFICACIÓN DE CLAR 10

Cromatografía gas-líquido. 11

Cromatografía gas-sólido. 11

a. Cromatografía liquido-sólido (adsorción). 12

b. Cromatografía de intercambio iónico. 13

c. Cromatografía de exclusión o por tamaño. 13

d. Cromatografía de Afinidad. 15

e. Cromatografia Líquido-Líquido o de reparto. 15

f. Cromatografía de pares iónicos. 15

g. Cromatografía micelar. 15

h. Cromatografía quiral. 16

i. Cromatografía de fluidos supercríticos. 16

j. Cromatografía de líquidos de fase enlazada. 16

9. FACTORES QUE AFECTAN LA SEPARACIÓN 20

a. Efecto del pH en CLAR. 20

b. Efecto de la temperatura en CLAR. 21

10. COMPONENTES DE LA CLAR 25

a. Recipientes. 26

b. Sistema de bombeo. 26

c. Sistema de inyección. 27

d. Precolumnas. 28

e. Columna de separación. 28

f. Fase Móvil. 32

g. Detector. 34

h. Registrador. 37

11. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS 38

a. Coeficiente de reparto (K). 38

b. Factor de capacidad (k´). 38

c. Ecuación de Van Deemter. 39

d. Tiempo muerto (t_0). 39

e. Tiempo de retención (tR). 39

f. Tiempo de retención reducido (t'_R). 40

g. Resolución (R). 40

h. Volumen de retención (VR). 41

i. Volumen muerto (V_0). 41

j. Factor de Selectividad (α). 43

k. Factor de asimetría (As). 43

l. Número de Platos Teóricos (N). 44

m. Longitud de la columna (L). 46

n. Altura Equivalente a un Plato Teórico. 46

o. Altura de plato reducida (h). 46

p. Velocidad lineal (u). 47

12. ADECUABILIDAD DEL SISTEMA 48

13. PREPARACIÓN DE MUESTRA. 49

a. Tratamiento Previo. 49

b. Desproteinización. 50

c. Extracción Líquido-Sólido. 50

d. Extracción Líquido-Líquido. 50

e. Filtración. 51

f. Extracción en fase sólida. 51

g. Derivatización. 51

14. APLICACIONES CUALITATIVAS/CUANTITATIVAS 52

a. Aplicaciones Cualitativas. 52

b. Aplicaciones Cuantitativas. 52

15. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN 52

a. Adición de estándar. 52

b. Normalización interna. 53

c. Patrón interno. 53

16. VALIDACIÓN DEL MÉTODO 54

a. Confirmación de identificación, Selectividad y Especificidad. 54

b. Límite de detección (LOD). 55

c. Límite de cuantificación (LOQ). 55

d. Exactitud. 55

e. Precisión. 56

f. Repetibilidad. 56

g. Reproducibilidad. 56

h. Linealidad. 57

i. Sensibilidad. 58

j. Robustez. 58

k. Tolerancia. 58

l. Estabilidad Analítica de la Muestra. 58

17. PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS DEL MODAFINIL 60

18. MODAFINIL 61

19. QUIRALIDAD 63

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 67

IV. OBJETIVOS 68

V. HIPÓTESIS 68

VI. METODOLOGÍA 69

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS 70

VIII. CONCLUSIONES.....114

IX. PROPUESTAS.....114

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 116

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
SNC	Sistema Nervioso Central.
CFR	Cromatografía en fase reversa.
CII	Cromatografía de intercambio de iones.
CPG	Cromatografía de permeación en gel.
OSAHS	Síndrome de sueño obstructivo por apnea/hipopnea (por sus siglas en inglés: *Obstructive Sleep Apnea/Hypopnea Syndrome*).
SWSD	Trastorno de sueño por cambio de trabajo (por sus siglas en inglés: *Shift Work Sleep Disorder*).
MeOH	Metanol.
EtOH	Etanol.
ACN	Acetonitrilo.
THF	Tetrahidrofurano.
DI	Diámetro Interno.
PM	Peso Molecular.
k’	Factor de capacidad.
L	Longitud de la columna.
H	Altura equivalente de un plato teórico.
N	Número de platos teóricos.
N/m	Platos Teóricos por metro.
tR	Tiempo de retención.
µL	Microlitros.
t0	Tiempo muerto.

LC-MS/MS: Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.

ESI:	Ionización electrospray.
LOQ:	Límite de cuantificación.
LOD:	Límite de detección.
FM:	Fase móvil.

EI:	Estándar interno.
M:	Modafinil.
MA:	Modafinil ácido.
MS:	Modafinil sulfona.

I. INTRODUCCIÓN

El uso de técnicas analíticas muy sensibles es imprescindible para la cuantificación de compuestos que se encuentren en baja concentración o acompañados de una gran cantidad de sustancias que pueden interferir con su determinación. Por ejemplo, para el control de calidad, que determina la eficacia y seguridad de los medicamentos, es necesario contar con una técnica que permita su determinación, así como la de sus posibles productos de degradación física, química o metabólica. Por otra parte, el análisis de los metabolitos en una matriz biológica, es un aspecto fundamental en los estudios farmacocinéticos, ya que determinan la biodisponibilidad y la duración de la respuesta clínica.[1]

Un ejemplo claro de la gran utilidad de la CLAR dentro de la industria farmacéutica es el análisis cuali-cuantitativo de mezclas racémicas, en donde, por medios tradicionales como la espectrofotometría UV no es posible porque las bandas de absorción de estos compuestos se sobreponen por la similitud de sus estructuras químicas. Más aún, la absorbancia de excipientes, sabores o algún otro principio activo en la forma farmacéutica pueden ocasionar problemas adicionales para el analista.[20]

La narcolepsia es un trastorno de sueño caracterizado por estados de cataplejía y episodios de sueño repentinos que afectan la vida cotidiana de las personas que la padecen. El medicamento indicado para el tratamiento de este padecimiento se denomina Modiodal, cuyo principio activo es modafinil.

El mecanismo a través del cual modafinil (mezcla de enantiómeros R- y S-) promueven el estado de vigilia aún no está completamente definido. Esta indicado principalmente en el tratamiento de trastornos del sueño como el síndrome de apnea del sueño e hipopnea y narcolepsia, así como en otras enfermedades, por ejemplo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, pacientes con esclerosis múltiple y pacientes con déficit de atención. Es un estimulante del SNC que tiene poca dependencia, comparado con otros fármacos estimulantes característicos como las anfetaminas.

RESUMEN

El modafinil es un fármaco promotor del estado de vigilia, que desde no hace mucho tiempo surgió como tratamiento para la narcolepsia. Su mecanismo de acción todavía causa controversia, pero recientemente se ha reportado que puede incrementar indirecta y parcialmente el estado de vigilia a través de la inhibición de la liberación vía serotonérgica de GABA. Es un compuesto quiral debido a su sulfóxido asimétrico, pero se usa como un racemato. La búsqueda por descifrar el mecanismo de acción de la mezcla racémica, de cada enantiómero y de sus dos metabolitos mayoritarios, demanda métodos analíticos eficientes para seguir el perfil farmacológico de estos compuestos. El propósito de este trabajo fue hacer una búsqueda bibliográfica y a partir de las distintas técnicas y métodos reportados para su cuantificación en diferentes matrices, hacer un análisis evaluando todos los parámetros considerados en la determinación. El método más adecuado fue el que usa un sistema CLAR bidimensional, ya que el tiempo total de análisis es de 30 minutos, sin requerir tiempo previo para el tratamiento de la muestra. La única restricción para usar este método es el costo que puede llegar a alcanzar el sistema CLAR debido a los componentes que lo conforman. Se demostró también que la cuantificación se puede llevar a cabo usando columnas convencionales C18 o columnas quirales derivadas de ciclodextrinas o amilosa.

Actualmente el interés clínico de la farmacología de modafinil es creciente, como se menciona anteriormente, aún no está bien definido el mecanismo de acción de cada uno de sus enantiómeros. Se encuentran reportados métodos analíticos que permiten su cuantificación en plasma, suero y orina por CLAR que describen el uso de esta técnica acoplado a un detector de masas empleando una columna enantioselectiva.

Este trabajo presenta el análisis teórico de los métodos existentes para la determinación de modafinil, comparando ventajas y desventajas de lo reportado en la literatura para finalmente proponer un método analítico para el análisis de modafinil en plasma. Este tipo de muestras biológicas, son de suma importancia para monitorear el comportamiento de este fármaco en estudios farmacocinéticos y toxicológicos.

II. MARCO TEÓRICO

1. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía líquida se ha convertido en una de las técnicas más versátiles de las que dispone el analista debido a su sencillez y capacidad para obtener separaciones de alta resolución. Se pueden desarrollar separaciones basadas en características tan diversas como la polaridad de los solutos, su naturaleza iónica, su peso molecular, su capacidad de partición o su capacidad para formar complejos.[18]

En la actualidad la CLAR es ampliamente utilizada debido a que presenta una alta sensibilidad y se puede adaptar fácilmente a determinaciones cuantitativas exactas. Su campo de aplicación cubre una gran parte del ámbito científico y su éxito se debe a la posibilidad de actuar de forma muy precisa sobre la selectividad entre los compuestos a través de la elección de la columna y de la composición del eluyente, es decir, al sacar partido de las interacciones disolución / fase móvil / fase estacionaria. Se extiende a una gran diversidad de sustancias como aminoácidos, proteínas, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides y una gran cantidad de sustancias inorgánicas. Figura 1.[2, 7]

Cabe mencionar que la CLAR disfruta de un seguro incremento en ventas de instrumental y publicaciones que describen aplicaciones nuevas e innovadoras. Algunas áreas de reciente crecimiento incluyen la miniaturalización de los sistemas de CLAR, análisis de ácidos nucleicos, proteínas intactas y digeridas, análisis de carbohidratos y análisis quiral.[21]

La cromatografía es una poderosa técnica de separación que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia y está basado en un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil, gas o líquido y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido, ambas fases son inmiscibles.[7]

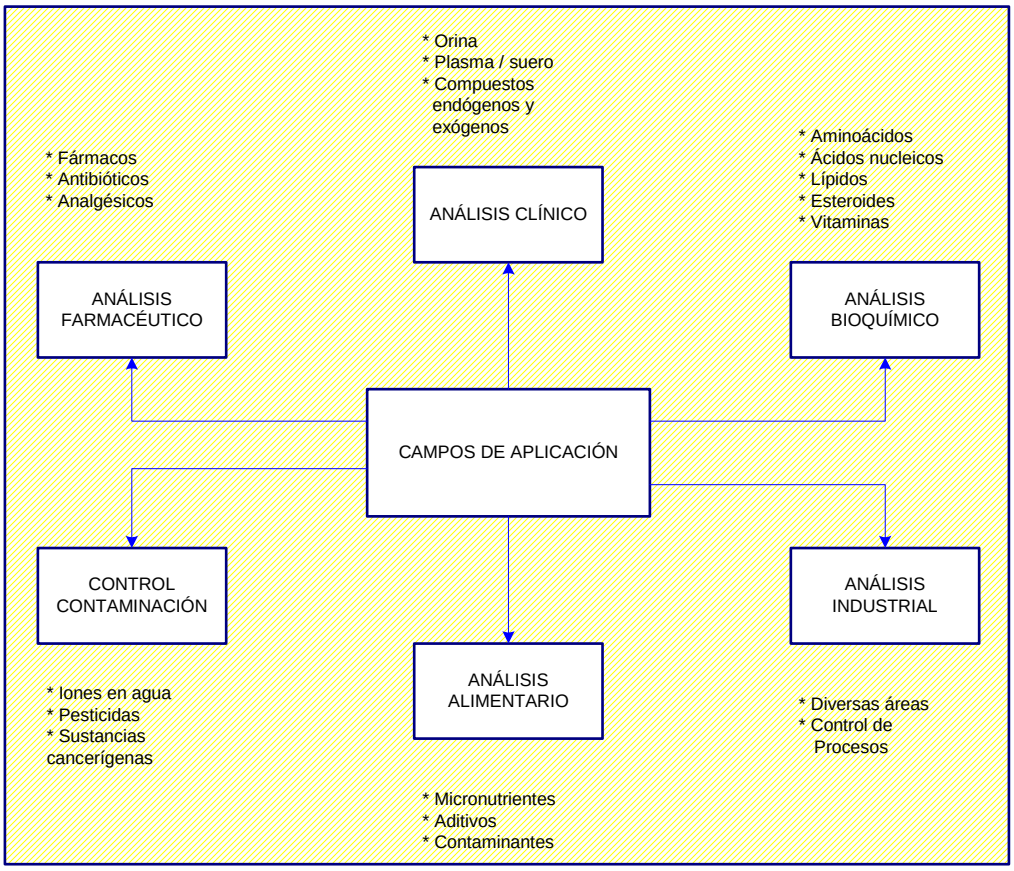


Figura 1 Campos de Aplicación de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.[2, 7]

2. ORIGEN DE LA CROMATOGRAFIA

A principios del siglo XX, el botánico ruso Mikhail S. Tswett (1906) realizó por primera vez la técnica cromatográfica para intentar aislar los pigmentos de plantas, haciendo pasar disoluciones de estos compuestos a través de una columna de vidrio rellena con carbonato de calcio finamente dividido. Las especies separadas aparecían como siete bandas coloreadas en la columna a las que denomino “cromatograma”, lo que justifica el nombre que eligió para el método que deriva de las palabras griegas *chroma*, que significa “color”, y *graphein*, que significa "escrito" (literalmente "escritura de color") para describir su "colorido" experimento.[3, 4, 7, 25, 26,]

En 1941, Martin y Synge, quienes no habían tenido éxito al usar la extracción por contracorriente para la separación de aminoácidos en muestras de lana, desarrollaron un proceso de cromatografía líquida en la cual utilizaron una columna empaquetada que contenía gel de sílice saturado en agua y una fase móvil de butanol-cloroformo. Estos autores perfeccionaron las técnicas experimentales y explicaron los aspectos teóricos del procedimiento tan detenidamente que en 1952 se les otorgó el premio Nobel por este trabajo.[18]

Años después la cromatografía líquida seguía llevándose a cabo en columnas abiertas de vidrio de 15-20 cm de longitud por 1-4 cm de diámetro interno, las cuales se rellenaban con una fase fija (sílice, alúmina) y se hacía fluir una muestra a través de ella mediante la adición continua de una fase móvil por efecto de la gravedad (figura 2).[3, 5.]

Sin embargo, con el paso del tiempo los investigadores se dieron cuenta de que podían aumentar la eficiencia de las separaciones al disminuir el tamaño de partícula de los rellenos de las columnas. Siendo así hasta finales de los años sesenta cuando se desarrolla la tecnología adecuada para producir y utilizar rellenos de tamaño de partícula tan pequeños como los del orden de 3 a 10 µm, generando también la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil.[18]

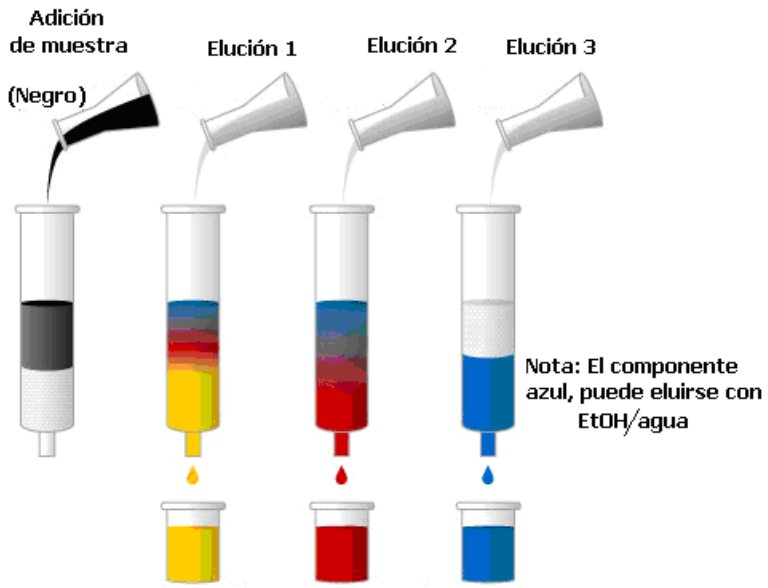


Figura 2 Extracción de pigmentos de una planta por cromatografía en columna de vidrio. Un solo cartucho puede separar los tres componentes. [5]

De esta manera surge, la técnica de la CLAR, que requiere de instrumental especial que permita trabajar con altas presiones requeridas. [5, 15, 16]

3. DEFINICIÓN

La CLAR o, en inglés HPLC, debido a las altas presiones requeridas (1,000 a 7,000 psi), es esencialmente un método físico-químico basado en la separación de una mezcla de compuestos a partir de su distribución e interacción selectiva entre los solutos en dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y una móvil que se desplaza a altas presiones a través de fase fija haciendo uso de instrumentación automatizada de alta eficiencia (tanto como 20,000 N/m).[3, 5, 12, 19]

4. OBJETIVO DE LA CROMATOGRAFÍA

El principal objetivo de la cromatografía es separar los componentes de una muestra. Dicha separación depende de los anchos de los picos y de los espaciamientos de tiempo y volumen

entre picos. Como resultado se puede obtener, una separación eficaz de pares de componentes con bandas angostas o anchas.

Esta preferencia hacia las bandas angostas se cuantifica mediante los siguientes parámetros cromatográficos: Eficiencia, Resolución, N y Coeficiente de reparto.[28]

5. VENTAJAS DE CLAR

Eficiencia. Los detectores empleados son capaces de detectar cantidades del analito muy pequeñas y generalmente son detectores no destructivos, por lo que este método puede ser empleado no solo para la cuantificación de los productos sin degradar y/o degradados, sino también para el aislamiento y la identificación de los mismos.[3, 6]

Economía. Aunque el costo inicial del equipo y disolventes son altos, se compensa con la rapidez del análisis, la cantidad de información obtenida, la pequeña cantidad de muestra y el número de análisis que se puede realizar por jornada laboral, lo que hace del mismo un método analítico ideal. El material de relleno usado en las columnas son partículas muy pequeñas (3-50 μm) que permiten aumentar la eficiencia de la separación de las muestras, además en muchos casos las columnas usadas generalmente son reutilizables para otros analitos.[3]

Temperatura. Debido a que el proceso cromatográfico se realiza por cromatografía a temperatura ambiente, la ruptura de compuestos termolábiles dentro de la columna es poco frecuente, además se evita la preparación de derivados que permitan estabilizar el compuesto.[6]

Mezclas de compuestos. Se pueden lograr separaciones en minutos de varios analitos presentes en una misma muestra ya que las presiones y la velocidad de flujo pueden ser controladas. [3]

Lo más reciente en detección para la CLAR, refiriéndose en la selectividad se ha visto con el uso de espectrometría de masas (MS) y por algunas aplicaciones esto puede ser visto como el método de detección ideal. Sin embargo, más consideraciones vanas tales como el tamaño de la instrumentación y su accesibilidad queda limitada debido al costo que representa el acoplamiento de masas a la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR-MS).[22, 23]

6. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Por técnicas de separación cromatográficas se entienden las formas de poner en contacto las muestras problema con la fase móvil y estacionaria, la más habitual es la técnica de elución. La cromatografía de elución consiste en que una única cantidad de la muestra disuelta en la fase móvil se introduce en la parte superior de la columna (donde se encuentra la fase estacionaria) después de lo cual la mezcla se distribuye entre ambas fases y posteriormente, se agrega de forma continua fase móvil (eluyente), lo que hace avanzar la muestra dentro de la columna en una serie de transiciones entre la fase móvil y estacionaria. El movimiento de los solutos (componentes de la mezcla) tiene lugar sólo en la fase móvil y la velocidad media de avance depende del tiempo que el soluto permanece en esta fase.[29]

El análisis frontal es la técnica donde se alimenta continuamente a la columna con una solución de la muestra, de esta forma se obtienen datos termodinámicos. Cuando la columna se satura comienzan a eluir los solutos en el eluyente.

En el análisis por desplazamiento se introduce a muestra como una solución en una sola porción, pero se hace que los componentes bajen por la columna por la adición continua de una solución que es más afín por la fase estacionaria que cualquier otro de los componentes de la muestra. La concentración de cada uno de los componentes puede determinarse por las distancias del cromatograma. Esta técnica se utiliza frecuentemente en escala preparativa.

7. MECANISMO DE LA SEPARACIÓN

El proceso de separación depende de diversos mecanismos que se relacionan directamente con la naturaleza química de la fase estacionaria, los solutos de interés y la fase móvil. Figuras 3 y 4.

Por lo tanto la retención se debe a la competencia que se establece entre:

Fase móvil-Superficie adsorbente

Analito-Superficie Adsorbente

Si las fuerzas de interacción de la fase estacionaria con el analito son débiles, este será poco retenido y eluirá cerca del t_0. En cambio, si la interacción es muy fuerte su elución se verá retardada e incluso puede quedar retenido en la fase estacionaria, sin eluir del sistema.

El proceso de adsorción de los analitos sobre una fase estacionaria polar como la sílice o la alúmina está gobernado por interacciones específicas entre los grupos polares de la superficie adsorbente y los del analito. Las interacciones más representativas son:[30, 31]

a. **Interacción dipolo-dipolo.** Esto es usual para los disolventes polares, como H_2O, MeOH y ACN. A causa de la diferencia de electronegatividad existente entre algunos agrupamientos, se produce una localización de carga, formándose un dipolo de tipo permanente. Si la molécula del soluto es polar, se verá atraída por los dipolos de la fase móvil y se unirá electrostáticamente a ellos, siendo eluida.[32]

b. **Interacción por puentes de hidrógeno.** El establecimiento de puentes de hidrógeno entre fase móvil y solutos adquiere más importancia si es mayor la capacidad donadora del dador de protones y, por otro lado la capacidad aceptora de las moléculas. La probabilidad de que surjan enlaces por puentes de hidrógeno será más

considerable cuando las moléculas dadoras sean ácidos, y las aceptoras, de naturaleza más bien básica.[32]

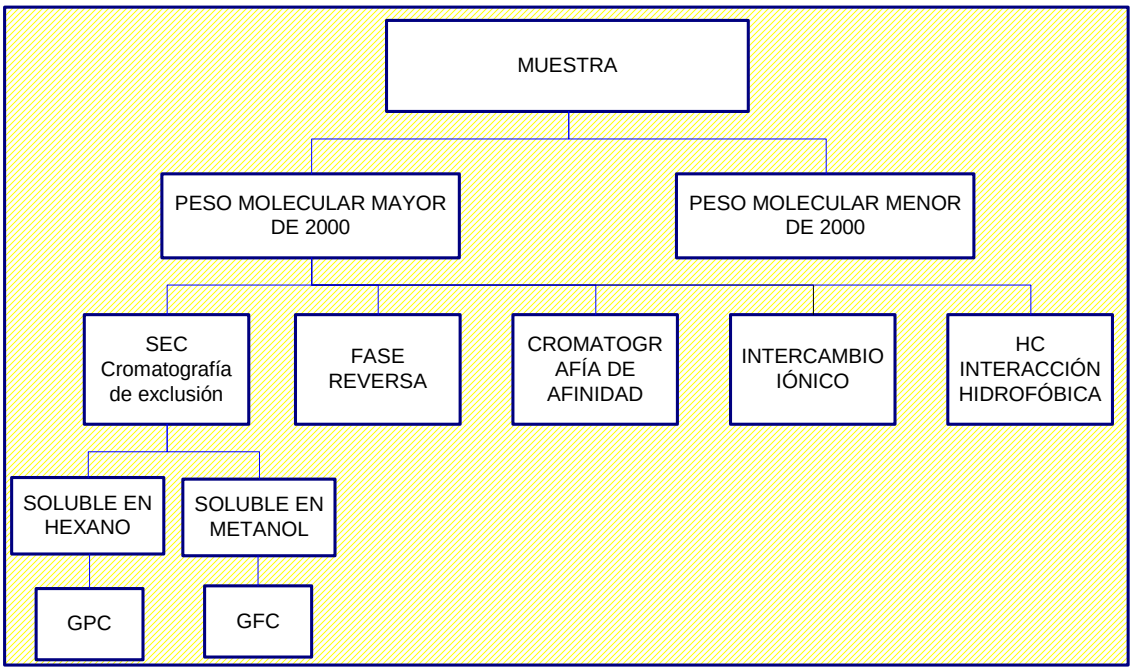


Figura 3. Representación esquemática de la metodología general para la selección de una modalidad de separación cromatográfica. GPC= Cromatografía de Permeación de Gel. GFC= Cromatografía de Filtración en Gel.[30, 31]

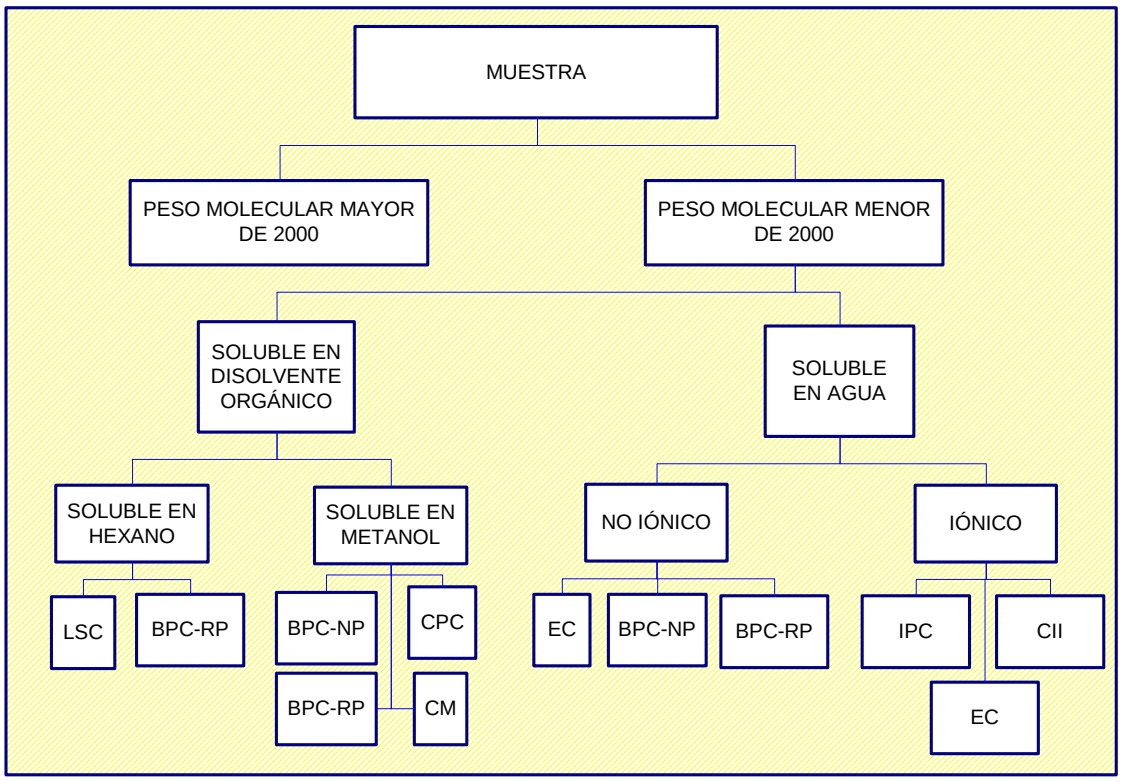


Figura 4. Selección de modalidades cromatográficas: LSC= Cromatografía Fase Normal de Absorción; BPC-RP= Cromatografía de Fase Reversa Enlazada; BPC-NP= Cromatografía de Fase Normal Enlazada; IPC= Cromatografía de Pares Iónicos; EC= Electro Cromatografía; CII= Cromatografía de Intercambio Iónico; CM= Cromatografía Micelar; CPC= Cromatografía de Partición Centrífuga.[30, 31.]

8. CLASIFICACIÓN DE CLAR

La cromatografía puede clasificarse según la naturaleza física de las fases, en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de solutos entre las fases (el fenómeno físico-químico originario del coeficiente de distribución K), y el procedimiento utilizado. Figura 6. Sin embargo, la clasificación a continuación en las Tablas 1 y 2 da prioridad a la naturaleza de las fases presentes.[7]

Cuando la fase móvil es un gas, las técnicas cromatográficas pueden dividirse en:

Cromatografía gas-líquido. La fase móvil es un gas y la fase estacionaria es un líquido inmovilizado por impregnación o por enlaces sobre un soporte inerte que puede ser simplemente la pared de la columna.

Cromatografía gas-sólido. La fase estacionaria es un sólido poroso (grafito o gel de sílice o aluminio) y la fase móvil es un gas. Este tipo de cromatografía de gases es muy efectivo para análisis de mezclas de gases o de compuestos con bajo punto de ebullición.

Tabla 1. Clasificación de técnicas cromatográficas.[7]

Clasificación General	Técnicas Específicas	Fase Estacionaria	Tipo de Equilibrio
Cromatografia de Líquidos (LC) Fase Móvil: Líquida	Líquido-Líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Líquido-Sólido o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio Iónico	Resina de Intercambio Iónico	Intercambio Iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polímero.	Distribución/Exclusión
Cromatografía de Gases (GC)	Gas-Líquido	Líquido absorbido entre un sólido	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas-Fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Gas-Sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de Fluidos Supercríticos (SFC) Fase Móvil: Fluido Supercrítico		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada.

Tabla 2. División de la cromatografía de acuerdo al tipo de fase móvil.[25,26]

Nombre	Fase Móvil	Fase Estacionaria
Cromatografía Gas-Líquido	Gas	Líquido
Cromatografía Gas-Sólido	Gas	Sólido
Cromatografía Líquido-Líquido	Líquido	Líquido
Cromatografía Líquido-Sólido	Líquido	Sólido
Cromatografía Fase-Reversa	Líquido	Sólido

En el caso de la cromatografía líquida se emplea una fase móvil liquida. La gran ventaja de la cromatografía de líquidos reside en la comparación de diversas propiedades de las fases móviles con distintas fases estacionarias y diversos detectores**.** La cromatografía de líquidos abarca diversas técnicas y muchas de ellas se clasifican con más de un nombre. Tabla 3.[33]

a. **Cromatografía liquido-sólido (adsorción).** La fase estacionaria es un sólido finamente dividido sobre el que las moléculas se adhieren por un doble efecto de adsorción física y química. La separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción. Figura 5. El parámetro físico-químico es el coeficiente de adsorción.[7]

Si la muestra es soluble en disolventes no polares o moderadamente polares tales como: hexano, diclorometano, cloroformo o éter etílico, entonces la cromatografía de adsorción es una buena opción. El mecanismo de la cromatografía de adsorción involucra la interacción entre la molécula de la muestra y la fase estacionaria. Tal interacción es un caso de competencia en el que las moléculas de la fase móvil y las del soluto compiten por los sitios de adsorción discretos sobre la superficie del empaque de la columna. La interacción entre las moléculas del soluto y el adsorbente es óptima cuando los grupos funcionales del soluto se sobreponen exactamente a estos sitios de adsorción.[34]

b. <u>Cromatografía de intercambio iónico.</u> La fase estacionaria está constituida por una matriz polimérica que presenta una superficie cargada iónicamente, por ejemplo ácidos carboxílicos o aminas cuaternarias, con carga contraria a la de la muestra y la fase móvil consta de una disolución amortiguadora acuosa, en la que el pH y la polaridad se encargan de controlar el tiempo de elusión. La fase estacionaria permite el intercambio de estos contrapones móviles con iones del mismo signo de la muestra.

A medida que la fase móvil pasa por la superficie, los solutos iónicos son retenidos mediante la formación de uniones químicas electrostáticas con los grupos funcionales. Las fases móviles utilizadas en este tipo de cromatografía siempre son líquidas.

Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica y, por tanto, más tiempo tardará en ser eluida.[2, 34]

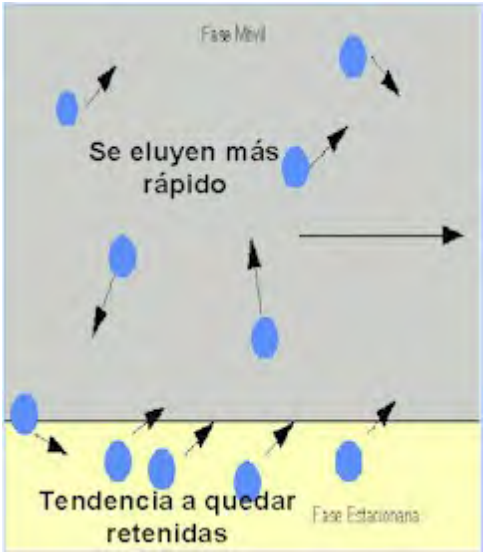


Figura 5. Fenómenos de adsorción y absorción.[51]

c. <u>Cromatografía de exclusión o por tamaño.</u> También llamada cromatografía de filtración por gel o de permeación por gel La fase fija es una sustancia polimérica que está formada por material que posee poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, llevando a cabo un fraccionamiento relacionado con el tamaño molecular. En este caso el coeficiente de distribución toma el nombre de coeficiente de difusión.[8, 9]

La moléculas de tamaño mayor son excluidas y eluyen primero, mientras que las más pequeñas que penetran en los poros son retenidas mas tiempo.[5]

Este método es muy adecuado para la separación de mezclas en las cuales los solutos varían considerablemente de tamaño molecular. La fase móvil en este tipo de cromatografía puede ser líquida o gaseosa.[25]

Tabla 3. División de la cromatografía de acuerdo al mecanismo de retención.[25, 26]

Nombre	Mecanismo de Retención
Cromatografía de Adsorción	Adsorción a un Sólido
Cromatografía de Partición	Equilibrios de Partición en Fluidos
Cromatografía de Intercambio Iónico	Intercambio Iónico

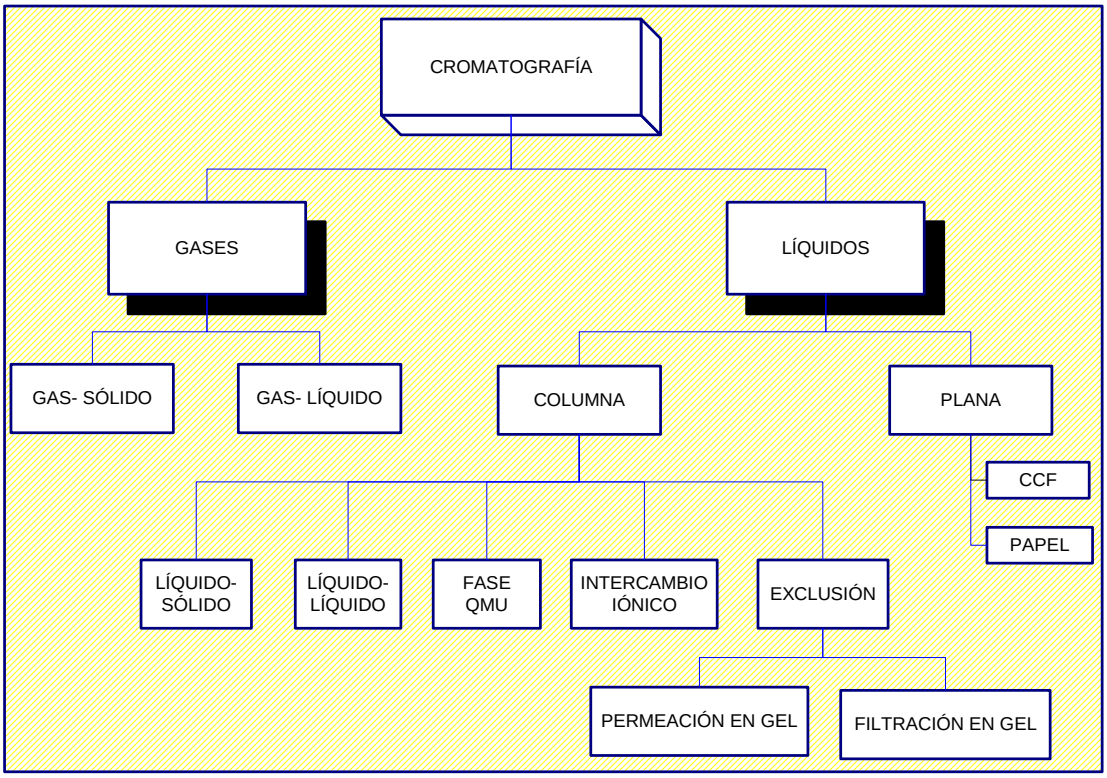


Figura 6. Clasificación de la cromatografía según las características de la Fase Móvil y la Fase Estacionaria.[33]

d. <u>Cromatografía de Afinidad.</u> Permite la separación de mezclas proteicas por su afinidad o capacidad de unión a un determinado ligando. En este caso, las proteínas que se retienen en la columna son aquellas que se unen específicamente a un ligando que previamente se ha unido a la matriz de la columna.[34]

Por ejemplo un inhibidor enzimático o un anticuerpo, se utiliza especialmente en separaciones bioquímicas.[35]

e. <u>Cromatografia Líquido-Líquido o de reparto.</u> Utiliza una fase estacionaria líquida que forma una fina película sobre la superficie de un material inerte y poroso que solo desempeña un papel de apoyo.[36]

Las moléculas de soluto se distribuyen entre los dos líquidos: uno es la fase móvil y el otro es la fase estacionaria, que se encuentran homogéneamente dispersas en un soporte sólido, finamente dividido.[30]

f. <u>Cromatografía de pares iónicos.</u> La cromatografía de pares iónicos es un tipo de cromatografía de reparto en fase reversa que se utiliza para la separación y determinación de especies iónicas. En la cromatografía de pares iónicos la fase móvil está constituida por una disolución tampón acuosa que contiene un disolvente orgánico como MeOH o ACN, y un compuesto iónico que aporta un contraión de carga opuesta a la del analito. Un contraión es un ión que se combina con el ión del analito para formar una pareja de iones, que es una especie neutra que es retenida por el relleno de fase reversa.[7]

g. <u>Cromatografía micelar.</u> La cromatografía micelar, permite separar tanto analitos neutros como cargados. La separación de compuestos neutros, se basa en la adición de un tensoactivo cargado a una concentración suficiente para formar micelas. Estos analitos neutros se distribuyen entre la fase micelar y la fase acuosa en diferente extensión dando lugar a su separación. Las moléculas neutras interaccionan con la

micela en diferente grado en función de su hidrofobicidad y adquieren de esta manera movilidad.

h. Cromatografía quiral. El uso de fluidos supercríticos para separar enantiómeros es una de las tareas más importantes en diversas áreas de investigación, especialmente en fármacos y agroquímicos. Esto porque, es bien sabido que dos formas enantiómeras de una molécula pueden mostrar diferente actividad biológica. El uso de fluidos supercríticos para separar, con eficiencias altas y tiempos de retención cortos, la isomería es extremadamente ventajosa en este difícil trabajo. Se pueden utilizar modificadores orgánicos para ver el efecto en la resolución y valor de factor de capacidad k'. Ejemplo de estos modificadores son metanol, etanol y 2-propanol.[40]

i. Cromatografía de fluidos supercríticos. La fase móvil es un fluido en estado supercrítico, como el dióxido de carbono a uso 50ºC y 150 bares. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido. En este tipo de cromatografía un fluido supercrítico es utilizado como fase móvil, la fase estacionaria es un tipo de fase enlazada como en la cromatografía de fase reversa o normal, incluso puede utilizar columnas que se utilizan en cromatografía de gases como las de sílice fundida recubierta con la fase estacionaria de alto grado de entrecruzamiento.[36]

j. Cromatografía de líquidos de fase enlazada. En casi todos los casos, como fase estacionaria se utilizan compuestos unidos químicamente a un soporte sólido de sílice. El medio poroso actúa únicamente como un soporte para el agua, que se desempeña como un agente de reparto. Figura 7. La fase estacionaria de cromatografía de reparto es un líquido adsorbido o enlazado covalentemente en un sólido inerte. La separación se fundamenta en el reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Esta técnica se divide en "fase normal", y "fase reversa", cuyas principales diferencias radican en las distintas polaridades de su fase estacionaria y móvil. Tabla 4.[5, 30]

Fase normal. Se compone de una fase estacionaria de naturaleza fuertemente polar (sílice) y una fase móvil no polar (hexano, THF, etc.). La retención de cada compuesto presente en una muestra se debe a la distinta solubilidad en la fase móvil (no polar) y afinidad en cuanto a la fase estacionaria (polar). Respectivamente el analito menos polar es el primero en eluir y el más polar será el último debido a que relativamente es el más soluble en la fase móvil y un aumento en la polaridad de la fase móvil provoca una disminución del tiempo de elución.[5, 6, 13]

Fase reversa. Esta técnica a diferencia de la normal, se utiliza una fase estacionaria de naturaleza no polar (hidrocarburo), mientras la fase móvil es un liquido polar (agua o un alcohol). En este caso también la separación de los compuestos se basa en la afinidad por la fase estacionaria y la fase móvil (solubilidad). Los compuestos que permanecen mayor tiempo retenidos son los no polares y los más polares eluyen primero y un aumento en la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución. [7,10,11]

Las características de la cromatografía de fase reversa pueden enunciarse de la siguiente forma:

- Análisis de compuestos no iónicos, iónicos e ionizables que pueden ser separados en la misma columna y con la misma fase móvil.
- La fuerza de atracción superficie no polar-soluto es débil.
- La adsorción irreversible, frecuentemente es silica gel, raramente ocurre.
- La fase móvil predominante es agua.
- El orden de elución es predecible, en función de la hidrofobicidad del analito y de su ionización.

Tabla 4. Comparación de la cromatografía de líquidos en Fase Normal y Fase Reversa.[5, 30]

Fase	Normal	Reversa
Polaridad del relleno	Alta	Baja
Polaridad del disolvente	Baja	Alta
Orden de elución	Primero el menos polar	Primero el más polar
Efecto del incremento de polaridad del disolvente	Reduce los tiempos de retención	Aumenta los tiempos de retención

La retención y selectividad se controlan fundamentalmente con la composición de la fase móvil. Por lo tanto, para obtener una fase móvil de fuerza de elución óptima, se ensayan mezclas de H_2O, MeOH, ACN o THF en H_2O. [10,11]

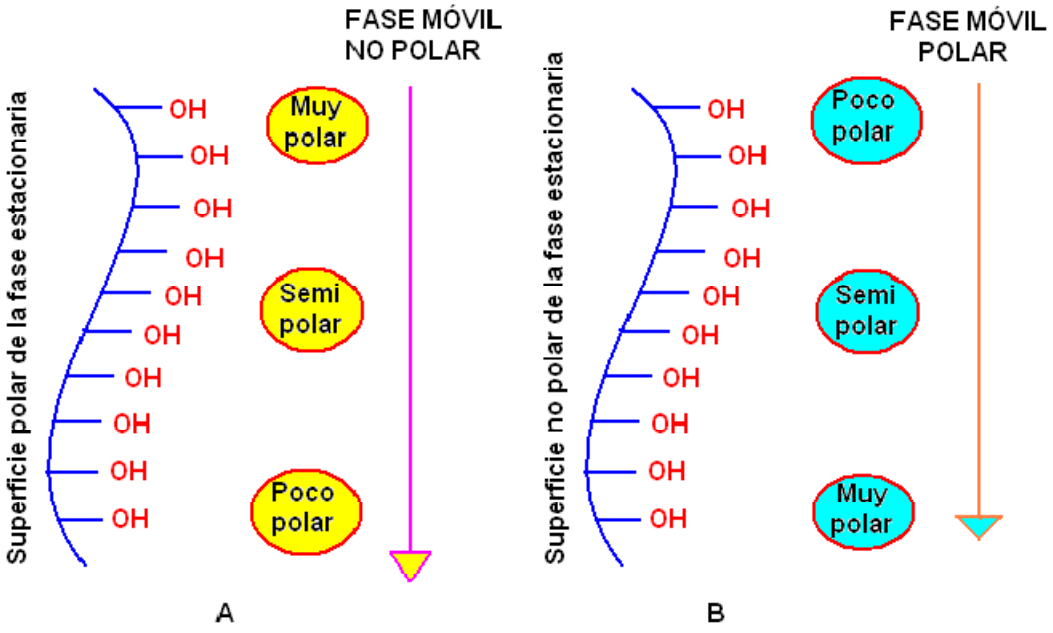


Figura 7. A. Cromatografía de Líquidos en fase Normal; B. Cromatografía en fase reversa. Los círculos representan los tipos de compuestos presentes en la muestra e indican su orden de elusión en dirección del flujo de la fase móvil.[3]

La siguiente clasificación referida en la figura 8, involucra todas las características importantes que se toman en cuenta en la elección de la técnica a utilizar, además de las características propias de las moléculas que se van a analizar:

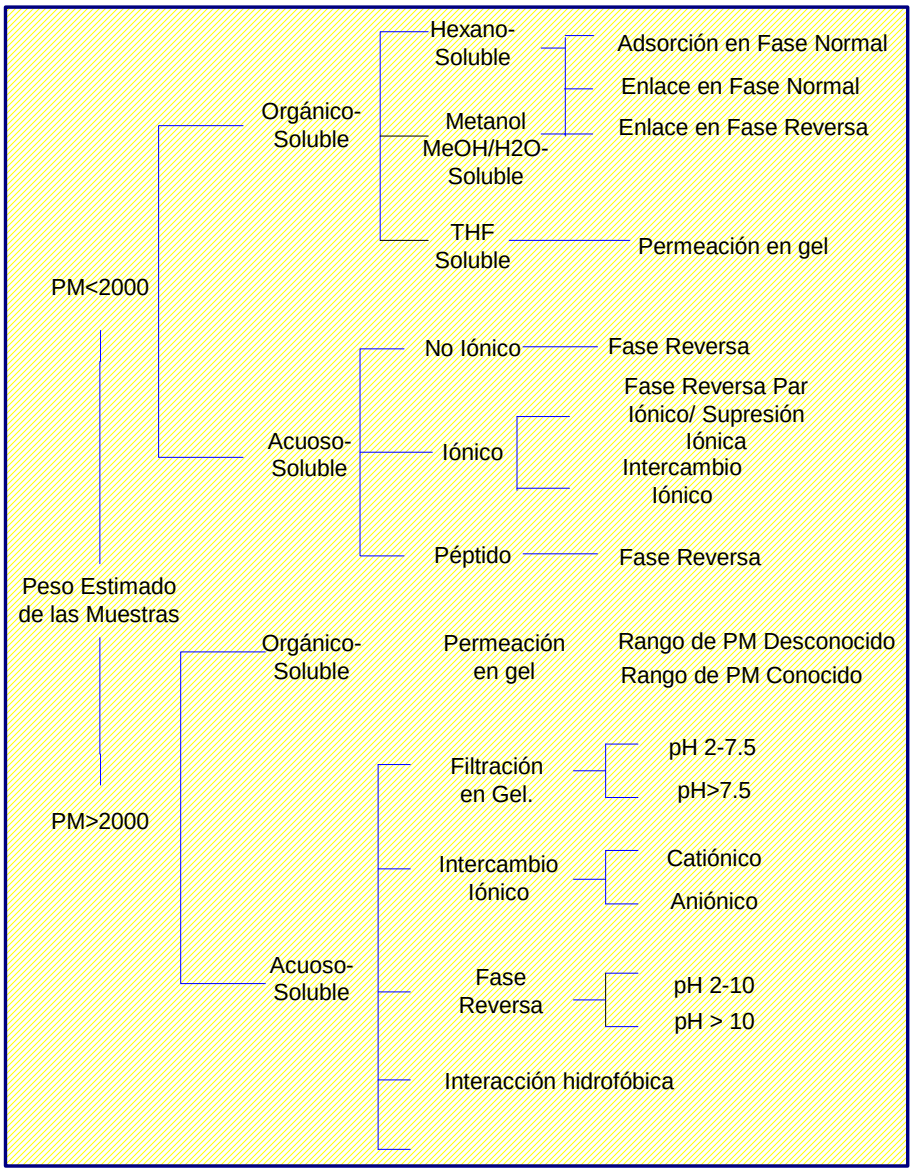


Figura 8. Clasificación de la cromatografía según las características de los solutos a analizar.[52]

9. FACTORES QUE AFECTAN LA SEPARACIÓN

- Solubilidad.
- pH de la fase móvil.
- Pureza de los disolventes.
- Desgasificación y temperatura.

a. Efecto del pH en CLAR.

En CLAR de fase reversa, la retención de los analitos es relacionada con su hidrofobicidad. Entre más hidrofóbico es el analito, más tiempo será retenido. Cuando un analito es ionizado y llega a ser menos hidrofóbico, entonces su retención decrece.

Los ácidos pierden al menos un protón y son ionizados cuando el pH se incrementa, las bases ganan al menos un protón y son ionizados cuando el pH disminuye. Es por esto que, cuando se trata de separar mezclas por CLAR de fase reversa que contienen ácidos y/o bases, se vuelve necesario el control del pH de la fase móvil usando un amortiguador apropiado para conseguir resultados reproducibles.

En ocasiones se desarrollan métodos en CLAR de fase reversa usando amortiguadores que tienen poca o ninguna capacidad reguladora en un pH especifico de la fase móvil.

Para métodos más robustos, es recomendable que las separaciones se desarrollen en una fase móvil con un pH en donde la retención de los analitos sea poco afectada. Cuando se separan bases, por ejemplo, fases móviles con un amortiguador ácido usualmente muestran mejor reproducibilidad que fases móviles con amortiguadores neutros.

La concentración del amortiguador sobre la fase móvil usualmente tiene poco efecto sobre la retención en CLAR de fase reversa, mientras más alta es la concentración del amortiguador mayor será el control del pH. Una concentración del amortiguador en el rango de 20 a 50 µM es adecuada para la mayoría de las aplicaciones en fase reversa.[6]

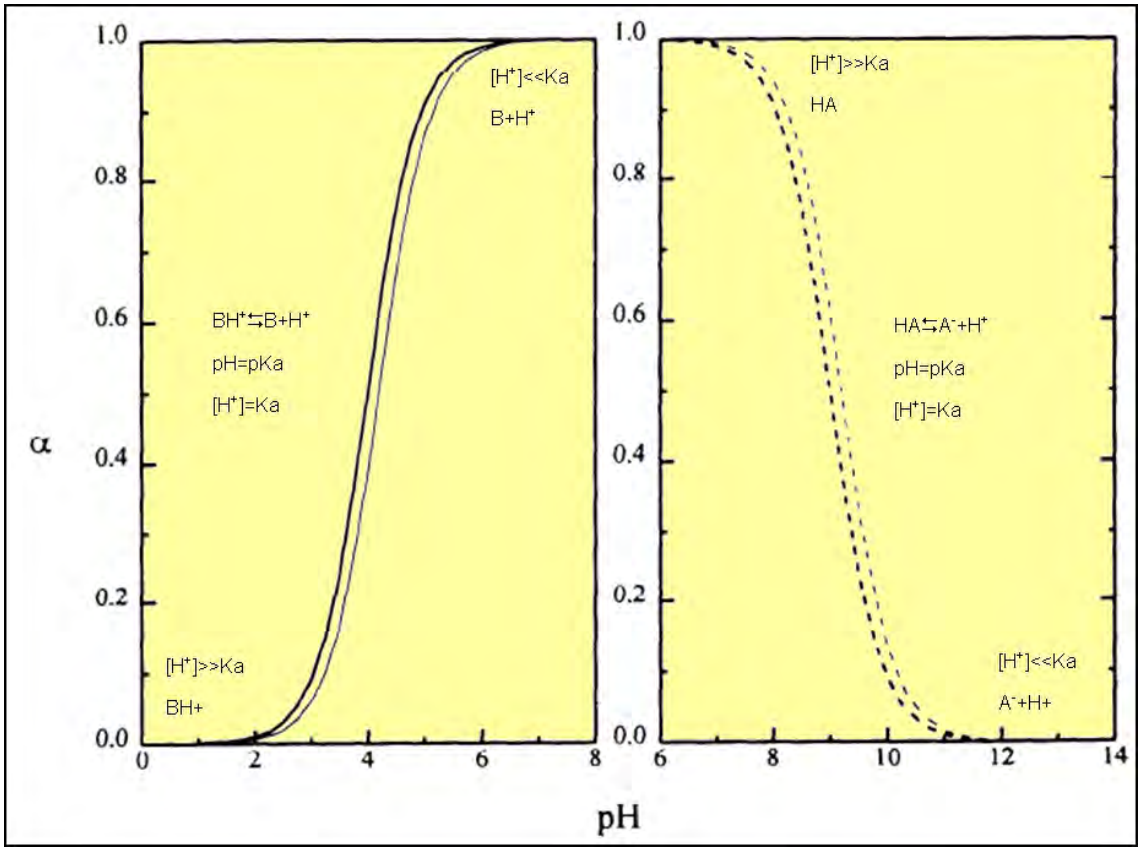


Figura 9. El efecto del pH en la retención de ácidos y bases. Grado de disociación de dos ácidos débiles y grado de protonación de dos bases débiles en función de pH. [6]

b. Efecto de la temperatura en CLAR.

La temperatura es una variable que afecta la estabilidad de la muestra, la resolución cromatográfica y la detección. El control de la temperatura en cada paso es esencial en CLAR. La llegada de la inyección automática ha significado que las muestras sean frecuentemente guardadas por periodos de horas a días esperando ser inyectadas. Muchas muestras son indefinidamente estables, aunque algunas otras, particularmente aquellas de origen biológico son altamente lábiles. Incluso simples compuestos sintéticos pueden descomponerse mientras esperan ser inyectados. Por consiguiente, la estabilidad de la muestra es esencial para el desarrollo del método por HPLC.

El tiempo de retención de un compuesto depende no solamente del tipo de fase estacionaria, sino también de la temperatura de la columna. Por esta razón es importante considerar la importancia de la temperatura en la separación por CLAR.

El resultado general de un aumento en temperatura es disminuir los tiempos de la retención de todos los picos en el cromatograma. Un ejemplo común en el cual la retención incrementa al aumentar la temperatura es en CFR o CII de proteínas. En este caso, el aumento de temperatura permite desdoblar e incrementar potencialmente los sitios de contacto para la adsorción. En CPG, el incremento en el volumen hidrodinámico asociado con el desdoblamiento puede disminuir la retención.

Esto se acompaña a menudo por una cierta disminución en la resolución de la muestra apenas como en el caso de aumentar la fuerza de elución. En otros casos, los picos dentro del cromatograma pueden cambiar sus posiciones relativas mientras que se varía la temperatura, y ésta conduce a alteraciones más complejas en la separación, en donde los tiempos de retención disminuyen y en ocasiones los equilibrios involucrados modifican y determinan el orden de elusión.

Los efectos de la temperatura en la eficiencia de la columna son extremadamente pronunciados en CFR. Un incremento de temperatura reduce el ensanchamiento de banda por la transferencia de masa intrapartícula, la transferencia de masa interfacial y la cinética de sorción, pero aumenta el ensanchamiento de banda por los efectos de la difusión longitudinal. En otras palabras, una temperatura elevada generalmente mejora la cinética de adsorción y desorción, pero el ensanchamiento de la banda se incrementa. Debido a la compleja interacción de estos diferentes factores, al aumentar la temperatura se ha observado una disminución de H en separaciones de moléculas pequeñas, mientras que para separaciones macromoleculares se ha observado lo contrario. Debido a estos efectos relacionados a la temperatura, es ventajoso llevar a cabo un control de la temperatura de la columna, ya que manteniendo constante la temperatura de la columna es más probable mantener la misma separación de forma

cotidiana, y dentro de un día. Si la separación es apenas adecuada en temperaturas más bajas, puede no ser aceptable en temperaturas más altas.

Las características de la fase estacionaria también se afectan por la temperatura. Fases con enlaces alquilo, son objeto de cambios irreversibles por la liberación hidrolítica de la fase enlazada desde el soporte. La hidrólisis se acelera a altas temperaturas. En fases poliméricas puede incrementar la penetración del disolvente en la partícula como consecuencia del hinchamiento, el cual puede provocar una degradación irreversible.

Varias moléculas, en particular grandes moléculas biológicas, presentan una conformación definida que es en función de la temperatura. A bajas temperaturas, una proteína globular, por ejemplo, está típicamente en una conformación compactada, sin exponer sus partes hidrofóbicas con el disolvente. Cuando la temperatura se incrementa, la proteína se desnaturaliza y el núcleo hidrofóbico queda expuesto. La forma desnaturalizada puede eluir con diferente tiempo de retención que la forma inicial. Si la transformación es lenta, dos distintos picos se pueden registrar. Si la transformación es rápida, un solo pico ancho podrá observarse entre los tiempos de retención de la forma inicial y la compactada. El cambio conformacional es especialmente importante en la cromatografía de proteínas en fases adsortivas hidrofóbicas.

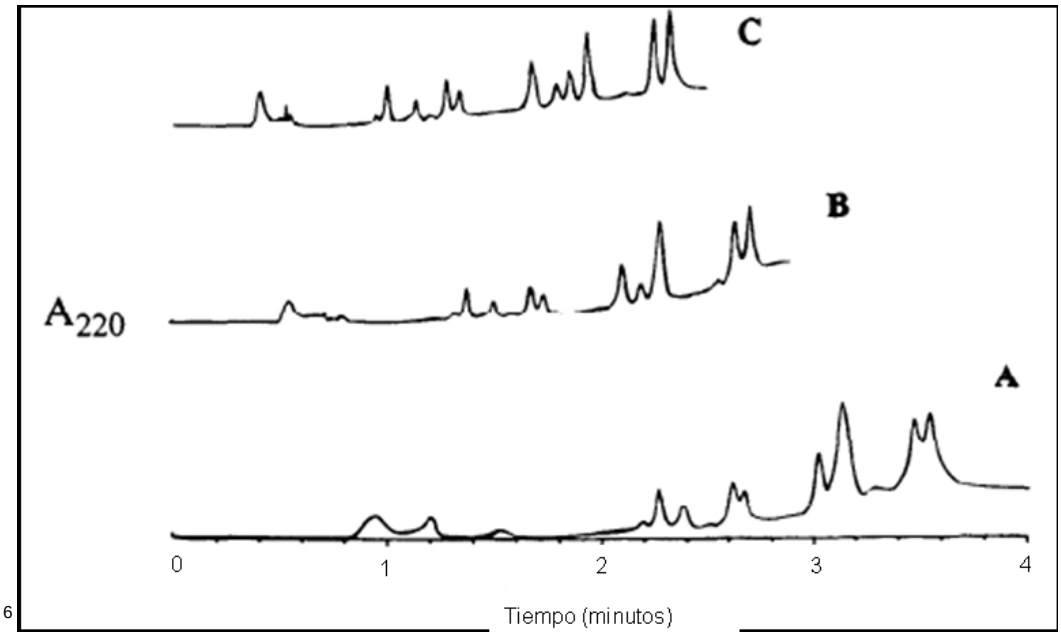
Los efectos de la temperatura en la respuesta del detector se pueden dividir en varias categorías. La respuesta del detector puede ser dependiente de la temperatura de sus componentes, esto es el porqué los detectores son normalmente calibrados antes del análisis. Los detectores de índice de refracción son los más sensibles a los cambios de temperatura. Los espectrofotómetros de luz UV-VIS han sido diseñados para ser insensibles a los efectos del índice de refracción. Debido a que un solo cambio de índice de refracción puede cambiar la absorancia de 100 mAU/°C, el control de la temperatura es importante para la detección UV-VIS de alta sensibilidad. También

puede cambiar el espectro de absorción UV, ocasionando cambios en los coeficientes de extinción relativos.

La temperatura puede no ser una variable importante en varias separaciones cromatográficas rutinarias, ya que las fluctuaciones en la temperatura ambiente son suficientemente pequeñas, que el efecto en la separación es imperceptible, aunque bajo ciertas circunstancias el control de la temperatura es crítico. Muchos compuestos lábiles pueden requerir este control para evitar descomposición dentro de la columna.

Para cromatografía quiral, la enantioselectividad, es seguida por una fuerte función de la temperatura. La disminución de la temperatura incrementa la enantioselectividad y reduce el tiempo de retención en la separación de β bloqueadores en una fase quiral estacionaria N-3,5-dinitrobenzoil-α-amino fosfonato. Para compuestos como naftaleno y difenil, la retención y resolución disminuyen con CFR. Figura 10.

Resumiendo, se puede decir que el control de la temperatura puede ser necesario en la autoinyección, elución y detección de la muestra. El control en la autoinyección es el principalmente importante para evitar la degradación de la muestra. La temperatura afecta la elución por los efectos de la eficiencia de la columna y selectividad y en la conformación del analito.[6]



6

Figura 10. Separación de citocromo *c* de conejo por CFR a alta velocidad A) 26°C; b) 42°C y c) 70°C.[6]

10. COMPONENTES DE LA CLAR

El equipo debe ser apto para resolver y trabajar con muestras de diferente tipo y realizar el máximo de operaciones, tales como, programación de fase móvil, recolección de fracciones a la salida de la columna, etc.

Para tener rapidez en el análisis es necesario contar con materiales de relleno de columna de alta eficiencia y que el instrumento posea sistemas de bombeo de alta presión para la fase móvil.

La reproducibilidad y estabilidad son características esenciales si se quiere obtener del instrumento un funcionamiento efectivo a largo plazo.

Debe proporcionar un control adecuado sobre los parámetros de operación, tales como el flujo de la fase móvil, la temperatura, presión, composición de la fase móvil, etc., y para ello debe contar con control de temperatura y flujo, sistema de bombeo de alta presión, programadores de fase móvil (gradiente), detector, etc.

Un buen instrumento, además de trabajar con pequeñas cantidades de muestra, debe generar señales de intensidad apreciables. La sensibilidad de todo cromatógrafo de líquidos depende sobre todo del sistema de detección que utiliza.

La instrumentación general para un cromatógrafo de líquidos incorpora los siguientes componentes:

a. <u>Recipientes.</u> Un recipiente para la fase móvil. Puede ser uno o más recipientes de vidrio, plásticos inertes o de acero inoxidable para la fase móvil, cada uno de los cuales contiene de 200 a 1000 mL de un disolvente.[6, 11]

La toma del disolvente generalmente se hace a través de un filtro entre 0.45-2 µm de porosidad, para remover pequeñas partículas que pueden obstruir y dañar el sistema de bombeo y la columna.

Es importante también considerar la desgasificación de la fase móvil, pues muchas veces, especialmente con fases móviles polares, hay una marcada tendencia del oxígeno y otros gases a disolverse en el líquido. Si estos gases se desgasifican dentro del instrumento y forman burbujas, pueden afectar seriamente el funcionamiento del detector y la eficiencia de la columna. Para realizar la desgasificación se pueden emplear diferentes instrumentos, la aplicación de vacío al recipiente que contiene la fase móvil mientras se agita con un agitador magnético, empleando un sonicador o bien empleando el modulo de desgasificación con que cuentan diferentes equipos.[15, 16]

b. <u>Sistema de bombeo.</u> El cual se considera el componente más importante de la cromatografía de líquidos ya que impulsa a la fase móvil hacia el inyector y permite el arrastre de la muestra a través de la columna de manera exacta y precisa. Las columnas utilizadas están rellenas de materiales especiales de partículas muy pequeñas, lo cual hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevada.[6, 11.]

Los aspectos más importantes en el sistema de bombeo son:

- Químicamente inerte.
- Presión máxima de operación. (5,000 psi).
- Intervalos de volúmenes obtenibles (entre 0.5 y 10 mL/min).
- Reproducibilidad y constancia del flujo (aproximadamente 1 %).
- Características del flujo (gradiente, cambio rápido de disolvente).

También es importante que tengan resistencia a líquidos corrosivos, así como la facilidad para efectuar el cambio de fases móviles y la limpieza del sistema.[15,17]

Existen diferentes tipos de bombas:

- Pistón reciprocante (las más comunes).
- Pistón reciprocante de doble cabeza.
- Bombas de jeringa (más empleadas en SFC y micro CLAR).[17]

c. <u>Sistema de inyección.</u> Es un sistema manual o automatizado, el cual permite introducir la muestra en solución través de bucles de muestra sin interrumpir el flujo del disolvente. Estos dispositivos son normalmente una parte integrada del equipo cromatográfico y pueden ser bucles intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestra desde 5 a 500 µL.[6]

Las muestras deben ser introducidas en la entrada de la columna con un mínimo de turbulencia. Para lo cual hay dos modos de trabajo:

- Flujo detenido.
- Flujo de disolvente

Hay tres tipos básicos de inyectores:

1. *<u>Flujo detenido</u>.* Se hace una inyección a presión atmosférica, el sistema es cerrado y el flujo es reiniciado (generalmente el sistema mantiene la presión en operación).

Esta técnica es empleada porque la difusión en líquidos es pequeña y la resolución generalmente no es afectada.

2. *Septum.* Son inyectores semejantes a los empleados en cromatografía de gases. Estos inyectores son usados a presiones de 60-70 atm. Desafortunadamente, el septum no es compatible con todos los disolventes empleados en cromatografía de líquidos. Además las pequeñas partículas de gotas en el inyector pueden provocar problemas para entrar. [15]
3. *Válvulas loop.* Este tipo de inyector es el empleado más comúnmente para volúmenes más grandes de 10 µL y frecuentemente son usados en sistemas automatizados. En la posición de llenado, la muestra en el loop es llenada a presión atmosférica, cuando la válvula es abierta, la muestra en el loop se pasa a la columna.[16] Las válvulas inyectoras se fabrican solo de materiales inertes, como el teflón y el acero inoxidable, y su diseño es tal que resisten presiones muy elevadas.

d. Precolumnas. En ocasiones para aumentar la vida media de la columna analítica, se coloca una precolumna que elimina no solo las partículas en suspensión y los contaminantes de los disolventes, sino también componentes de la muestra que se unen irreversiblemente a la fase estacionaria.[6]

e. Columna de separación. Son tubos largos de acero inoxidable que contienen el empaque necesario para efectuar la separación deseada y son capaces de resistir altas presiones.[11]

La capacidad de la columna depende de su longitud, diámetro y material de relleno.[15] La longitud óptima de la columna que es requerida para una particular separación, es dictaminada por el número de platos teóricos necesarios para dar una resolución deseable. Si la columna es muy pequeña, entonces claramente la columna no tendrá suficiente “capacidad de resolución” para llevar a cabo la separación y si esta es muy larga el tiempo de análisis será muy largo. Las longitudes de columnas más comunes utilizados en CLAR oscilan entre 5-25 cm de longitud.

A finales de los años 70's las columnas de CLAR fueron a menudo empacadas con partículas de 10 µm (o incluso 20µm). Actualmente, la mayoría de separaciones por CLAR son llevadas a cabo con materiales de empaque donde el DI es de alrededor de 0.5-4.6 mm. Este diámetro no surge por casualidad, cuando un soluto es inyectado dentro de la columna se extiende axialmente (en dirección perpendicular al flujo) a la cama de la columna. Si se extiende bastante lejos en esa dirección, alcanzara la pared interior de la columna. En esta región incluso las columnas mejor empacadas tendrán algunas irregularidades en su empaque, las cuales pueden contribuir al ensanchamiento a la banda cromatográfica, y además una reducción en la eficiencia. Esa región de empaque irregular puede ser reducida, inicialmente por el uso de columnas con superficies internas pulidas, pero nunca pueden ser eliminadas completamente. Partículas más pequeñas darán una región irregular más pequeña en la pared de la columna, pero esta operación afectara directamente a la presión del sistema.[18]

El uso de estas últimas columnas tiene ventajas cuando nos referimos a la CLAR analítica. Por ejemplo: tienen una alta sensibilidad (hasta 100 veces más), son más rápidas y, al usar menos cantidad de disolventes, son también más económicas (hasta 100 veces menos de disolvente).

Los factores que afectan la eficiencia de una columna son los siguientes:

- Longitud de la columna.
- Diámetro de la columna.
- Tamaño de partículas del empaque de la columna.
- Naturaleza de las fases.
- Cantidad de fase estacionaria.
- Temperatura de la columna.
- Velocidad de flujo.
- Cantidad de muestra inyectada.
- Material del cual fue elaborada la columna.

- Empaquetado de la columna.
- Viscosidad del disolvente.[19]

Actualmente existe una gran variedad de columnas de fase reversa, las cuales han sido tratadas químicamente para elevar su eficiencia y son también más específicas para diferentes compuestos, la más común es la C18 (empaque con soporte de sílice unida covalentemente a una cadena de 18 carbonos) la cual es estable.[14, 15]

El material comúnmente más usado para el empaque de columnas para CLAR es la sílice. Puede ser usada sin modificación o derivada químicamente en los grupos silanoles, permitiendo que la superficie química sea alterada para obtener diferentes modos de cromatografía.

Preparada comúnmente por la hidrólisis ácida del silicato de sodio seguida por la emulsificación de una mezcla de alcohol-agua y una subsecuente condensación para obtener un gel sólido de sílice. Esta es entonces lavada y secada para usarse como empaque en las columnas para CLAR. Las condiciones específicas bajo las cuales este procedimiento es llevado a cabo (pH, catálisis, temperatura) afectaran las propiedades del material resultante. [19]

La selección de la columna debe realizarse de acuerdo a la complejidad del analito y la matriz empleada, pues esta una parte muy susceptible de saturarse por impurezas de la matriz o concentración empleada del analito. Figura 9.

Últimamente se ha mejorado la tecnología para empaquetar las columnas, lo que ha permitido fabricar columnas de menor DI, longitud total y tamaño de partícula empacada.

Las columnas pueden ser tan estrechas como 1 mm (generalmente llamadas columnas microboro). También hay columnas capilares de sílice fundida (320 µm; DI). Sin embargo, el uso de estas columnas exige la utilización de un equipamiento especial designado o modificado para manejar muy pequeños volúmenes. Tamaño de partículas

tan pequeñas como 1 µm pueden ser usadas, aunque su aplicación es un poco más especializada.

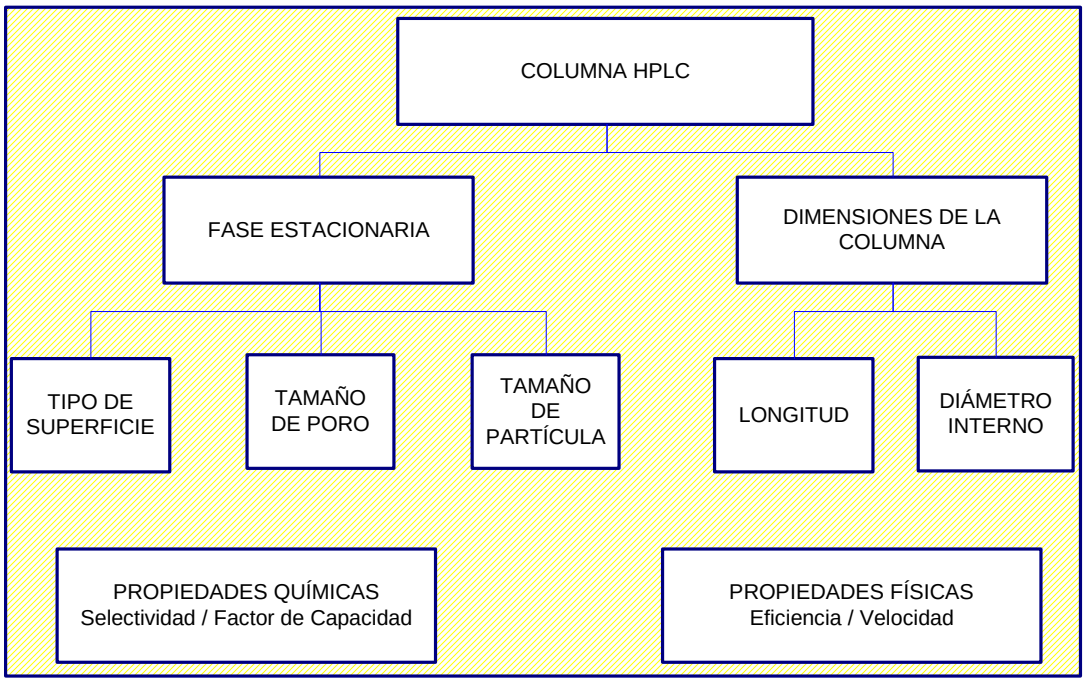


Figura 11. Características de las columnas para CLAR según sus propiedades fisicoquímicas.[19]

Cuando el tamaño de partícula disminuye, la presión requerida para mantener cualquier velocidad de flujo dado se incrementa. Con columnas convencionales y con los tamaños de partícula mencionados anteriormente, las presiones de operación varían de aproximadamente de 250 psi a 5000 psi dependiendo de factores tales como la viscosidad de la fase móvil y la velocidad de flujo. Esto hace que además de la demanda del empaque de la columna debe ser capaz de resistir las presiones de operación sin un daño estructural.

Además de los requisitos para la producción de partículas pequeñas, uniformes, porosas y rígidas, una fase estacionaria para la CLAR debe ser fácilmente disponible en una forma pura y debe ser químicamente resistente a los disolventes usados como fases móviles (idealmente debería ser estable a todos los valores de pH). Como es a menudo encontrar en la CLAR, no hay materiales únicos los cuales cumplan con todos

los criterios, pero una variedad de soportes son usados, cada uno con sus ventajas y desventajas.

f. <u>Fase Móvil.</u> Aún cuando la fase móvil no es parte del instrumental, el control de la presión, el flujo y la composición de la misma, son muy importantes.[15]

La composición del disolvente o fase móvil es una de las variables que influencia la separación, por ello es importante conocer las características:

- Que esté disponible comercialmente.
- Precio.
- Pureza y estabilidad, que no presente contaminantes. En la actualidad contamos con productos de grado cromatográfico. Bajo contenido de impurezas
- No degradar o disolver la fase estacionaria.
- Miscible con otros disolventes para formar mezclas útiles.
- Ser compatible con el detector. Transparencia óptica (cuando se usan detectores UV).
- Disuelva la muestra
- Que tenga baja viscosidad para reducir las caídas de presión.[16]
- Que tenga una polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna.[15, 16]

Es indispensable que la muestra sea soluble en la fase móvil para que pueda ser transportada a través de la columna. Cuando se introducen muestras en disolución, puede presentarse precipitación de la muestra dentro de la cámara de inyección o en la columna si el disolvente de la muestra y la fase móvil son muy diferentes en polaridad. Esto causaría pérdida de resolución en la separación por lo que se deben seleccionar con cuidado.

La baja viscosidad de la fase móvil es muy importante en la eficiencia de la separación, ya que influye en el efecto de transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria. La fase móvil debe ser compatible con el detector empleado lo que es particularmente importante en el caso de programaciones de la fase móvil, puesto que el cambio de composición de ésta puede afectar el funcionamiento del detector; debe ser de alta pureza, usualmente de grado espectroscópico o bien grado cromatográfico.[15]

Todos los disolventes de grado cromatográfico, son filtrados cuidadosamente antes de ponerse a la venta, sin embargo, pueden acumular partículas en suspensión que pueden perjudicar a los componentes del sistema CLAR. Estas partículas en suspensión pueden venir de varias fuentes, incluso de la exposición al polvo en el aire durante el trasvase al depósito para disolvente, la exposición a partículas del aire durante el almacenamiento del disolvente en el depósito o la degradación lenta del recipiente.

Las partículas suspendidas pueden ocasionar costosos daños a la bomba, a las precolumnas, y en general causar desgaste del sistema de CLAR. Los fabricantes de equipo cromatográfico tienen en cuenta este problema y recomiendan que se filtre y desgasifiquen los disolventes antes de usarlos. En el instante que se abre un nuevo recipiente de disolvente grado cromatográfico, se expone el interior de este a la atmósfera y empieza a acumular gases disueltos. El oxígeno disuelto que constituye el 21% de la atmósfera puede producir mayor interferencia en los detectores de fluorescencia y electroquímicos.

El nitrógeno disuelto es el otro componente de la atmósfera que puede producir burbujas en la columna analítica y cuando el disolvente entra al detector produce picos falsos y desviaciones de la línea base. El anhídrido carbónico disuelto generalmente es la causa de los cambios de pH en la fase móvil.

Existen tres métodos comunes que se utilizan hoy para la filtración previa de los disolventes grado cromatográfico:

1. Filtro a la entrada del disolvente.
2. Filtración al vacío.
3. Filtración en línea

Por otro lado, existen cuatro métodos comúnmente usados para desgasificar disolventes grado cromatográfico:

- Sonicación.
- Burbujear Helio.
- Degasificación electrónica en la línea del flujo.
- Desgasificación al vacío en línea.

g. <u>Detector.</u> Es la parte del sistema que permite observar y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna.[6]

Está conectado a la salida de la columna al monitor en tiempo real. El detector puede ser el más sofisticado y uno de los más caros componentes del sistema cromatográfico.[16]

Existen diferentes tipos de detectores y se emplean de acuerdo a las características de los compuestos y tipo de elución que depende del método analítico. De esta forma pueden clasificarse como detectores de:

- UV- VIS: Longitud de onda fija y Longitud de onda variable
- Dispositivo de Diodos
- Índice de Refracción
- Fluorescencia
- Electroquímica
- Electroforesis Capilar

- Dispersión Láser
- IR transformada de Fourier
- Conductividad
- Masas y Masas/Masas

El detector transforma las señales iónicas, moléculas ópticas entre otros, en señales eléctricas las cuales son proporcionales a la cantidad de analito que se encuentra en ese momento en el detector. Esta señal es entonces procesada por un integrador, el cual es empleado para la cuantificación del analito presente.

Los detectores pueden ser también clasificados en dos grandes categorías:

1. **Detectores de propiedades de masa.** Los detectores de propiedades de masa responden por algún cambio en ciertas propiedades físicas en el eluyente, donde esta propiedad es común en la fase móvil y en el analito. Esta magnitud es alterada por la presencia del analito y es donde surge la detección y cuantificación. Un ejemplo es el detector de índice de refracción.
2. **Detectores de propiedades del soluto.** Los detectores de propiedades del soluto responden a ciertas propiedades únicas del analito, tales como la fluorescencia, actividad electroquímica, con absorción pequeña o sin contribución de la fase móvil, entre otros.

El detector debe tener ciertas propiedades generales como:

- Respuesta. Debe proporcionar una respuesta con la cual se identifique el compuesto a cuantificar.
- Sensibilidad. La cual es variable y depende del la muestra. Está limitada por el nivel del ruido del instrumento.
- Ruido. Es la variación de la señal del instrumento que no es atribuida a la muestra y que puede ser producida por fallas electrónicas, variaciones de

flujo o temperatura, fluctuaciones en el voltaje, burbujas de aire atrapadas en el detector, etc.

- Linealidad. Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, dicha señal debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra.
- Estabilidad. Debe ser insensible a los cambios de temperatura y a la variación de flujo a la vez que ser compatible con programaciones de la fase móvil.[15]

El propósito de los detectores en un sistema CLAR es identificar la presencia de ciertos componentes de interés en el eluyente. Dentro del detector el analito sufre algunas interacciones fisicoquímicas, por las cuales el analito es reconocido.

El detector más común es el de absorción UV-visible. Su funcionamiento se basa en la absorción de luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta. La respuesta de éste detector es selectiva, ya que sólo se detectarán los compuestos que absorban la luz de la longitud de onda a la que opera el detector.[15]

El detector UV-visible tiene las siguientes características:

- Es el adecuado para fármacos que poseen grupos cromóforos con gran absorción (también se utilizan para derivados que posean estas características) que puedan ser de longitud de onda fija, más sensibles y estables, o variable.
- Aunque la sensibilidad no es muy buena comparada con otros tipos de detectores (por ejemplo de fluorescencia o electroquímica), la sensibilidad es suficiente para la mayoría de análisis por CLAR.
- La simplicidad de su diseño y economía significa que los detectores de absorbancia por UV no son generalmente caros en comparación con otros equipos de detección.

Tabla 5. Propiedades de algunos detectores en CLAR[15]

Detector / Propiedad	Sensibilidad	Selectividad	Rango de aplicación	¿Caracteriza al soluto?	Gradiente de elusión	Costo relativo
UV-VIS	★★	★★	★★★	★	★★	★
UV-Vis Espectrofotométrico	★★	★★★	★★★	★★	★★	★★
Fluorescencia	★★★	★★★	★	★★	★★	★★★
Índice de Refracción	★	★	★★	★	NO	★★★
Electroquímico (Amperométrico)	★★★	★★★	★	★★	★	★★★
Espectrometría de Masas	★★★	★★★	★★	★★★	★★★	★★★

★ Bajo/Pobre; ★★ Moderado; ★★★ Alto/Bueno

h. <u>Registrador.</u> Es el sistema que se encarga de la captura, procesamiento y almacenamiento de datos, el cual puede ser un integrador o una computadora con el software adecuado para el procesamiento de datos cromatográficos. [6, 12, 14]

Figura 12. Componentes básicos en un sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

11. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

Estos parámetros definen en forma matemática las características del proceso cromatográfico y son obtenidos a través del cromatograma de la separación específica.

Se describen a continuación cada uno de los parámetros cromatográficos:

a. **Coeficiente de reparto (K).** Cuando un soluto entra al sistema cromatográfico inmediatamente se reparte o distribuye entre la fase móvil y la fase estacionaria. Si la fase móvil se para en cualquier momento, el soluto establece un equilibrio de distribución entre las dos fases. La concentración en cada fase está dada de por el coeficiente de reparto: [34]

$$K = \frac{C_E}{C_M}$$

Donde:
CE= Concentración de soluto en la fase estacionaria (mol/L)
CM= Concentración de soluto en la fase móvil (mol/L)

b. **Factor de capacidad (k´).** Es la relación para describir las velocidades de migración de los analitos en las columnas y se interpreta considerando que mientras mayor sea el valor de este factor menor es la velocidad de migración de los solutos en la columna.

Es un parámetro que describe la velocidad de migración de los analitos en la columna.

La k´ debe tener valores de 2 a 5. Si el valor es superior los tiempos de retención son demasiado largos.

Cuando k´ es pequeño (0-1), este factor indica resolución limitante y valores de (2-10) mejoran la resolución.

$$k' = \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$$

c. **Ecuación de Van Deemter.** La forma de los picos cromatográficos es influenciada por tres procesos que son: la difusión de remolino, la difusión longitudinal y la transferencia de masas. Las magnitudes de estos cambios están influenciadas por la velocidad de flujo, el tamaño de partícula del material de empaque, las velocidades de difusión y el grosor de la fase estacionaria. [25]

La ecuación de Van Deemter relaciona estos fenómenos con la velocidad lineal de flujo (u) y la altura del plato (H).

$$H = A + \left(B/u \right) + Cu$$

Donde:
A = Difusión Remolino ó Direcciones de flujo múltiples.
B = Difusión longitudinal.
C = Contribución de masa.
u = Es la velocidad de la fase móvil que pasa por la columna.

d. **Tiempo muerto (t_0).** Tiempo que tarda en eluir un compuesto que no es retenido en la fase estacionaria, que es el mismo que tarda la fase móvil en salir de la columna. Se puede calcular inyectando un disolvente más débil que la fase móvil (o un compuesto que no sea retenido, en fase reversa se usa uracilo) y calculando su tiempo de retención.

e. **Tiempo de retención (tR).** La retención neta de un analito es una función de las interacciones del soluto-fase estacionaria, soluto-fase móvil e interacciones fase móvil-fase estacionaria que contribuyen a la retención. La retención neta de un analito es igual a la suma del tiempo gastado en la fase móvil t_o, y al tiempo gastado en la fase estacionaria, t_S:

$$t_R = t_S + t_0$$

Lo que significa que es el tiempo que tarda en aparecer el máximo del pico en la elución de un compuesto o tiempo que tarda un compuesto en salir de la columna.[36]

Si todas estas interacciones con la fase estacionaria son constantes, entonces la retención y la selectividad son solamente funciones de la composición de la fase móvil. Una fase móvil sencilla generalmente puede ser compuesta de una mezcla de dos disolventes: un disolvente débil A y un disolvente fuerte B. por ejemplo, un eluyente típico en fase reversa puede consistir de una mezcla de agua, el disolvente débil en un sistema de fase reversa, y un modificador fuerte orgánico tal como metanol o acetonitrilo. De manera similar, un eluyente en fase normal, típicamente consiste de una mezcla de un disolvente débil como *n*-heptano y un modificador fuerte tal como cloroformo o etil acetato.

$$t_R = t_0 + (1 + k')$$

f. <u>Tiempo de retención reducido (t'_R).</u> Es el tiempo de retención menos el tiempo muerto.

g. <u>Resolución (R).</u> Es una medida numérica del grado de separación de dos compuestos, en este término si se toma en cuenta el ensanchamiento de los picos, así que la magnitud de este valor si permite asegurar la separación de dos picos. Establece la eficiencia del sistema.[30]

$$R = 2\frac{(t_2 - t_1)}{(w_2 + w_1)}$$

Donde:
t_2 y t_1= tiempos de retención.
w_2 y w_1= altura de los picos, obtenidos extrapolando los lados de los picos hasta la línea base equivalentes a 4σ.

Si R>1,5 la separación es total. La resolución es una variable adimensional por lo tanto el t_R y W deben estar en las mismas unidades.

Factores que afectan la resolución:

- Para incrementar la resolución se incrementa la longitud de la columna.
- Utilizando una fase fija constituida por partículas de menor tamaño.
- Disminución del diámetro de la columna.
- Disminución del tamaño de muestra.
- Selección adecuada de la fase móvil.
- Selección adecuada de la fase estacionaria.
- Empaquetamiento regular de la columna. [35]
- La velocidad de flujo tiene un efecto considerable sobre el tiempo de retención de los constituyentes de la muestra. A mayor velocidad de flujo menor tiempo de retención. La velocidad de flujo más rápida puede o no mejorar la forma del pico, pero la correlación velocidad de flujo-tiempo de retención es invariable.[28]
- Incrementando la temperatura de la columna decrece el tiempo de retención para todos los constituyentes de una muestra. Además se tiende a obtener mejores separaciones aumentando la temperatura de la columna. [37]

h. **<u>Volumen de retención (VR).</u>** Se le denomina al volumen de fase móvil requerido a eluir una sustancia de la columna.

$$V_R = t_R * F$$

Donde:
t_R=Tiempo de retención
F= Flujo

i. **<u>Volumen muerto (V_0).</u>** Es el volumen de fase móvil en la columna, el cual depende adicionalmente del volumen extracolumna hasta llegar al detector.

$$V_0 = 0.65 \frac{\Pi D^2 L}{4}$$

Donde:
D= Diámetro de la columna.
L= Longitud de la columna.
0.65= 65% del volumen de la columna.

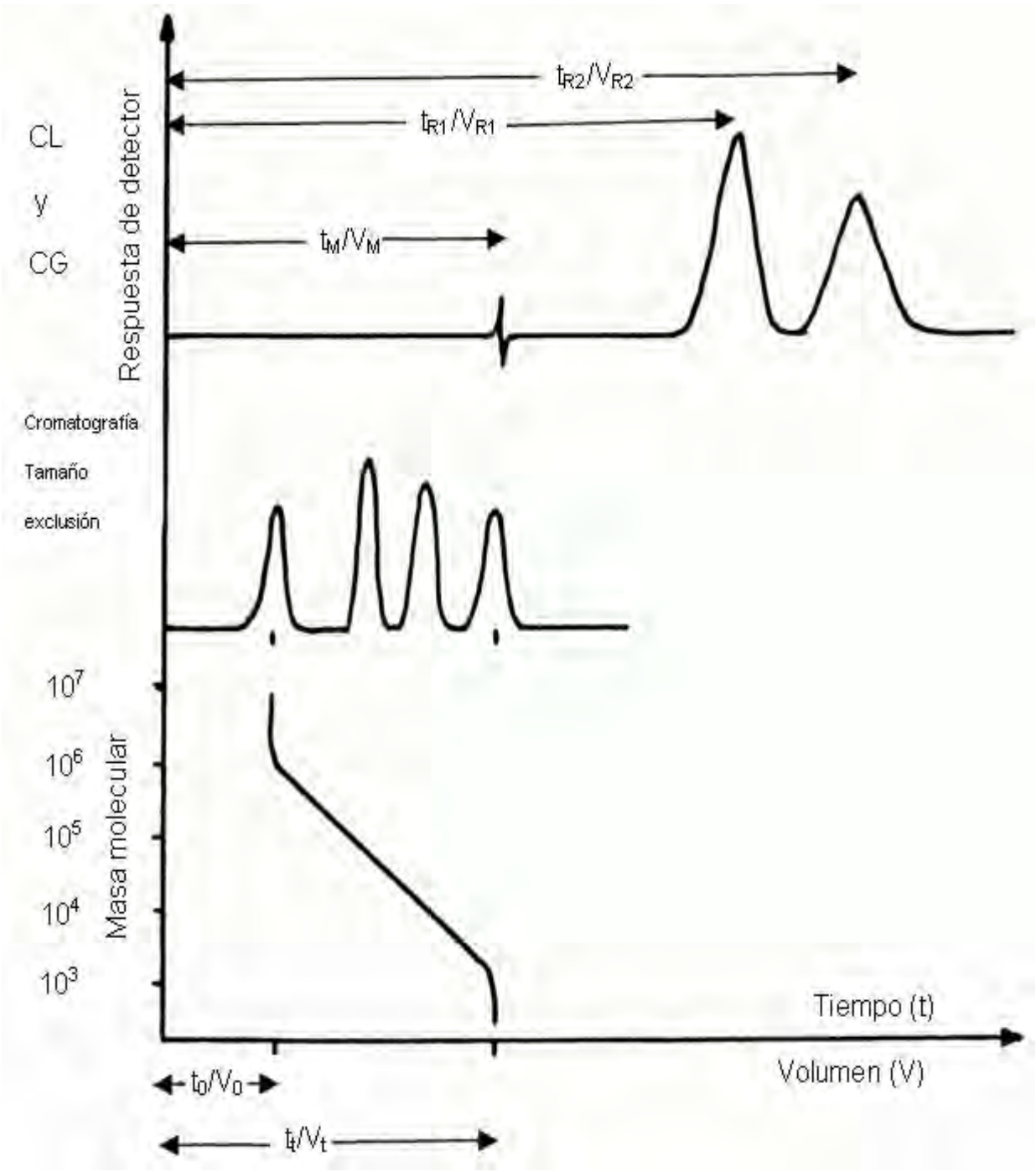


Figura 13. Porción de un cromatograma registrando picos Gausianos mostrando t_R en diferentes tipos de cromatografías.[13]

j. <u>Factor de Selectividad (α).</u> El factor de separación o retención relativa también llamado selectividad, α describe la posición relativa de dos picos adyacentes en un cromatograma. Para su cálculo se utiliza los tiempos de retención corregidos, ya que la separación de los picos depende de la interacción selectiva con la fase estacionaria, es decir el tiempo que permanecen en esta fase, y no el tiempo que emplean en recorrer la columna a la velocidad de la fase móvil.

La selectividad de un sistema depende de la naturaleza de cada uno de los componentes, fase móvil, columna y muestra, de su afinidad mutua y del modo en que interaccionan entre si.[36, 39]

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \qquad \alpha = \frac{(t_2 - t_1)}{(t_1 - t_0)}$$

Donde:
t_1 y t_2= tiempos de retención.
k'_B= Factor de capacidad del compuesto B, que es el más retenido.
k'_A= Factor de capacidad del compuesto A, que es el menos retenido.

k. <u>Factor de asimetría (As).</u> La asimetría (tailing) es una de las formas más comunes de alejamiento de la curva Gaussiana y su medición es importante puesto que puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a errores considerables de cuantificación, e incluso a oscurecer picos adyacentes.[30]

Uno de los problemas frecuentemente en cromatografía es el tailing o asimetría, que puede ser anterior o posterior respecto al máximo de retención (As<1 o As>1 respectivamente). La asimetría es normal en la cromatografía. Los picos perfectamente gaussianos son realmente infrecuentes, pero es la magnitud de la desviación de ese ideal la que determina que pueda o no tolerarse.[40]

Resumiendo, es el grado de coleo o asimetría de los picos, esto se puede observar cuando T es mayor a 1, y también se puede observar el factor de cabeceo cuando T es menor a 1.

$$As = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

Donde:
$W_{0.05}$ = ancho del pico medida al 5.0% de su altura.
f = ancho del pico medido a partir del inicio del pico hacia la mitad de este a nivel de línea base.

Figura 14. Porción de un cromatograma registrando picos Gausianos donde se muestra la asimetría.[12]

I. <u>Número de Platos Teóricos (N).</u> Se considera que una columna cromatográfica está compuesta por una serie de estrechas capas horizontales y contiguas separadas, a las que se les denomina plato teórico. En cada uno de ellos tiene lugar el equilibrio fisicoquímico del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria; el movimiento del soluto, en el desarrollo cromatográfico, consiste en una serie de transferencias sucesivas de un plato al siguiente. Refleja el número de veces que el soluto se distribuye entre las dos fases durante su paso a través de la columna.

A un valor alto de N, se mejora la calidad de pico. El número de platos teóricos de una columna, para un analito, se mide en función del tiempo de retención (t_R) y de la anchura del pico (Wb).[38]

El número de platos es indicativo de la eficiencia del empaque de la columna.[34]

Se puede decir que cuántos más anchos sean los picos menor número de ellos podrán resolverse en el mismo intervalo de tiempo, y por tanto podrán separarse menos componentes de la muestra. En otras palabras, cuanto más puntiagudos sean los picos, mejor es la columna. Establece la separación del compuesto.

$$N = \frac{L}{H} \qquad N = 16\left(\frac{t_R}{W_b}\right)^2$$

Donde:
N= Número de platos teóricos.
t_R= Tiempo de retención.
Wb= Ancho del pico 4σ.
L= Longitud de la columna.
H= Altura del plato.

Variables que afectan la eficiencia:

- La eficiencia de la separación aumenta cuando el número de platos teóricos aumenta y disminuye la altura del plato.
- *Longitud de la columna:* Al aumentar la longitud de la columna, aumenta el números de platos y la eficiencia aumenta.
- *Viscosidad:* Al disminuir la viscosidad, aumenta el números de platos y disminuye la altura del plato.
- *Tamaño de la partícula:* A menor tamaño de partícula, aumenta el número de platos y disminuye la altura del plato, logrando mayor eficacia de la columna.

m. **Longitud de la columna (L).** La longitud de la columna L está dividida en N equilibrios individuales de una misma altura H, numerados de 1 a n. El cálculo se puede obtener a partir de la eficiencia.[36]

$$L = N * H$$

n. **Altura Equivalente a un Plato Teórico.** Es una medida de la eficiencia de la columna que involucra al número de platos teóricos (N) y la longitud de la columna (L) Este parámetro se calcula para compuestos de referencia, ya que permite comparar columnas de longitud diferente, aunque no se trate de un valor constante.

Cuanto menor sea la altura del plato teórico (H) mayor será el número de platos teóricos en una columna cromatográfica y consecuentemente mayor será la eficacia de la misma. La medida cuantitativa de la eficiencia se hace mediante la altura de plato teórico (H). Por ello las separaciones de buena calidad se asocian con pequeños valores de H[38]:

$$H = \frac{L}{N}$$

o. **Altura de plato reducida (h).** En las cromatografías donde la fase móvil es un liquido y para las columnas cuyo relleno está formado por partículas esféricas, se aplica frecuentemente la altura de plato reducida h, que tiene en cuenta el diámetro medio de partículas d_m. Esto permite comparar la eficiencia de las columnas rellenas de partículas de tamaño diferente. Las columnas que tienen la misma relación presentan rendimiento similar.

$$h = \frac{H}{dp}$$

Donde:

h= Altura de plato reducida
H= Altura del plato
dp= Diámetro de partícula

Si h ≤ 3 Columna buena
4≤ h ≥ 5 Aceptable
≥ 6 Columna muy deteriorada

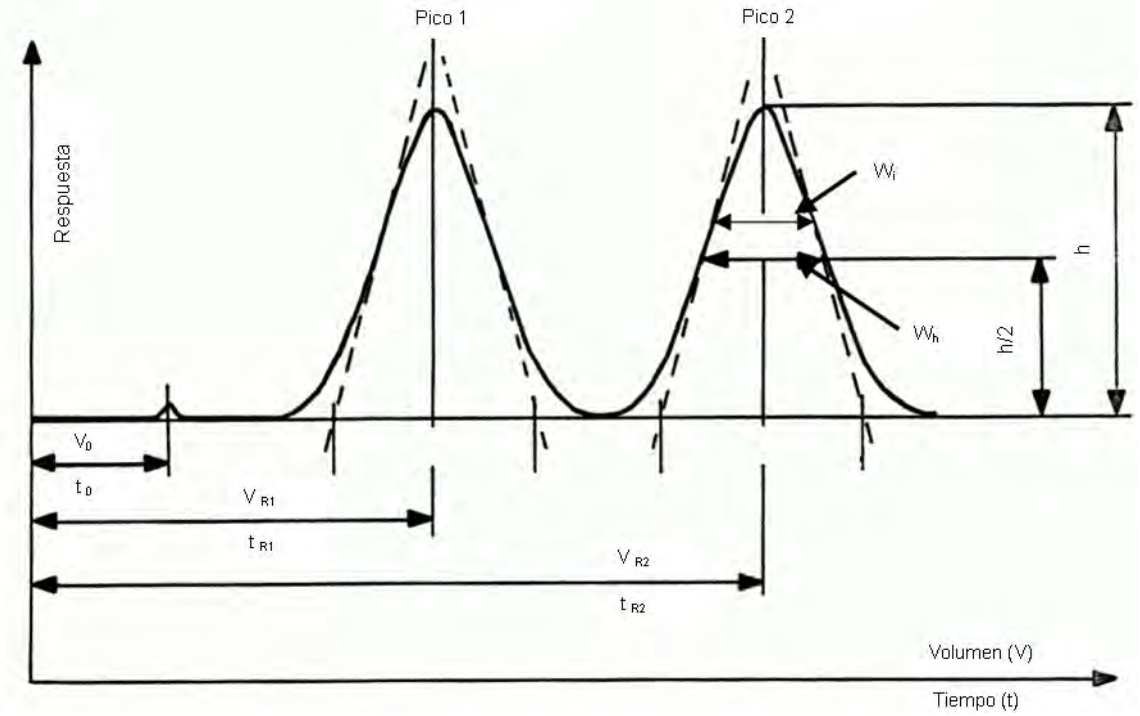


Figura 15. Porción de un cromatograma registrando picos Gausianos con sus respectivos parámetros cromatográficos.[13]

p. **<u>Velocidad lineal (u).</u>** La velocidad lineal, de la fase móvil, se mide con el tiempo de transito de un soluto no retenido, t_M. En cromatografía interactiva ningún material puede eluir antes de este tiempo. Las unidades resultantes de la velocidad lineal son cm/s.[34]

$$u = \frac{L}{t_0}$$

Donde:
L= Longitud de la columna
T_0= Tiempo muerto

12. ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

La adecuabilidad del sistema son pruebas utilizadas para verificar que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia entre otros) funciona correctamente, con base en criterios establecidos previamente, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.[12]

Las pruebas de adecuabilidad del sistema se basan en el concepto de que: el equipo e instrumentos de medición, las operaciones analíticas y las muestras que van a ser analizadas constituyen un sistema integral, que puede ser evaluado como tal. Las características que se establecen como representativas de la adecuabilidad, dependen del tipo de método a ser evaluado. Éstas son importantes especialmente en el caso de los métodos cromatográficos.[9]

Determinación: Inyectar por quintuplicado la solución del analito. Reportar la respuesta del analito, calcular el CV y para cada inyección determinar:

- Factor de capacidad (k´)
- Resolución (R)
- Factor de coleo
- Numero de platos teóricos (N)

Criterios de aceptación

- CV ≤ 2% para la respuesta analítica
- k´>2
- R>2
- Factor de coleo <2
- N>2000

13. PREPARACIÓN DE MUESTRA.

La preparación de la muestra es una etapa decisiva en todo método de análisis, en especial en la determinación de microcomponentes (trazas) en donde la matriz que rodea al analito es muy compleja, esto depende de varios factores que se mencionan a continuación:

1. Propiedades físicas y químicas del analito.
2. Concentración de analito en la muestra.
3. Naturaleza de la matriz en la muestra.
4. Forma en la que se presenta el analito en la muestra.
5. Compatibilidad de los medios de solubilización y extracción con el sistema cromatográfico.
6. Tipo de detector.
7. Compatibilidad con el detector. [27]

a. Tratamiento Previo.

La naturaleza de la muestra dicta el modo básico de preparar la solución a inyectar. Si la muestra es líquida puede inyectarse directamente previa filtración, en cambio si es un sólido es necesario molerlo y homogeneizarlo apropiadamente, y posteriormente las sustancias a analizar presentes en la matriz sólida deben solubilizarse en un solvente adecuado. Estos disolventes deben seleccionarse por su poder solubilizante del analito y su bajo poder solubilizante de los componentes de la matriz de la muestra o de aquellas sustancias que puedan dañar las columnas o el equipo cromatográfico.

Tanto para el tratamiento previo de las muestras, como para posteriores pasos de purificación pueden utilizarse todas las operaciones conocidas de la química analítica como: liofilización, evaporación, filtración, centrifugación, precipitación y solubilización.

b. Desproteinización.

Las proteínas presentes en las matrices biológicas deben eliminarse antes de inyectar la muestra en el equipo para evitar que precipiten dentro. Esta operación se denomina desproteinización.

La desproteinización es una forma particular de la separación de sustancias por precipitación. Se realiza agregando varios agentes, entre ellos: solventes orgánicos, sales, ácidos o cationes, o bien por ultrafiltración. Los solventes orgánicos como el MeOH, ACN o EtOH agregados a una solución acuosa de una proteína, disminuyen su solubilidad y, en condiciones adecuadas, inducen a su precipitación. Cuanto menor sea la polaridad del disolvente agregado mejor será su capacidad de desproteinización.

c. Extracción Líquido-Sólido.

La extracción líquido-sólido, también llamada lixiviación, comprende la solubilización del analito presente en una muestra sólida previamente molida con un disolvente adecuado, con la ayuda de agitación. Las características del disolvente de solubilización, la cantidad de extracciones, la velocidad y el tiempo de agitación dependerán tanto de las características del analito como de la matriz que lo rodea. Un tipo especial de extracción líquido-sólido emplea sistemas continuos con disolventes calientes (Soxhlet) y se aplican a analitos poco solubles o a matrices muy complejas.

d. Extracción Líquido-Líquido.

La extracción líquido-líquido es la distribución de una analito entre dos líquidos inmiscibles. Esta técnica es una operación muy lenta y tediosa, muy dependiente de la habilidad del operador y que está expuesta a numerosos problemas (formación de emulsiones, manipulación de grandes cantidades de disolventes tóxicos e inflamables, peligro en evaporaciones finales, etc.). Adicionalmente, en el análisis de trazas debe considerarse que los disolventes de extracción pueden agregar nuevos compuestos a

la muestra a analizar (sus propias impurezas) y que estos compuestos pueden interferir en la determinación del analito.

e. Filtración.

Tanto las muestras como los estándares a inyectar deben estar totalmente libres de partículas en suspensión. Las partículas presentes en las muestras pueden rayar los sellos del inyector, o bloquear algún componente del equipo cromatográfico especialmente tuberías o filtros de columnas. La filtración de las muestras se realiza en filtros desmontables o fijos que contienen membranas de 0.45 ó 0.22 µm de un material apropiado. Estos filtros se seleccionan de a cuerdo a sus resistencia frente al disolvente de disolución de las muestras.

Se debe tener especialmente en cuenta la posible adsorción de analito a las membranas. Para ello se suele filtrar una solución estándar de analito y se inyecta en el equipo de CLAR tanto la muestra filtrada como la muestra sin filtrar y se compara la concentración hallada de analito en ambas.

f. Extracción en fase sólida.

La extracción en fase sólida (SPE) consiste en una extracción líquido-sólido a través de pequeñas columnas o cartuchos de plástico (usualmente polipropileno) rellenadas con cantidades variables (desde 100 hasta 500 mg) de distintos materiales similares a los de CLAR. La extracción tiene lugar mediante mecanismos de sorción-desorción de los analitos en la superficie del material activo de las columnas.[29]

g. Derivatización.

En CLAR se pueden utilizar reacciones de derivatización antes o después de la separación (se prefiere antes), para aumentar la respuesta de un detector a un determinado compuesto, o para disminuir la polaridad de una amina, por ejemplo. Las reacciones de derivatización más utilizadas en CLAR se dirigen a la obtención de

derivados fluorescentes, siendo de menor importancia las que pretenden producir cromóforos detectables al UV. También los isómeros ópticos pueden derivarse para formar diastereoisómeros, que pueden separarse en columnas convencionales no quirales.[1]

La sensibilidad de un método de separación depende de su capacidad de carga y de la naturaleza de los detectores disponibles. Esta sensibilidad es superior en CLAR en comparación con otros métodos que sólo trabajan en forma miniaturizada. Cabe aclarar que para el análisis farmacéutico es más importante la sensibilidad a la concentración y no a la masa. De la misma manera, en la detección por absorbancia y por fluorescencia es también la sensibilidad a la concentración y no a la cantidad mínima detectable que es relevante.[19]

14. APLICACIONES CUALITATIVAS/CUANTITATIVAS

a. **Aplicaciones Cualitativas.** El análisis cualitativo se hace para la determinación del tiempo de retención de compuestos puros conocidos que se supone que están presentes en la muestra. Estos valores son comparados después con los tiempos de retención de los picos producidos por la muestra. Esta aproximación es válida solo cuando todas las condiciones cromatográficas son idénticas, cuando se realizan todas las medidas, y se usa la misma columna cromatográfica para hacer dichas mediciones.

b. **Aplicaciones Cuantitativas.** Para que sea posible el análisis cuantitativo es necesario que la respuesta del detector sea lineal con la concentración; en cuyo caso, la cantidad de cada compuesto en la muestra es proporcional al área de su pico cromatográfico.[28]

15. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

a. **Adición de estándar.** Los detectores proporcionan distintas respuestas para la misma concentración de dos solutos diferentes, lo que hace necesaria la calibración o

cálculo del factor de respuesta del detector para cada analito. Para construir la recta de calibrado se preparan unos patrones de concentraciones conocidas y próximas a la del problema; se realiza la cromatografía para los patrones y se calcula el área de los picos para cada patrón. A continuación se obtiene la gráfica correspondiente, representando en ordenadas la respuesta del detector (áreas) y en abscisas la concentración de los patrones. Esta debe ser una recta que pasa por el origen. Obteniendo, posteriormente, el cromatograma del problema, se interpola su área en la gráfica, para determinar la concentración.[37]

b. **Normalización interna.** Este procedimiento evita las incertidumbres asociadas a la inyección de la muestra; es el método de la normalización de las áreas. Es necesario que se separen todos los picos completamente. Permite conocer la composición de la muestra en porcentaje referida al total, la concentración del analito se calcula por la relación de su área con el área total de los picos.

$$C_i = \frac{A_i}{\sum A_i} 100$$

Donde A_i es el área del pico y ΣA_i es la sumatoria de todas las áreas del cromatograma.

c. **Patrón interno.** Permite obtener mayor precisión en la obtención de la recta de calibrado y por tanto en el análisis cuantitativo, porque evita la incertidumbre causada por la inyección de la muestra, reduce errores causados por variación de las condiciones. Es el método empleado cuando existe una gran manipulación al preparar la muestra.

La obtención de la recta de calibrado difiere de lo expuesto anteriormente en que tanto en la preparación de los patrones como en la del analito, se añade una cantidad idéntica de una sustancia que actúa de "patrón interno". La recta de calibrado se obtiene representando en ordenadas el cociente (Área patrón/Área patrón interno) frente a concentraciones de los patrones, en abscisas.

Las características que debe cumplir la sustancia empleada como patrón interno son:

- No ser un componente original de la muestra.
- Naturaleza similar al resto de los solutos.
- Agregarse en concentraciones similares a los analitos de interés. [7]

16. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Es necesaria la validación del método para verificar que los parámetros de rendimiento son adecuados para usarlos en la determinación de modafinil, incorporar mejoras en el método, ampliar el alcance del método para nuevas matrices, el control de calidad indique que el método está cambiando con el tiempo o que el método se use en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o instrumentos.[9]

a. **Confirmación de identificación, Selectividad y Especificidad.** La identidad se establece cuando la señal producida en la etapa de medición puede ser atribuida únicamente al analito y no a la presencia de algo similar o la coincidencia. La selectividad y la especificidad evalúan la confiabilidad de las mediciones ante la presencia de interferencias; la segunda se considera por lo general como un 100% de selectividad. Las interferencias pueden disminuir o aumentar la señal atribuida al analito.

Estos parámetros no requieren mayor validación cuando se utilizan procedimientos normalizados para una matriz específica, puesto que el trabajo ya lo han adelantado quienes desarrollaron y validaron el método. En estos casos se deben tener en cuenta las especificaciones sobre posibles interferencias y la manera de suprimirlas, si existen. Sin embargo, el laboratorio debe considerar el estudio de las interferencias e la validación si las matrices de las muestras que analiza son muy variadas y si en alguna de ellas los interferentes se encuentran en niveles muy altos que pueden no ser suprimidos por los procesos recomendados. Este sería un caso de ampliación del alcance del método para nuevas matrices.

La selectividad de un método se estudia adicionando de manera deliberada a una muestra las interferencias que se crea tengan mayor probabilidad de estar presentes en

las muestras. Si no se conoce a ciencia cierta la existencia o no de interferencias, se puede valorar la selectividad del método por comparación con la aplicación de otro método. La selectividad también puede estar afectada por la existencia del analito en una muestra en más de una forma como libre o enlazado, o en diferentes estados de oxidación.[9, 71]

b. **Límite de detección (LOD).** Se debe saber cuál es la mínima concentración del analito en la matriz biológica que se puede detectar (ruido) confiablemente cuando se aplica un método para el análisis de una muestra, aunque no existe un acuerdo universal sobre la terminología y existen varios criterios para su cuantificación. En algunos casos es suficiente brindar una indicación del nivel en el que la detección se toma menos confiable (promedio de lectura de blancos del método más tres veces su desviación estándar) pero resulta conveniente aplicar una metodología más exacta; en cualquier caso se recomienda informar el mecanismo seleccionado.[9, 71]

c. **Límite de cuantificación (LOQ).** El LOQ es la mínima concentración de analito que se puede determinar con un nivel aceptable de precisión (repetibilidad) y exactitud. Varias convenciones lo definen como la concentración del analito correspondiente al valor del blanco más 5, 6 ó 10 desviaciones estándar de la media de blancos. Se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del 20% del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20%.[9, 71]

Ninguno de los dos límites representan niveles en los que la cuantificación es imposible; es simplemente una región en que la magnitud de las incertidumbres asociadas es de valor semejante al resultado real. El límite de cuantificación no se debe determinar por extrapolación por debajo del menor estándar analizado.

d. **Exactitud.** La exactitud, que es la cercanía de un resultado al valor verdadero, se evalúa en la validación por comparación con los valores de referencia de un material caracterizado (material de referencia), o con los valores tomados de otro método

caracterizado. Los valores de referencia deberían ser trazables a las normas internacionales; los materiales de referencia certificados generalmente se aceptan como trazables. Es ideal que el material de referencia sea de matriz natural lo más similar posible a las muestras de interés. En caso contrario los materiales de referencia pueden ser:

Preparados por adiciones de materiales de referencia certificados puros u otro de pureza y estabilidad adecuadas a muestras típicas, o

Muestras típicas bien caracterizadas, controladas para verificar su estabilidad y pasadas por un proceso interno de control de calidad.

El valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del ±15% del valor nominal de concentración.[9, 71, 72]

e. **Precisión.** Se denomina así al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto. Las dos medidas más comunes de la precisión, que generalmente se define en términos de la desviación estándar o el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) son la repetibilidad y la reproducibilidad.

f. **Repetibilidad.** Es la precisión más pequeña esperada, de una idea de la variabilidad que se espera cuando un método es aplicado por un solo analista en el equipo durante un periodo corto. Se lleva a cabo analizando en un mismo día por sextuplicado tres concentraciones conocidas: baja, media y alta. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15%.[9, 71]

g. **Reproducibilidad.** Representa la variabilidad que se obtiene cuando una muestra es analizada por varios laboratorios tiene un valor más amplio. La precisión intermedia y más útil en casos específicos se obtiene cuando se evalúa la

reproducibilidad entre analistas en un mismo laboratorio. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15%.

La repetibilidad y la reproducibilidad generalmente dependen de la concentración del analito y por lo tanto se deben determinar para diferentes concentraciones, estableciendo, cuando sea relevante, la relación entre la concentración y el coeficiente de variación.

A partir de las desviaciones estándar de repetibilidad y reproducibilidad se pueden calcular los límites de repetibilidad y de reproducibilidad, que permiten al analista saber si la diferencia entre análisis duplicados es significativa, en las respectivas condiciones.[9, 71, 72]

h. <u>Linealidad.</u> Es la capacidad de un método analítico en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra. Se debe determinar el intervalo de concentraciones de analito dentro del cual se puede aplicar el método; esto se refiere a las concentraciones efectivamente medidas y no a las muestras originales. En el extremo inferior de intervalo de concentraciones el factor limitante es el valor del límite de detección; en el extremo superior el alcance depende de la respuesta del instrumento o de condiciones analíticas establecidas como óptimas.

Dentro del intervalo de trabajo puede existir un rango de repuesta lineal (intervalo lineal); los cálculos de regresión por si solos pueden ser insuficientes para establecer la linealidad; se debe complementar con una inspección visual de la línea y los residuos. En general los controles de linealidad requieren efectuarse con al menos diez concentraciones o valores diferentes.

La evaluación del intervalo de trabajo y del intervalo lineal permiten definir qué grado de calibración se requerirá al usar el método; en el intervalo lineal puede ser suficiente un punto de calibración para establecer la pendiente de la línea de calibración en múltiples

puntos, preferiblemente más de seis. La respuesta del instrumento a la concentración no tiene que ser perfectamente lineal para que el método sea eficaz, pero la curva debe ser repetible cotidianamente. El intervalo de trabajo y el intervalo lineal pueden ser diferentes para matrices diferentes según el efecto de las interferencias que aporte la matriz.[9, 71]

i. **Sensibilidad.** La sensibilidad es el gradiente de la curva de respuesta, o lo que es lo mismo, el cambio en la señal correspondiente a un cambio de concentración de analito. Para el intervalo lineal de un método, la sensibilidad corresponde a la pendiente de la recta de calibración, y es un parámetro objeto de seguimiento cuando se efectúan calibraciones rutinarias.[72]

j. **Robustez.** Es una medida de qué tan bien responde un método analítico ante una implementación no tan perfecta, ya que si ciertas etapas del método no se implementan con el suficiente cuidado, tendrán un efecto severo sobre la efectividad del método. Generalmente este parámetro aplica para métodos desarrollados por el laboratorio, en las cuales se realizan variaciones deliberadas en el método y se cuantifica el efecto en el rendimiento, antes de entrar en estudios de colaboración. Por lo tanto es una variable que no necesariamente debe ser objeto de la validación cuando se utilizan métodos normalizados.[71]

k. **Tolerancia.** Se deben establecer aquellos factores ajenos al método analítico como diferentes equipos, lotes de reactivos, columnas, etc., que se pueden presentar al reproducir el método en otras condiciones de uso; esto es, a pequeñas, pero deliberadas modificaciones al analizar muestras adicionadas de concentración conocida en la matriz biológica. [9]

l. **Estabilidad Analítica de la Muestra.** Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas durante su manejo, almacenamiento y procesamiento.

m. **Condiciones de almacenamiento.** Evalúa la estabilidad del o los compuestos en la matriz biológica, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las muestras, por un periodo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.[9]

n. **Ciclos de congelación-descongelación.** Evalúa la estabilidad del compuesto por analizar al congelar y descongelar a temperatura ambiente muestras de concentración conocida; esto constituye un ciclo de congelación-descongelación. Se deben evaluar al menos dos ciclos de congelación-descongelación antes de analizar las muestras. [9]

o. **Intervalo de cuantificación** El intervalo de cuantificación o rango consta de 6 concentraciones diferentes en función de las concentraciones esperadas de modafinil, incluye el límite de cuantificación, puntos intermedios y la concentración máxima esperada.[9, 71]

p. **Recuperación absoluta.** Se analizan al menos por duplicado un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta del compuesto por analizar en la matriz biológica, dentro del rango. Se comparan estos resultados con las respuestas de disoluciones del mismo compuesto en las mismas concentraciones y en los mismos disolventes. El porcentaje de estas razones no necesariamente es del 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del rango. [9]

q. **Selectividad.** Se establece la selectividad del método al analizar muestras blanco de la matriz biológica proveniente de al menos seis voluntarios. Se evalúa el método contra posibles interferencias (por ejemplo, metabolitos, productos de degradación del compuesto de interés y cualquier otro fármaco administrado de manera concomitante). No deben existir interferencias en el compuesto por analizar.[9]

17. PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS DEL MODAFINIL

Nombre: 2-[(RS)-(Difenilmetil)sulfinil]acetamida

Fórmula Condensada: $C_{15}H_{15}NO_2S$

PM: 273.4

Número CAS: 68693-11-8

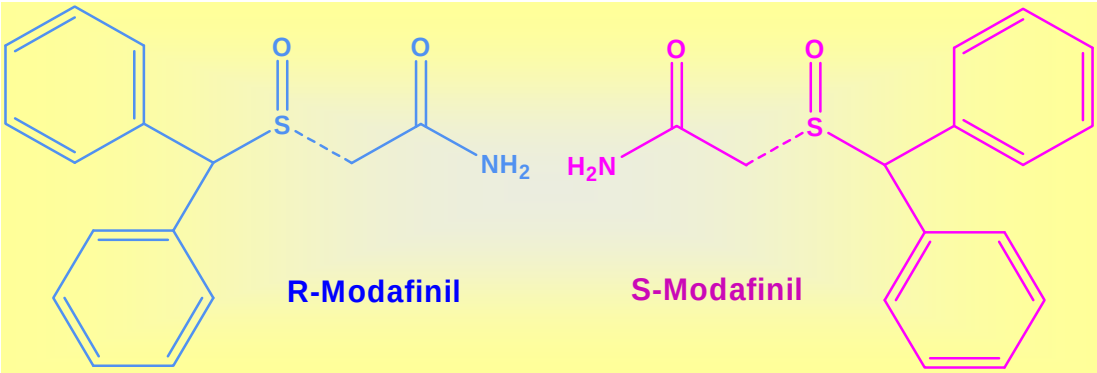


Figura 16 Estructura química de Modafinil y sus enantiómeros.

Características: Polvo cristalino blanco o casi blanco. P.f. 164° a 166° Muestra polimorfismo. Cristales monoclínicos.

Solubilidad: prácticamente insoluble en H_2O y ciclohexano, ligeramente soluble en MeOH y acetona.

Identificación: Espectrofotometría infrarroja de absorción y CLAR.

Longitud de onda: 225-236 nm

Impurezas:

A. [(RS)-(difenilmetil) sulfinil] ácido acético

B. 2-[(difenilmetil) sulfonil] acetamida.

C. Metil [(RS)-(difenilmetil) sulfinil] acetato

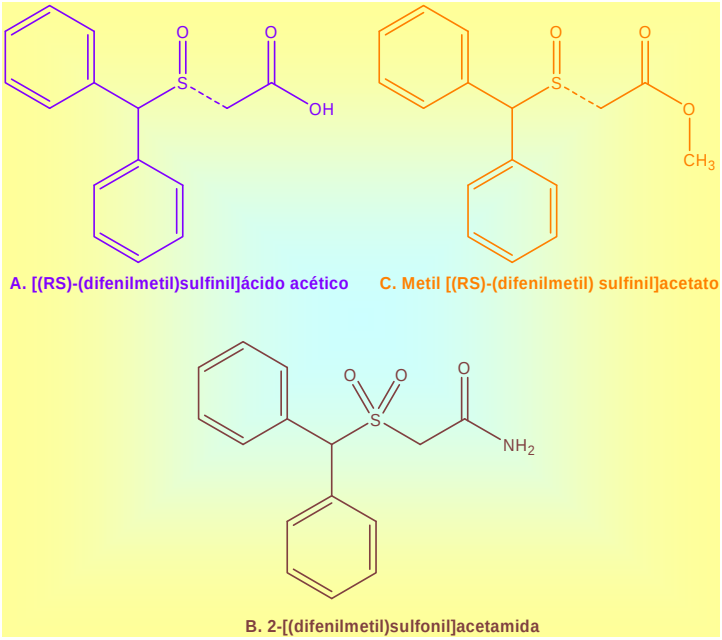


Figura 17 Estructura química de las impurezas de modafinil.

18. MODAFINIL

Está disponible para su uso clínico desde 1998 bajo los nombres de Modiodal® (Europa) y Provigil® (USA). Debido a no produce renuncia y tolerancia que son asociados con los estimulantes tradicionales como son el uso crónico de anfetaminas, está categorizado por la Federal Food and Drug Administration (FDA) como fármaco tipo IV.[46]

El modafinil mejora la labor neuro psicológica desarrollada en voluntarios sanos, pacientes adultos con déficit de atención y trastornos de hiperactividad y pacientes con esquizofrenia crónica. También se utiliza en pacientes con enfermedad de Huntington[42]; así mismo, actúa por un mecanismo similar al de los neuropéptidos orexina A y B para promover la liberación de histamina.[43]

La deficiencia de orexinas contribuye a la fisiopatología de narcolepsia, un síndrome de hipersomnolencia. El bloqueo parcial del receptor orexina es suficiente para producir somnolencia pero no cataplejía.[44]

El modafinil es farmacológicamente distinto de los clásicos compuestos que inducen vigilia como son las anfetaminas, metilfenidato y pemolina. En comparación con estos compuestos, modafinil es bien tolerado y con bajo potencial de abuso. A pesar de investigaciones exhaustivas, el mecanismo exacto de modafinil para mantener el estado de vigilia aún es desconocido. Búsquedas significativas se han enfocado en las acciones dopa-aminérgicas de este compuesto. Se ha demostrado que modafinil incrementa los niveles de dopamina extracelular.[43]

La narcolepsia es un trastorno de sueño crónico caracterizado por un cuadro de síntomas que incluyen sueño excesivo durante el día, cataplejía (una repentina pérdida del tono muscular bilateral provocado por emociones fuertes), alucinaciones y parálisis de sueño.

Los pacientes con narcolepsia también exhiben ataques de movimiento rápido del ojo (REM). El REM usualmente no ocurre hasta después de 90 minutos del comienzo del sueño y sigue un ciclo de 90 minutos en controles normales.

Las hipocretinas/orexinas (orexina-A o hipocreatina 1 y orexina-B o hipocreatina 2) son dos grupos identificados independientemente, son un par de neuropéptidos expresados en el hipotálamo lateral juegan el rol mayor en la patogenésis de la narcolepsia.[42]

El papel principal de las orexinas es el mantenimiento del estado de alerta con consecuencias funcionales ligadas a los procesos psicológicos. Desde que ciertos procesos homeostáticos en los mamíferos (apetito, temperatura corporal, liberación hormonal y procesos cognitivos) son relacionados con el sueño y el mantenerse despierto, es así como las orexinas vinculan el sueño y el despertar con estos procesos. [44]

Por otro lado, este fármaco también se utiliza en pacientes con esclerosis múltiple para reducir la fatiga, ya que este es un síntoma común que ocurre arriba del 92% de los pacientes. La fatiga persiste con el tiempo y está relacionada con la discapacidad física.

El modafinil también tiene la potencia para proteger las neuronas contra la degeneración y se sugiere que su vía de acción es por diferentes mecanismos en el proceso de muerte celular en lo que a la enfermedad de Parkinson se refiere.

Está asociado con el incremento adrenérgico, glutamatoérgico y la actividad de las hipocreatininas y la disminución de la actividad GABA en partes específicas del cerebro.

El tratamiento con modafinil disminuye en pacientes con trastornos de déficit de atención hiperactivo, lo impulsividad y la hiperactividad, contrarresta los efectos sedativos de antipsicóticos, antidepresivos y agentes estabilizadores de humor o sedantes después de anestesia general y mantiene y aumenta el efecto de los antidepresivos.

También es usado en el sueño excesivo durante el día para los enfermos de Parkinson. Tiene una protección potencial contra la muerte neuronal en modelos in vitro e in vivo de heridas mecánicas, neurotóxicas e isquémicas. Previene la toxicidad por glutamato en cultivos de células corticales, previene el incremento de niveles tóxicos de aspartato y glutamato después de heridas isquémicas y previene el desarrollo de lesiones en el hipocampo.[46]

19. QUIRALIDAD

Desde la década pasada ha ido creciendo el interés por la cromatografía quiral, termino dado a la separación de compuestos ópticamente activos por técnicas cromatográficas. Este interés se ha despertado ampliamente como resultado de la identificación de la mayoría de las sustancias psicológicamente activas existentes en forma quiral. Además los diferentes enantiómeros de un fármaco pueden exhibir ampliamente diferentes actividades biológicas en ambos grados y naturaleza. Por ejemplo, la actividad hormonal de dos enantiómeros de

adrenalina difieren muy significativamente, uno puede ser varias veces más activo que el otro. De forma similar, un enantiómero de efedrina no solamente tiene actividad psicológica, también degrada la actividad del otro enantiómero cuando están presentes en mezcla.

Un desagradable ejemplo, en particular, de moléculas quirales, es el efecto contrastante que tuvo el fármaco talidomida. Este medicamento inicialmente salió al mercado como la mezcla racémica de N-ácido ftaliglutámico imida. La actividad farmacéutica reside en el isómero R- el cual no se descubrió hasta después de que se comprobó que el enantiómero S- era fuertemente cancerígeno y su presencia en la mezcla racémica causaba serias malformaciones en el feto. Al pasar el tiempo, como resultado de esta tragedia, la pureza de fármacos quirales ha llegado a ser un aspecto muy importante en la identificación y ensayo de estas moléculas.

Además en varios países hay leyes que dictan que si un fármaco puede existir en diferentes estructuras quirales, la actividad psicológica relativa de los diferentes enantiómeros debe ser determinada. La separación e identificación de enantiómeros es en la actualidad un problema analítico muy importante y la cromatografía quiral es la técnica natural que aplica a la resolución de tales mezclas.

Químicamente, la quiralidad puede resultar de un centro quiral como un átomo de carbono con diferentes grupos unidos a cada enlace, desde la hélice estructural como en el caso de las proteínas, de la quiralidad plana como demostración en algunos compuestos cíclicos sustituyentes, de la quiralidad axial como en los espiranos y la quiralidad torsionada mostrada en halógenos sustituyentes.

Además otros átomos como sulfuro, nitrógeno, fósforo y boro también pueden presentar quiralidad. La quiralidad simple con un sólo centro quiral puede ser representada de la siguiente manera:

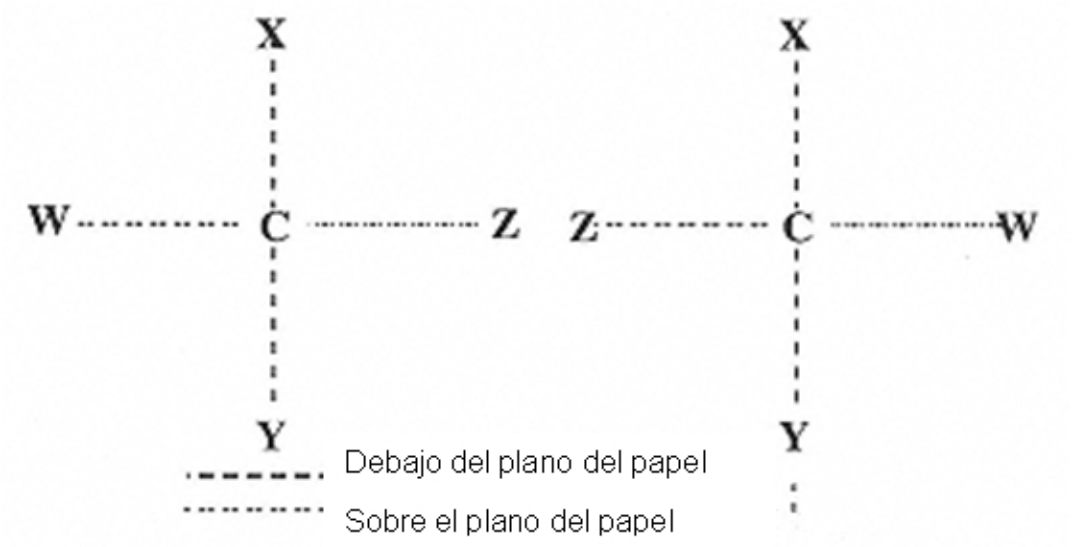


Figura 18. Dos figuras en las que sus imágenes en el espejo no son superponibles, se denominan enantiómeros.

La rotación de la luz polarizada es una importante propiedad física que es usada en las determinaciones quirales. Si una molécula tiene dos carbonos asimétricos (quirales) en su estructura, entonces es posible que tenga dos pares de moléculas ópticamente activas, dichos pares son llamados diasteroisómeros como en la figura siguiente:

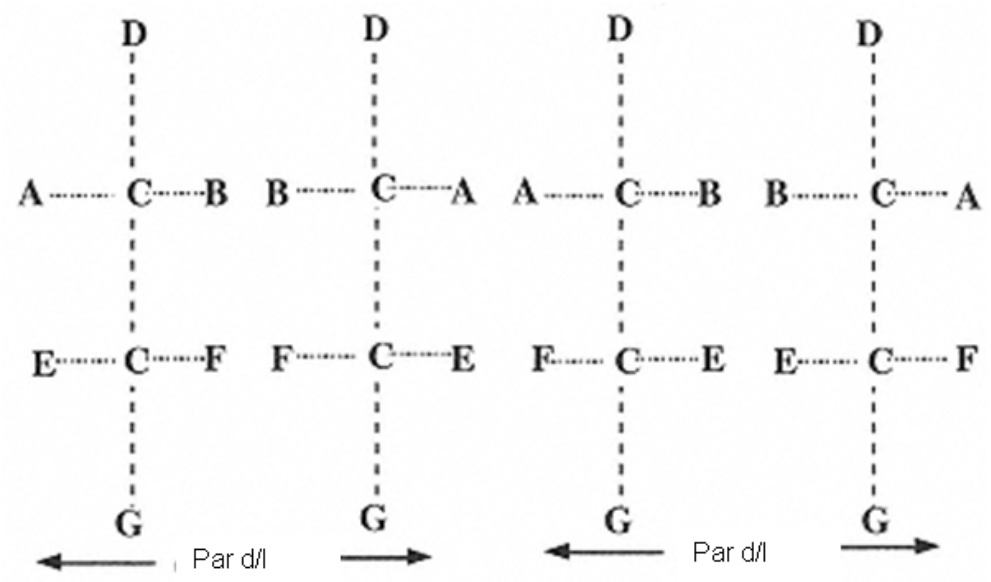


Figura 19. Pares de moléculas óptimamente activas

Si los dos carbonos asimétricos tienen la misma sustitución, se formaran nuevamente los dos pares de diasteroisómeros, pero sólo un par poseerá la simetría plana que ópticamente será inactivo. Los pares inactivos se denominan *meso* diasteroisomeros.

Los enantiómeros poseen propiedades físicas y químicas idénticas pero los diasteroisómeros pueden diferir y estas diferencias pueden ser usadas en adecuados procedimientos físico químicos para separar enantiómeros.

La mezcla de enantiómeros es reactivada con un agente quiral apropiado y los diasteroisómeros entonces formados, son separados por las técnicas clásicas.

Una de las primeras separaciones cromatográficas de enantiómeros fue realizada por Gil-Av, quién uso cromatografía de gases para separar los derivados trifluoroacéticos de algunos aminoácidos en una fase estacionaria activa ópticamente que consistía en N-trifluoroacetil-L-fenilalanina ciclohexil éster. Esto demostró que los isómeros L eluyen al último en la fase estacionaria L y primero en la fase estacionaria D.

No se ha probado que la cromatografía de gases sea la mejor técnica para separar isómeros ópticamente activos, ya que todos los solutos deben ser volatilizados y esto es una restricción para que el peso molecular de los solutos pueda se eluído y también sus polaridades, a pesar de la posible derivatización.

En contraste, la cromatografía líquida permite por sí misma separaciones quirales y hay dos procedimientos básicos para separar solutos ópticamente activos.

Primeramente, la cromatografía en fase reversa puede ser empleada y una sustancia quiral puede ser adicionada en concentraciones bajas en la fase móvil.

El aditivo quiral será absorbido en la superficie de la fase reversa y actuará como una fase estacionaria de adsorción con actividad quiral.

Está técnica hace la detección quiral más difícil ya que provee en un segundo plano la actividad óptica en la fase móvil que puede ser de algunos órdenes mayores que el de los solutos activos quiralmente.[50]

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Modiodal es un agente promotor del estado de vigilia que se administra vía oral. El principio activo de este medicamento es el compuesto modafinil. El mecanismo de acción de modafinil no está completamente determinado pero su acción es similar a la de los agentes simpatomiméticos como las anfetaminas y el metilfenidato, aunque difiere en el perfil farmacológico.

No se ha comprobado que modafinil produzca daño funcional, pero como cualquier fármaco estimulante que altera el SNC, puede alterar habilidades motoras, el juicio (produciendo efectos psicoactivos, euforia, alteraciones en la percepción del comportamiento, pensamientos y sentimientos). Es por eso que Modiodal está clasificado como un medicamento controlado (tipo IV) usado solamente por pacientes que han tenido una completa evaluación de su padecimiento, ya que algunos pacientes pueden tener más de un trastorno del sueño que contribuye con su somnolencia excesiva.

El modafinil es un compuesto quiral debido a su sulfóxido asimétrico, y la parte farmacológicamente activa es la mezcla racémica. No obstante, se ha reportado que las actividades farmacológicas de los dos enantiómeros son diferentes y que el enantiómero (+) {2-[(S)-(Difenil metil) sulfinil] acetamida} es eliminado tres veces más rápido que el enantiómero (-) {2-[(R)-(Difenil metil) sulfinil] acetamida}. Los enantiómeros no se transforman. En el estado de equilibrio, la exposición total del isómero (S) es aproximadamente tres veces que la del isómero (R)

Por esta razón, la demanda por obtener un método analítico eficiente y selectivo en muestras biológicas, en este caso plasma, que siga el perfil farmacológico de los enantiómeros y sus dos mayoritarios metabolitos para poder descifrar el mecanismo de

acción y toxicidad de la mezcla racémica y cada uno de los enantiómeros en la promoción de la vigilia y su potencia como estimulante en abuso terapéutico.[47]

Utilizando las propiedades fisicoquímicas del compuesto se llevará a cabo el estudio teórico para poder llegar a proponer un método de cuantificación. Para obtener dicho método, será necesario evaluar los métodos actuales reportados para su determinación y cuantificación, sean o no cromatográficos.

Se tendrá en cuenta la matriz en la que se encuentra el analito para poder sugerir la preparación de muestra. Se evaluaran condiciones como pH y temperatura, para ver la manera en que afectan los parámetros cromatográficos.

IV. OBJETIVOS

- Revisión de técnicas cromatográficas recientes para la determinación de modafinil en diferentes matrices.
- Comparar las técnicas no cromatográficas enfocadas al análisis de modafinil.
- Comparar ventajas y desventajas de las técnicas cromatográficas y no cromatográficas.
- Proponer un método analítico por CLAR para el análisis de modafinil en plasma.

V. HIPÓTESIS

Debido a que el modafinil es una molécula que presenta enantiómeros activos, se espera que la mejor propuesta para la determinación y cuantificación de este fármaco, sea a través de un método analítico por Cromatografía de Líquidos enantioselectiva.

VI. METODOLOGÍA

Consulta bibliográfica.

↓

Estudio de los principios básicos de CLAR.

↓

Revisión de propiedades físico-químicas de modafinil.

↓

Revisión de técnicas cromatográficas recientes de modafinil en diferentes matrices.

↓

Comparar técnicas de análisis cromatográficos y no cromatográficos.

↓

Identificar ventajas y desventajas de las técnicas.

↓

Resultados y discusión.

↓

Propuesta del método analítico para la cuantificación

↓

Análisis del método propuesto.

↓

Conclusiones.

↓

Entrega de informe final.

TABLA 6 DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE MODAFINIL Y SU METABOLITO ÁCIDO POR CLAR EN PLASMA HUMANO.

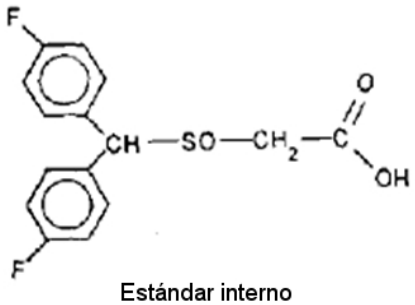
Moachon G, Matinier D. 1994

MATRIZ	ESTUDIO APLICADO A/EN:	TIPO DE DETERMINACIÓN	PROPÓSITO DEL ESTUDIO	TIPO DE ELUCIÓN		FASE MÓVIL	
						COMPONENTES	PROPORCIÓN
Plasma	Humano	CLAR	Aplicarlo en estudios farmacocinéticos.	Fase Reversa	Isocrática	ACN:H_2O:CH_3COOH	150:420:12

DETECTOR	COLUMNA				TEMPERATURA		TIEMPO DE ANALISIS
	D.I.	MARCA	LONGITUD	TAMAÑO DE PARTÍCULA	Columna	Automuestreador	
UV 236 nm	3.9 mm	µBondapak C_{18}	300 mm	10 µm	Temp. Ambiente	Temp. Ambiente	45 min
		Std boro	Waters				

VOLUMEN DE INYECCIÓN	t_R	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	VELOCIDAD DE FLUJO	EQUIPO	RENDIMIENTO DEL SISTEMA	OBSERVACIONES	VALIDACIÓN
25 µL	M: 11 MA:15 EI:24	LOD(M&MA): 0.04 mg/L LOQM: 0.130 µg/mL LOQMA: 0.140 µg/mL	1.4 mL/min	Bomba isocrática, automuestreador, detector.	NA	Aprox. a las 5h se alcanza la concentración máxima.	Sensibilidad, Selectividad, Linealidad, LOQ, LOD, %Recobro, Estabilidad, Precisión, Exactitud.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	Extracción líquido-líquido. 1 mL de plasma en dietil éter. Extracción con dietil éter, esto provoca picos significantes derivados de la matriz. A 1 mL de plasma se le agrego 1 mL de HCl 0.1 M, 100 µL de soln std, 100 µL de estándar interno (4 µg) y 10 mL de éterdietil y se agito. Las 2 fases se separaron por centrifugación a 4000 g durante 10 minutos a 0-4°C. La capa orgánica fue evaporada hasta sequedad a temperatura ambiente bajo una corriente de nitrógeno. El residuo seco se reconstituyó con 200 µL de eluente y se inyectaron 25 µL al sistema cromatográfico.
SOLUCIÓN STOCK	Las soluciones estándar stock fueron preparadas disolviendo por separado 10 mg de M, 10 mg de MA y 10 mg de SI en 10 mL de MeOH. La solución de trabajo contenía M y MA. Las concentraciones de cada compuesto fueron 200, 150, 100, 50, 20, 10, 5, 2 y 1 mg/L.
CURVA DE CALIBRACIÓN	La curva de calibración fue construida con la adición de 20, 15, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2 y 0.1 µg de M y MA juntos y 4 µg de estándar interno a alicuotas con 1 mL de plasma.
Sólo se cuantifica M y MA. El rango cuantificable fue de 0.130 (0.140 para MA) a 20 µg/mL. Se obtuvo una buena relación lineal en el rango de concentraciones estudiado (0.1-20 mg/L). Este es el primer método descrito para la determinación de M y su metabolito ácido en plasma. Análisis selectivo y sensible. Estándar Interno: [bis-(4-fluoro-fenil)metilsulfinil]ácido acético. El estudio clínico se lleva a cabo en sujetos con administración oral de 200 mg de modafinil.	



Estándar interno

Figura 20. Estándar interno [bis-(4-fluoro-fenil)metilsulfinil]ácido acético.

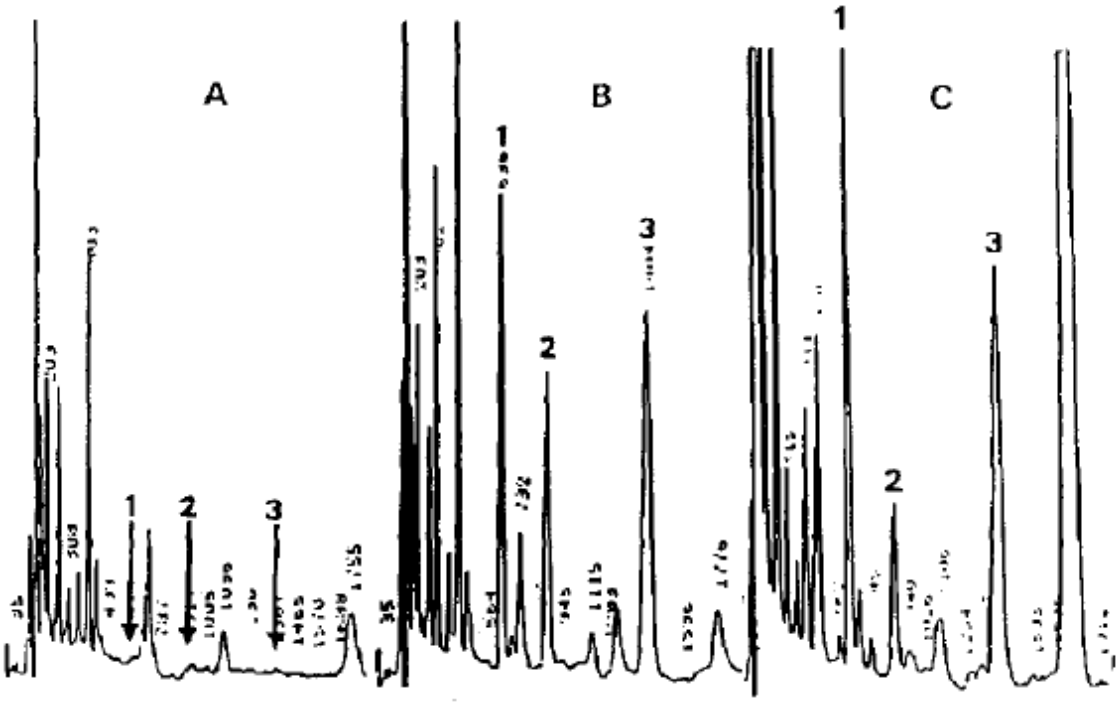


Figura 21. (A) Control de plasma humano. (B) Plasma control cargado con 2mg/L de M, 2mg/L de MA y 4mg/L EI. (C) Cromatograma de pacientes que recibieron una dosis oral de 200mg de M: pico 1=M, pico 2 MA y pico 3 EI.

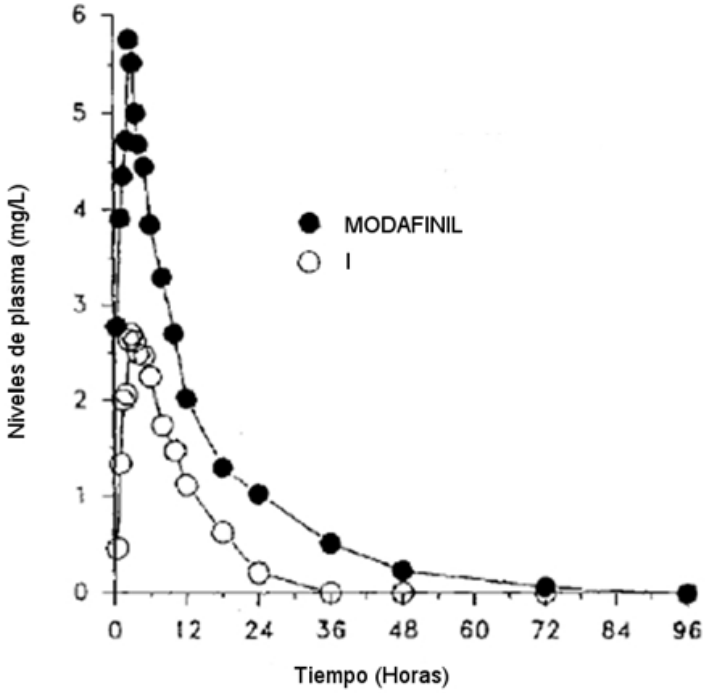


Figura 22. Curva de concentración vs tiempo, de plasma para M y su metabolito MA después de una dosis oral de 200mg de M.

TABLA 7 DETERMINACIÓN POR CLAR DE MODAFINIL Y SUS DOS METABOLITOS EN PLASMA HUMANO USANDO UNA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

Burnat P, Robles F, Do B. 1998

MATRIZ	ESTUDIO APLICADO A/EN:	TIPO DE DETERMINACIÓN	PROPÓSITO DEL ESTUDIO	TIPO DE ELUCIÓN		FASE MÓVIL	
						COMPONENTES	PROPORCIÓN
Plasma	Humano	CLAR extracción en fase sólida	Determinación y farmacocinética.	Fase Reversa	Isocrática	ACN:buffer ác. Ortofosfórico pH 2.6 0.05 M	26:74

DETECTOR	COLUMNA				TEMPERATURA		TIEMPO DE ANALISIS
	D.I.	MARCA	LONGITUD	TAMAÑO DE PARTÍCULA	Columna	Automuestreador	
Arreglo de fotodiodos	3.9 mm	C8 Symmetry	150 mm	5.0 µm	25 °C	25 °C	40 min
UV 225 nm		Std boro	Waters				

VOLUMEN DE INYECCIÓN	t_R	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	VELOCIDAD DE FLUJO	EQUIPO	RENDIMIENTO DEL SISTEMA	OBSERVACIONES	VALIDACIÓN
30 µL	M: 10.3±0.4 MA: 12.8±0.3 MS: 25.2±0.5 SI: 29.2±0.5	LOQM:0.200 µg/mL. LOQ(MA&MS):0.250 µg/mL. LODM: 0.01 µg/mL; LOD (MA&MS): 0.02 µg/mL. LOQ: 0.10 µg/mL	1.1 mL/min	Bomba con pistón recíproco, detector, automuestreador.	NA	La concentración máxima se alcanzó a las 3h.	%Recobro, LOQ, LOD, Linealidad y Precisión.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	Extracción fase sólida. 1 mL de plasma. Varian C18. Los compuestos fueron eluídos con MeOH, el extracto fue evaporado hasta sequedad a 40 °C bajo una corriente de N_2; el residuo fue disuelto en 250 µL de FM. Se pasaron 2 mL de MeOH, 2 mL de HCl 0.05 M por el cartucho, luego las muestras de plasma 1 mL+100 µL SI. Las mezclas se reconstituyeron con 250 µL de MeOH y se inyectaron 30 µL al sistema cromatográfico.
SOLUCIÓN STOCK	Las soluciones stock se prepararon disolviendo las cantidades de modafinil y sus metabolitos en MeOH para dar una concentración de 1.0 mg/mL.
CURVA DE CALIBRACIÓN	Estas soluciones fueron usadas para cargar el plasma blanco para cubrir varios rangos de calibración: 0.5-20.0 µg/mL.

Se cuantifica M, MA y MS por CLAR para aplicar este método en estudios toxicológicos y farmacológicos. El análisis involucra la extracción del fármaco, metabolitos y EI en plasma. El límite de cuantificación práctico, está definido como la mínima concentración que puede ser medida rutinariamente con precisión y exactitud aceptable. Para modafinil fue de 0.200 µg/mL y 0.250 µg/mL para MA y MS. Aunque el rango lineal presentado fue de 0.500 a 20 µg/mL para cada analito. La columna de fase reversa estaba acoplada a una precolumna C8 (5 µm, 30 mm x 3.9 mm D.I.). El buffer se ajusto con NaOH 10 M, Desgasificada al vacío. El automuestreador fue programado para correr durante 40 min por muestra. Se utiliza una precolumna C8.

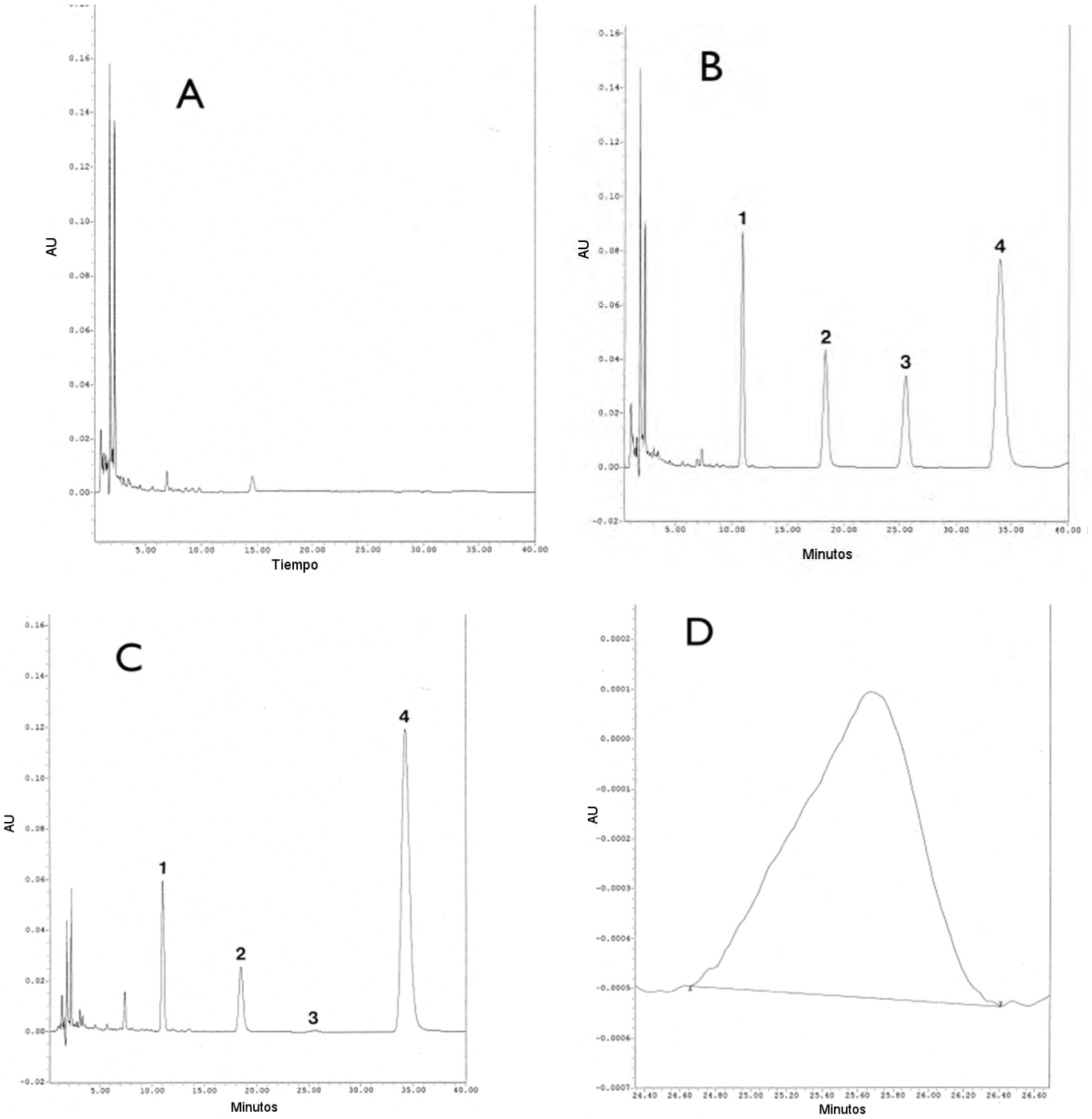


Figura 23. (A) Cromatograma del plasma control. (B) Solución estándar de plasma que contiene 2.5µg/mL de M, MA y MS y 10µg/mL de EI. (C) Muestra de plasma de la administración oral de 200mg a un voluntario. Contiene 2.47µg/mL de M, 2.30µg/mL de MA y 0.18µg/mL de MS. Pico 1= M; pico 2= MA; pico 3= MS y pico 4= EI. (D) Acercamiento del pico 3 del cromatograma (C)

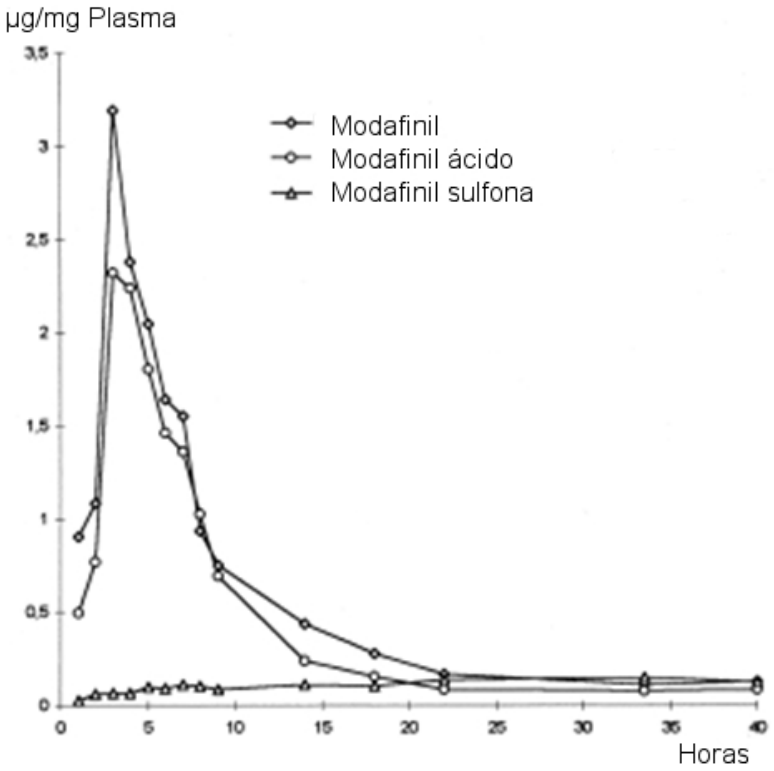
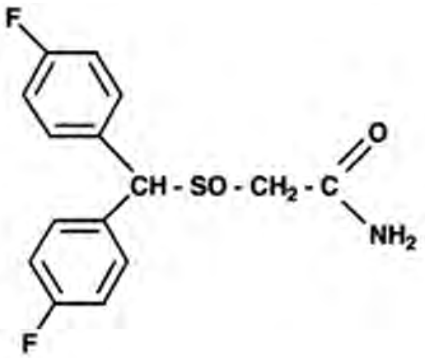


Figura 24 Curva plasmática de concentración vs tiempo de M, MA y MS después d la administración oral de 200mg de M a un voluntario.



Estándar Interno

Figura 25 EI utilizado en el análisis.

TABLA 8 DETERMINACIÓN DE ENANTIÓMEROS D- Y L- DE MODAFINIL EN PLASMA HUMANO USANDO UNA EXTRACCIÓN L-L Y CLAR.

Gorman SH. 1999

MATRIZ	ESTUDIO APLICADO A/EN:	TIPO DE DETERMINACIÓN	PROPÓSITO DEL ESTUDIO	TIPO DE ELUCIÓN		FASE MÓVIL	
						COMPONENTES	PROPORCIÓN
Plasma	Humanos	CLAR quiral	Farmacocinética.	Fase reversa	Isocrática	Buffer de fosfatos 0.02M pH3:ACN	84:16
DETECTOR	COLUMNA				TEMPERATURA		TIEMPO DE ANALISIS
	D.I.	MARCA	LONGITUD	TAMAÑO DE PARTÍCULA	Columna	Automuestreador	
Arreglo de diodos 225 nm	3.9 mm	β-Ciclodextrina	250 mm	5 µm	12 °C	12 °C	26 min
VOLUMEN DE INYECCIÓN	t_R	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	VELOCIDAD DE FLUJO	EQUIPO	RENDIMIENTO DEL SISTEMA	OBSERVACIONES	VALIDACIÓN
50 µL	(R)modafinil: 19 (S)Modafinil: 22 EI:9	LOQ: 0.1 µg/mL	0.6 mL/min	Perkin Elmer, 1 bomba, automuestreador, controlador de temperatura, detector	NA	La concentración máxima alcanzada fue a las 5h.	Precisión, Exactitud, LOQ, %Recobro, Estabilidad

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	Se tomó una alícuota de 0.2 mL de plasma control, se le agregó 0.04 mL de agua y 2.5 μg de EI y se centrifugó a 2100 g durante 10 min. La muestra se extrajo con 5 mL de la mezcla Hexano:Cloruro de metileno:Trietilamina (55:45:2) con agitación durante 2 min. La capa orgánica se evaporó hasta sequedad a 30 °C bajo una corriente de nitrógeno. El residuo se reconstituyó en 0.25 mL de la mezcla de fase móvil (70:30). Se inyectaron 50 μL a la columna CLAR.
SOLUCIÓN STOCK	Las soluciones que contenían D- y L-modafinil se prepararon en DMF para obtener una concentración de 5 mg/mL. Las soluciones de trabajo se prepararon a partir de esta solución, disueltas en agua.
CURVA DE CALIBRACIÓN	Se agregaron cantidades conocidas de D- y L-modafinil al plasma control para obtener concentraciones finales de 0.100 a 15.0 μg/mL de cada enantiómero.
A pesar de que modafinil se puede extraer con un único solvente como puede ser cloruro de metileno y éter etil, no se extrae así debido que genera picos significantes en los cromatogramas debidos a la matriz. El estado de ionización del EI puede producir efectos potenciales sobre el pH, para evitar esto se agrega la trietilamina. Una pequeña variación de las condiciones de optimización para la separación cromatográfica en columnas a base de proteínas (quirales) frecuentemente producen una pérdida en la resolución de los enantiómeros. Se agrega un EI para medir los posibles efectos de la matriz. El EI utilizado fue: 3,3-difenilpropilamina.	

Estándar interno
(3,3-Difenilpropilamina)

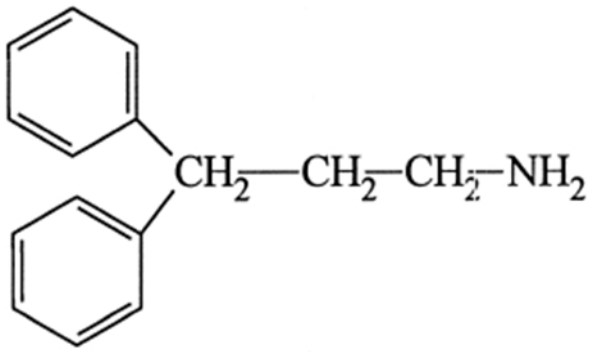


Figura 26 EI utilizado en el análisis.

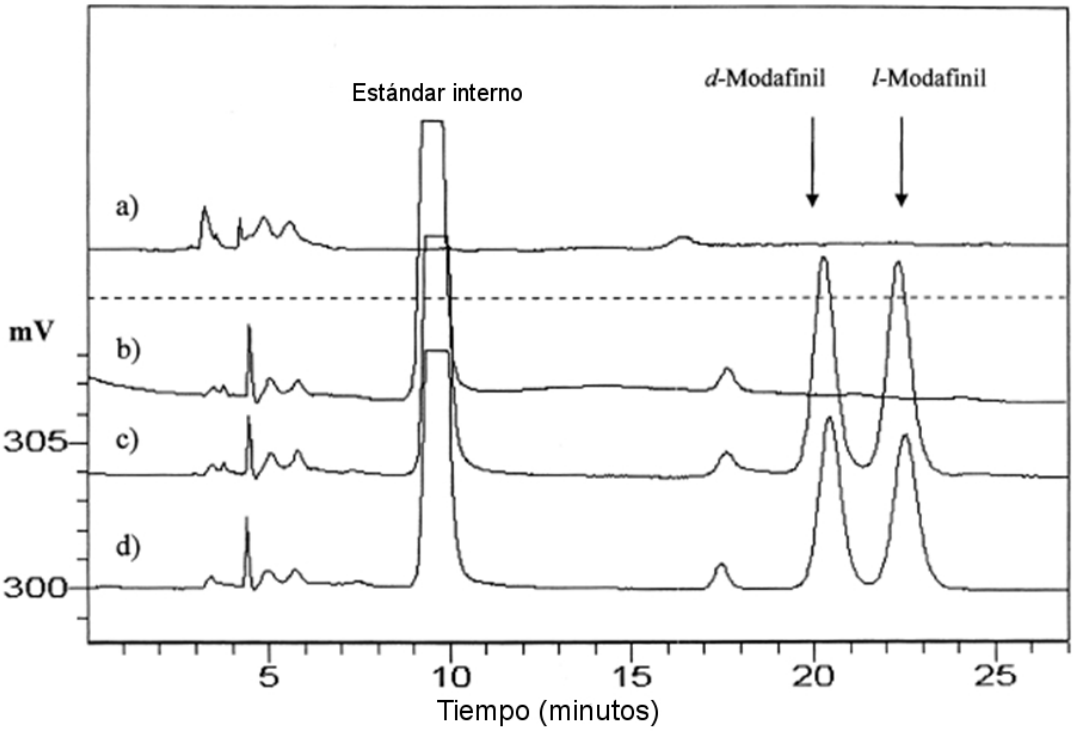


Figura 27 (a) Plasma control. (b) Plasma de estudio clínico sujeto a una pre-dosis. (c) Plasma control cargado a una concentración de 1.00µg/mL de D- y L-modafinil y con 2.5µg de EI. (d) Muestra de plasma (cargado con 2.5µg de EI) de voluntarios a los que se les administró una dosis oral de 200mg de modafinil después de 2h.

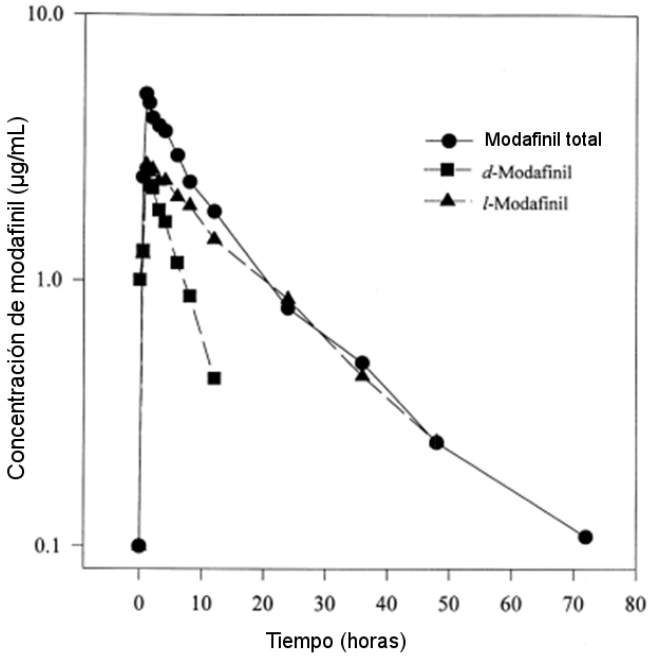


Figura 28 Curvas de concentración de modafinil y sus enantiómeros en plasma después de la administración de 200 mg a voluntarios.

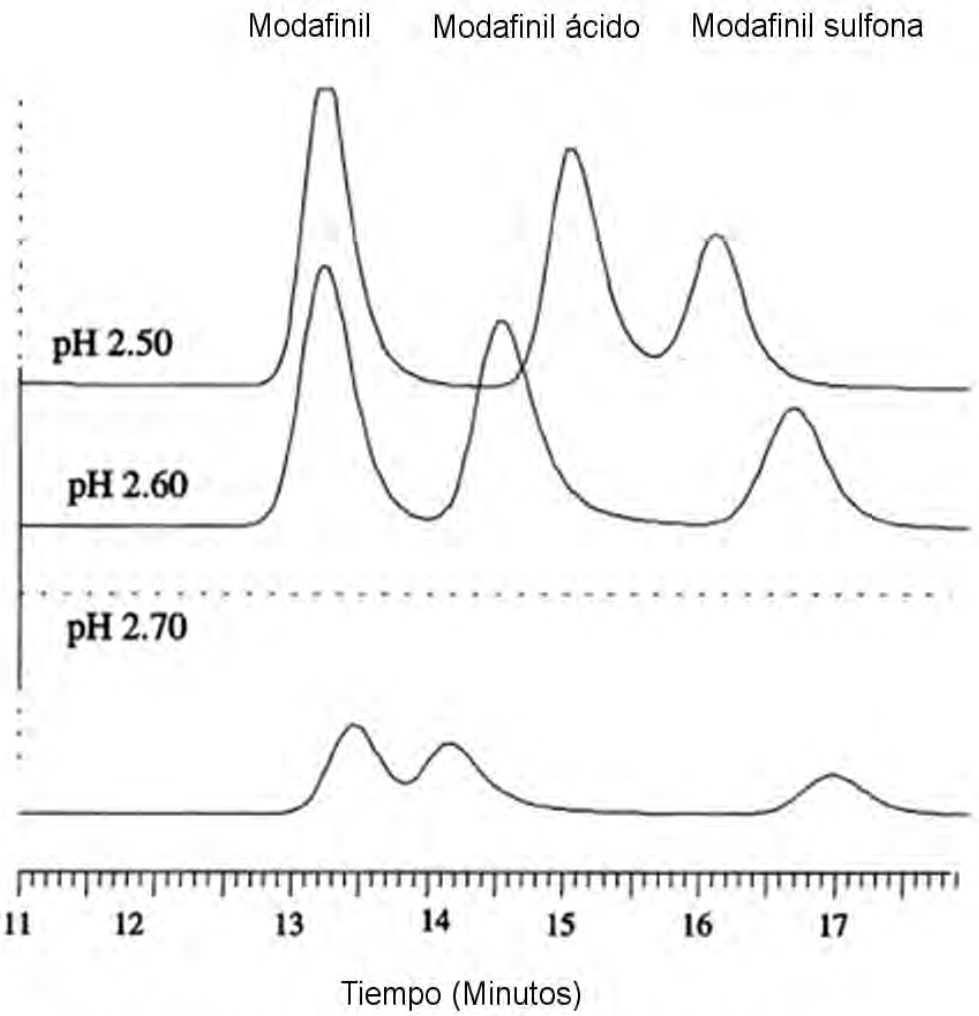
TABLA 9 DETERMINACIÓN DE MODAFINIL, MODAFINIL ÁCIDO Y MODAFINIL SULFONA EN PLASMA HUMANO UTILIZANDO UNA EXTRACCIÓN L-L Y CLAR.

Gorman SH. 2002

MATRIZ	ESTUDIO APLICADO A/EN:	TIPO DE DETERMINACIÓN	PROPÓSITO DEL ESTUDIO	TIPO DE ELUCIÓN		FASE MÓVIL	
						COMPONENTES	PROPORCIÓN
Plasma	Humano	CLAR Calentamiento-Enfriamiento. Hypersil BDS fenil	Determinación y Farmacocinética	Fase Reversa	Isocrática	Buffer de fosfatos pH 2.5 0.02 M-MeOH	64:36:00
DETECTOR	COLUMNA				TEMPERATURA		TIEMPO DE ANALISIS
	D.I.	MARCA	LONGITUD	TAMAÑO DE PARTÍCULA	Columna	Automuestreador	
Arreglo de diodos	2 mm	Calentamiento-Enfriamiento. Hypersil BDS fenil	150 mm	5.0 µm	30 °C	30 °C	26 min.
UV 235 nm		Perkin Elmer					
VOLUMEN DE INYECCIÓN	t_R	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	VELOCIDAD DE FLUJO	EQUIPO	RENDIMIENTO DEL SISTEMA	OBSERVACIONES	VALIDACIÓN
0.020 mL	EI: 7 min M: 13 MA:14 MS:16	LOQ= 0.1 µg/mL	0.3 mL/min	Perkin Elmer, bomba, automuestreador y detector	NA	La concentración máxima alcanzada fue a las 5h.	LOD, Precisión, Exactitud. Estabilidad, Linealidad

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	Extracción líquido-líquido. La extracción L-L de los analitos y el SI se hizo con Hexano:Diclorometano:CH_3COOH (55:45:2). La eficiencia de la extracción de 0.1 µg/mL fue de 91.3% y de 20 µg/mL fue de 87.9%.
SOLUCIÓN STOCK	Las soluciones stock (500 µg/mL) con los 3 analitos se prepararon con DMF.
CURVA DE CALIBRACIÓN	Se hizo un pool de plasma. Se tomó una alícuota de 0.220 mL (0.200 mL de plasma+0.020 de DMF) + 0.550 µg (0.050 µg de una solución 11 µg/mL)de EI y se centrifugó. Se acidificaron con HCl 2.0 N (0.200 mL)(por los efectos de pH en el edo. de ionización de MA y del EI, se agrego para protonar los COOH) y se extrajeron en 5 mL de Hexano:Diclorometano:CH_3COOH (55:45:2) en vortex durante 2 min. Se asume que el CH_3COOH glacial puede mejorar la extracción de los ácidos. Después de una centrifugación de 10 min, la capa orgánica se transfirió a un tubo limpio y se evaporó a sequedad a 30 °C bajo una corriente de nitrógeno. El residuo fue constituido con 0.250 mL de buffer de fosfatos pH 2.5 0.02 M- ACN (70-30).

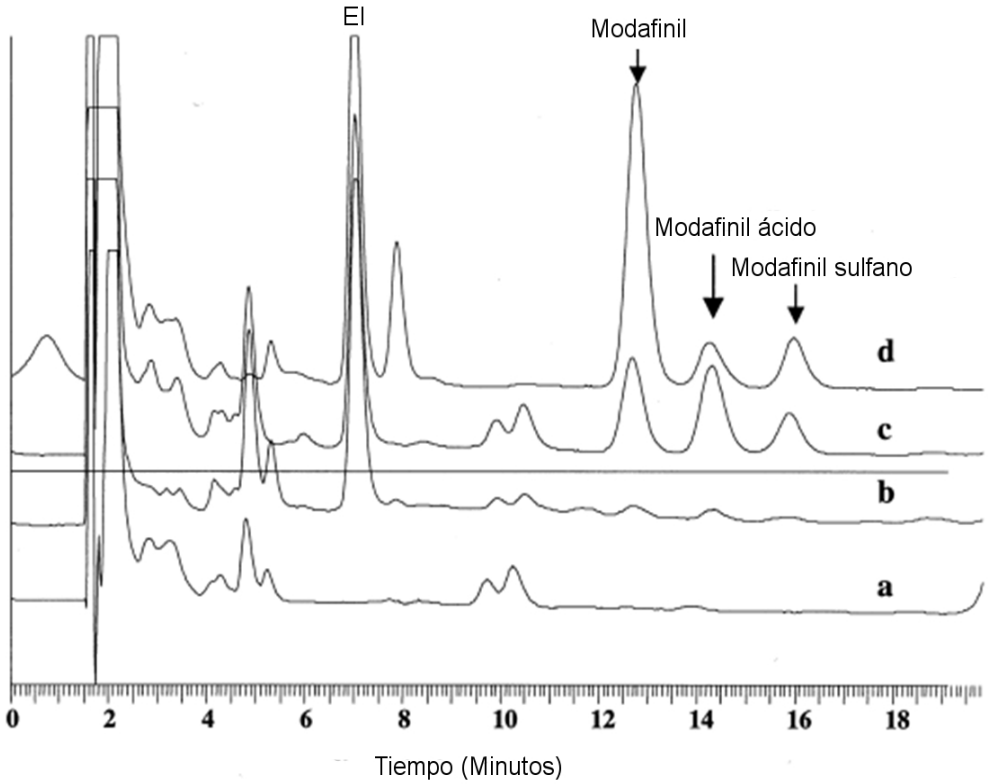
Se cuantificó modafinil y sus dos metabolitos (MA y MS). El límite de cuantificación práctico, está definido como la mínima concentración que puede ser medida rutinariamente con precisión y exactitud aceptable. El volumen de la muestra se reduce de 1 a 0.200 mL, (esto es importante especialmente en estudios pediátricos o en pacientes con bajos hematocritos) mientras baja el LOQ a 0.100 µg/mL para los tres analitos. Teóricamente, si la cantidad de soluto inyectada se mantiene constante, la sensibilidad puede ser inversamente proporcional al cuadrado del diámetro de la columna, por lo que se espera que un aumento de sensibilidad disminuya el LOQ. Se disminuye el gasto de volumen de solventes al usar una columna de boro reducida y una velocidad de flujo menor. Se utiliza un EI (Feniltio)ácido acético (extracción). El buffer de fosfatos se ajusta con ácido ortofosfórico.El volumen de inyección equivale a 0.02 mL de la matriz, para disminuir el ruido en la línea base debido a la matriz biológica. Los analitos fueron extraídos con una mínima cantidad de hexano. Con la extracción del plasma con hexano, no hay picos debidos a la matriz. Los mejores resultados cromatográficos fueron observados con una extracción diclorometano:hexano (45:55). La columna fenil fue elegida para cambiar la selectividad con respecto a los picos derivados de la matriz fue además incrementada por la elección de MeOH como modificador orgánico. La retención incrementa con una disminución de pH porque se elimina la ionización de los grupos COOH. A un pH 3.6 MA eluye antes que modafinil, pero en algunas muestras de plasma hay picos (matriz) que eluyen al mismo tiempo que modafinil, por lo que un aumento de pH no es práctico.



Cromatogramas a 40 mV en escala completa

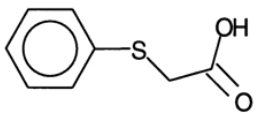
El efecto de pH en la resolución de modafinil, modafinil ácido y modafinil sulfona.

Figura 29 Efecto de pH en la resolución.



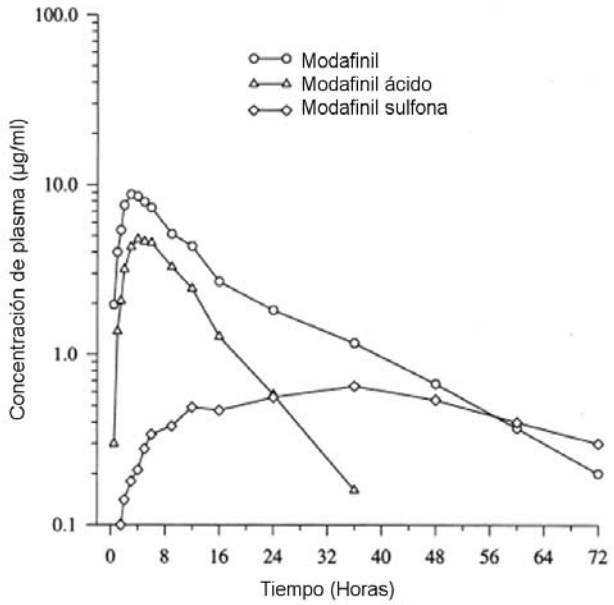
Cromatogramas de 80 mV en escala completa

Figura 30 Cromatogramas representativos de los extractos de: (a) Plasma humano control. (b) Plasma cargado con 0.100 µg/mL de M, MA y MS y 0.550µg de EI. (c) Plasma estándar cargado con 1.0µg/mL de M, MA y MS y 0.550µg de EI. (d) Muestra de plasma de un voluntario después de la administración oral de 400mg de M (concentraciones calculadas: M= 3.09µg/mL; MA= 0.495µg/mL y MS= 1.24µg/mL).



(Feniltio) ácido acético

Figura 31 Estándar interno.



Curvas de la concentración de plasma vs. tiempo para modafinil, modafinil ácido y modafinil sulfona en voluntarios sanos después de la administración oral de una dosis de 400mg de modafinil.

Figura 32 Curvas de concentración plasmática.

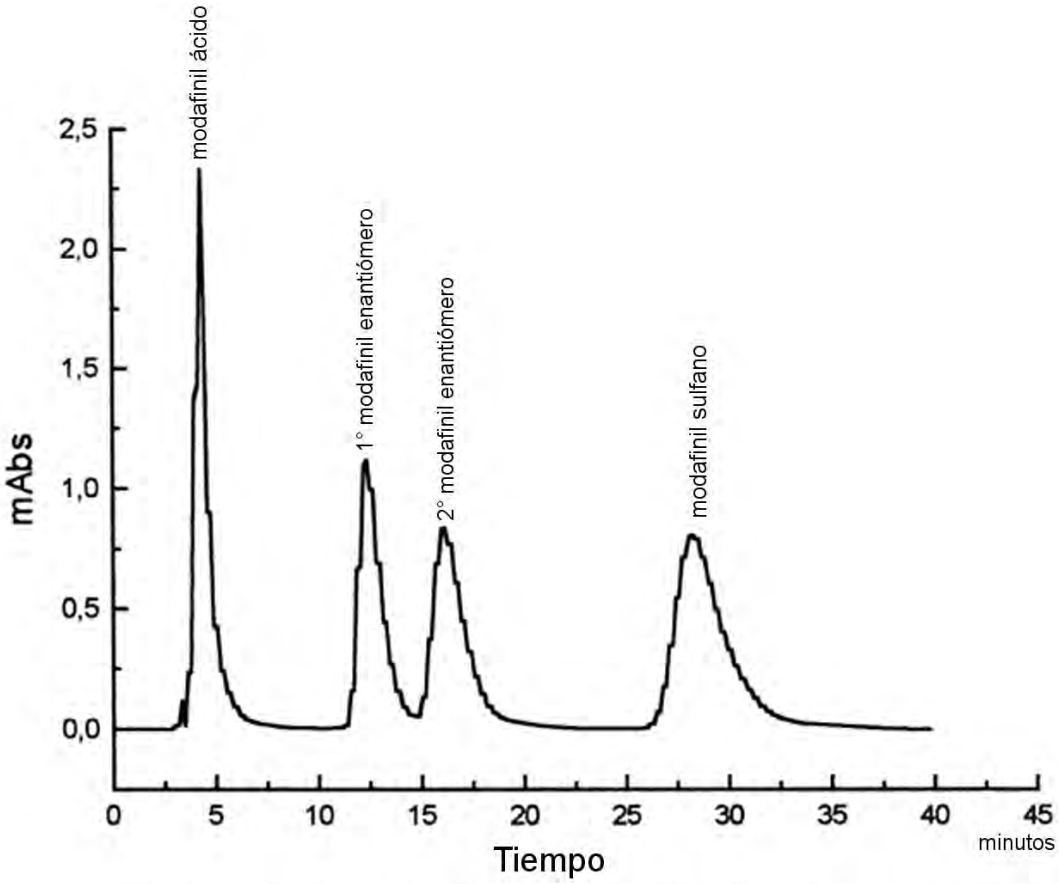
TABLA 10 ANÁLISIS ENANTIOSELECTIVO PARA (±)-MODAFINIL

Cass QB, Khon CK, Calafatti SA, Aboul-Enein HY. 2001

MATRIZ	ESTUDIO APLICADO A/EN:	TIPO DE DETERMINACIÓN	PROPÓSITO DEL ESTUDIO	TIPO DE ELUCIÓN		FASE MÓVIL	
						COMPONENTES	PROPORCIÓN
Plasma	Humano	CLAR quiral	Farmacocinética	Fase Reversa	Isocrática	ACN:H_2O	25:75
DETECTOR	**COLUMNA**				**TEMPERATURA**		**TIEMPO DE ANALISIS**
	D.I.	**MARCA**	**LONGITUD**	**TAMAÑO DE PARTÍCULA**	**Columna**	**Automuestreador**	
228 nm	0.46 cm	Quiral: amilosa tris[(S)-1-feniletilcarbamato]	15 cm	7 µm 500Å	Temp. Ambiente	Temp. Ambiente	45 min
	NA	Varian C18	APS Nucleosil	NA			
VOLUMEN DE INYECCIÓN	**t_R**	**LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**	**VELOCIDAD DE FLUJO**	**EQUIPO**	**RENDIMIENTO DEL SISTEMA**	**OBSERVACIONES**	**VALIDACIÓN**
50L µL	R-modafinil: 11 S-modafinil: 16	LOQ: 0.02 µg/mL. LOD: 0.005 µg/mL	0.5 mL/min	Bomba Shimadzu, autoinyector y detector UV	NA	α=1.4 Rs=1.5	Exactitud, Precisión, %Recobro, LOQ y LOD

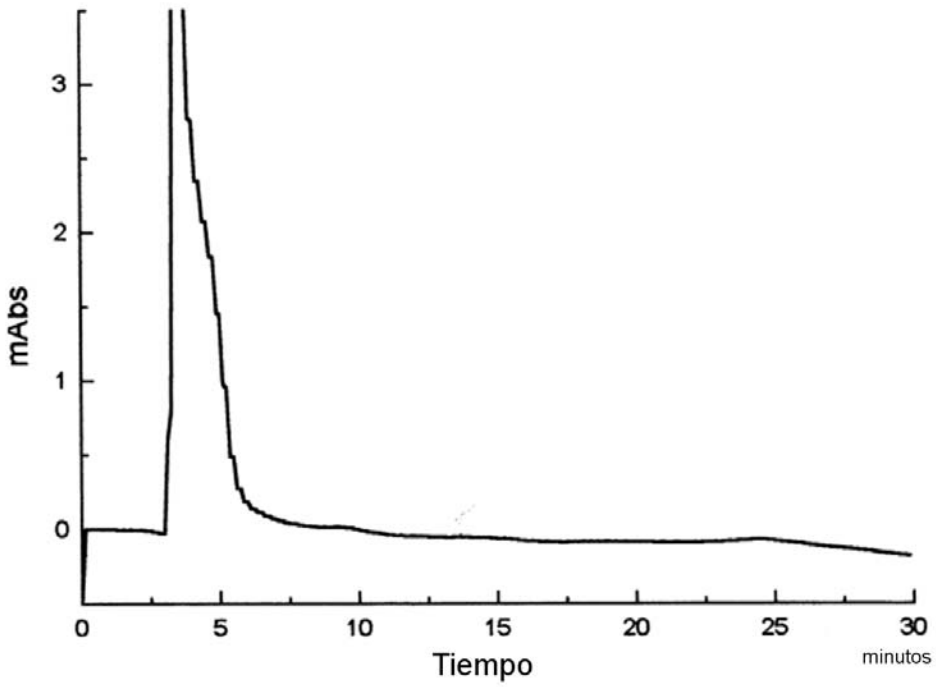
TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	Extracción fase sólida. 1 mL de plasma. La preparación de la muestra fueron alícuotas de (50 µL/mL), las cuales se evaporaron con una corriente de nitrógeno a temp amb, a cada tubo se le agrego 0.5 mL de plasma y 0.5 mL de agua. Se transfirieron a cartuchos para la extracción. Se pasaron 2 mL de MeOH, 2 mL de H_2O, las muestras de plasma, 1 mL NaCl, 1 mL H_2O, 1 mL de solución ácida de ACN 20% y finalmente 1 mL H_2O. Las mezclas se reconstituyeron con 250 µL de MeOH y se inyectaron 50 µL al sistema cromatográfico. Se usó un cartucho C18.
SOLUCIÓN STOCK	La solución stock de modafinil se preparo en MeOH (1000 µg/mL). De esta solución se preparó otra de 80 µg/mL y después una serie de soluciones diluidas a 40, 20, 10, 5 y 1 µg/mL
CURVA DE CALIBRACIÓN	Las concentraciones utilizadas para la curva de calibración fueron: 6, 4, 2, 1, 0.5 y 0.3 µg/mL por triplicado. Se obtuvo una buena linealidad de la concentraciones de 0.15-3 µg/mL de cada enantiómero

En este proyecto se llevó a cabo la síntesis de modafinil. Fases estacionarias derivatizadas a base de polisacáridos han mostrado ser eficientes en la resolución de series de sulfóxidos quirales. Los t_0 se estimaron usando 1,3,5-tri-ter-butilbenceno para el modo normal y ACN para fase reversa. . Fase normal: Hexano:EtOH (65:35) Selectividad=2.2; Rs=4.5. k=4.52 (1°) y 9.48 (2°). En esta condición, MS tiene el msmo K que el primer enantiómero LOD:0.005 µg/mL. Se sabe que la selectividad se puede ganar alterando el modo de elución, se trabajó primero bajo condiciones de elución polar con 100% de EtOH y MeOH, aun así no hubo diferencia en el K de MS. Se cambio a fase reversa y se observó un incremento del K, aunque la selectividad deseada no se logró usando MeOH:H_2O (70:30) hizo que el K de MS fuera el mismo que el 2° enantiómero. Al incrementar la cantidad de H_2O al 50% el K de MS aumento pero aun así no se obtenía una buena selectividad. El uso de ACN:H_2O fue la FM que mostró la selectividad deseada. K'=0.3 (MA), 2.8 (+modafinil), 3.9 (2°modafinil) y 7.9 (MS) en FR. LOQ= 0.02 µg/mL. El pool blanco de plasma no muestra interferencia de compuestos endógenos. Se prefirió una calibración externa debido a la preparación de la muestra. Bajo condiciones de elución en FaseNormal, este método puede ser usado para analizar la pureza enantiomérica en volumen farmacéutico. Para esta aplicación la fuerza de la FM debe incrementarse a Hexano:EtOH (60:40).



Cromatograma del análisis de los enantiómeros de modafinil y sus dos metabolitos mayoritarios

Figura 33 Cromatogramas.



Cromatograma del pool de plasma

Figura 34 Plasma control.

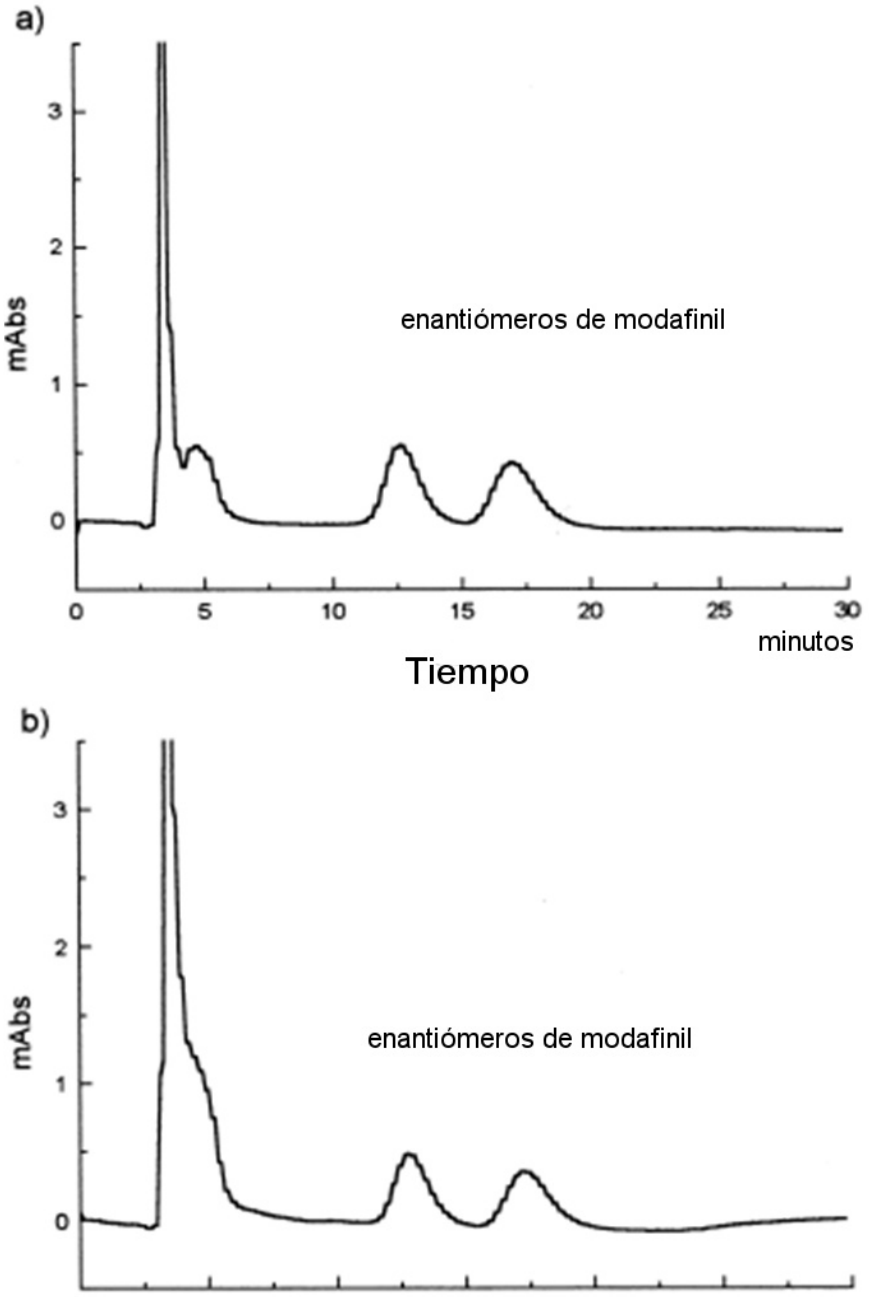


Figura 35 Cromatogramas de: (a) Plasma control. (b) Muestra de plasma que contiene (±)-modafinil.

TABLA 11 DETERMINACIÓN DE MODAFINIL EN ORINA Y PLASMA POR CLAR EN FASE REVERSA.

Schwertner HA, Kong SB. 2005

MATRIZ	ESTUDIO APLICADO A/EN:	TIPO DE DETERMINACIÓN	PROPÓSITO DEL ESTUDIO	TIPO DE ELUCIÓN		FASE MÓVIL	
						COMPONENTES	PROPORCIÓN
Plasma Orina	Humanos	CLAR	Farmacocinética	Fase reversa	Isocrática	MeOH:H_2O: CH_3COOH	(500:500:1)

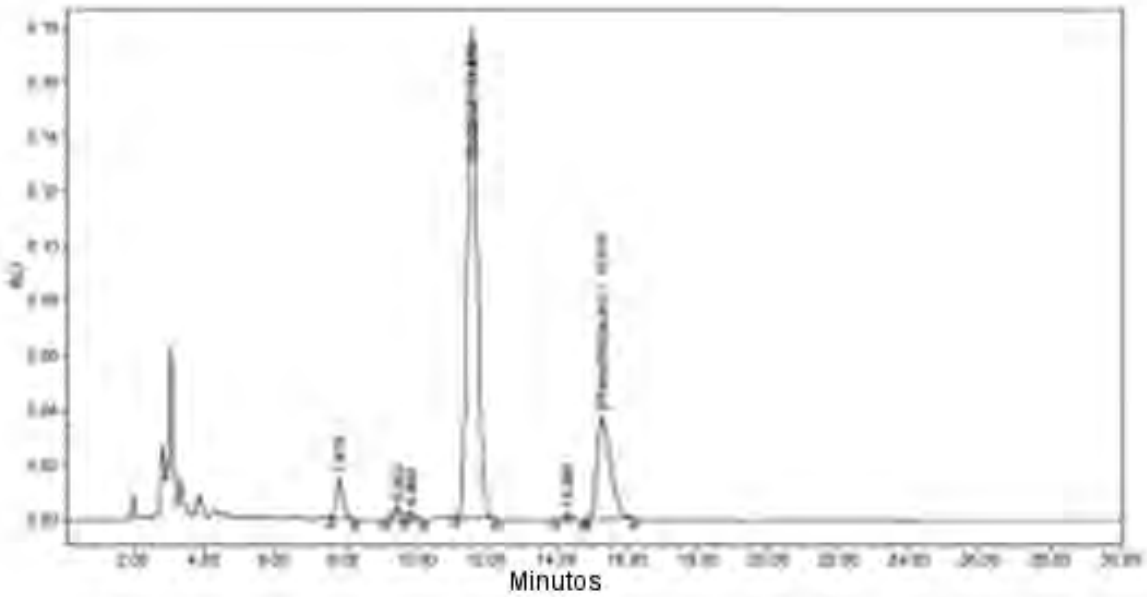
DETECTOR	COLUMNA				TEMPERATURA		TIEMPO DE ANALISIS
	D.I.	MARCA	LONGITUD	TAMAÑO DE PARTÍCULA	Columna	Auto muestreador	
Arreglo de fotodiodos	4.6 mm	Symmetry C18	250 mm	NA	Temp. Ambiente	Temp. Ambiente	30 min orina
220 orina-233 plasma (nm)		HPLC Waters					20 min plasma

VOLUMEN DE INYECCIÓN	t_R	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	VELOCIDAD DE FLUJO	EQUIPO	RENDIMIENTO DEL SISTEMA	OBSERVACIONES	VALIDACIÓN
10 µ L, 30 µL	11.5 min	0.1 µg/mL	1.0 mL/min	Waters detector, auto muestreador	NA	NA	Linealidad, Exactitud, Precisión, % Recobro, LOD

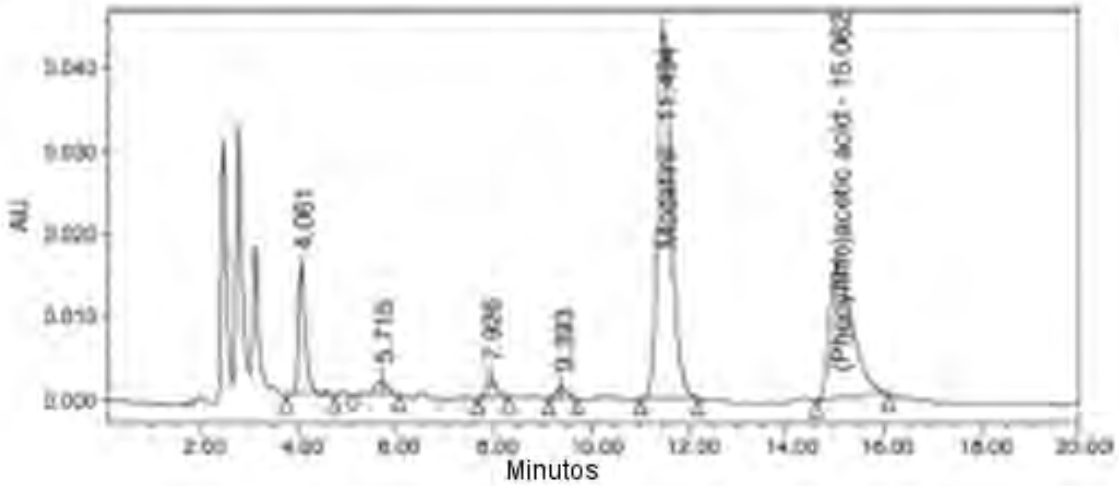
TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	Extracción: Acetato de etilo (orina) y Acetato de etilo:CH_3COOH(100:1) (plasma). EXTRACCIÓN ORINA: 5 mL de X (X= orina con M para calibrar, control negativo de orina o muestras de orina de individuos que tomaron M). Se agregaron 10 mL de acetato de etilo. Se agitó en un agitador Eberbach durante 30 min a velocidad baja. Se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min. Después de la extracción con acetato de etilo, se agregaron 50µg de EI. Se mezcló en vortex durante 10s. Se pipeteo la fase orgánica y evaporó bajo N_2 a 60 °C. Se reconstituyó la mezcla con 700 µL de FM. Se mezcló en vortex durante 10s. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min. Se colocó el extracto en los viales. EXTRACCIÓN PLASMA: 2 mL de Y (Y= plasma con M para calibrar, control negativo de plasma o muestras de plasma de individuos que tomaron M). Se agregaron 20 µg de EI {(feniltio)ácido acético [1 mg/mL MeOH]}. Se mezcló en vortex durante 10s. Se agregaron 10 mL de Acetato de etilo:CH_3COOH(100:1) (esta mezcla puede extraer el EI cuando se le agrega al plasma, además es capaz de extraer el MA; una ligera desventaja es que cuando se reconstituye el extracto queda turbio y hay que centrifugar otra vez a 3000xg durante 5 min antes de transferirlo al vial). Se agitó en un agitador Eberbach durante 30 min a velocidad baja. Se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min.*
SOLUCIÓN STOCK	M (1mg/mL): Pulverizar 10 tabletas de M 100 mg. Se extrajeron (2 extracciones) 100 mg de las tabletas pulverizadas con 50 mL de MeOH en un agitador Eberbach durante 30 min. Se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min. Se guardaron a 4 ±3 °C.
CURVA DE CALIBRACIÓN	Se hicieron pools de plasma y orina, estos fueron extraídos y analizados por CLAR para asegurar que no hay sustancias relacionadas que puedan interferir en el análisis de M o el EI. Después se procedió a hacer la curva agregando volúmenes de la solución stock de M para obtener concentraciones de: 0.1, 1, 5, 10 y 20 µg/mL (se evaporo el MeOH) a alícuotas de 10 mL de plasma u orina para resuspenderlo.

Ya que modafinil es un estimulante del SNC, tiene la posibilidad de ser un fármaco de abuso (produce efectos duraderos de vigilia, sin atributos adictivos o rebote de sueño) por lo que se requieren métodos de monitoreo del fármaco precisos. EI: (feniltio)ácido acético. El MA se puede usar para confirmar el consumo de M en casos de antidoping. En este estudio no se analiza porque no está disponible comercialmente. La composición de la FM es compatible con la mayoría de las columnas de fase reversa. Parámetros evaluados: exactitud (orina y placebo) y reproducibilidad. Se evaluaron también muestras de plasma de sujetos que consumieron aspirina, y orina de sujetos a los que se les había administrado acetaminofen para determinar si estos interfieren con el análisis. Para el análisis de M se evaluaron 3 posibles EI: (a) 3-Acetamidofenol, (b) (Feniltio) ácido acético y (c) Carbamazepina. (a) y (c) se pueden extraer rápidamente de plasma y orina con acetato de etilo. (b) requiere una extracción bajo

condiciones ácidas o se tiene que agregar al solvente de la extracción después de la extracción. Se eligió (b) porque no se encontraron sustancias de la extracción que pudieran interferir en el análisis. %DE RECOBRO: Se determinó comparando las concentraciones de las calibraciones de orina y plasma contra los estándares de M. La sensibilidad analítica de M fue 1.7, más alta a 220 nm que a 233 nm, aunque hubo más interferencias debido a la extracción. Por eso se eligió 233 nm. Las concentraciones de M en las muestras de orina tomadas después de 2 h de la administración fueron casi idénticas cuando se analizaron a 220 y 233 nm (13.5±9.2 µg/mL)(13.6±9.6 µg/mL). La exactitud de la determinación de M se evaluó al analizar la orina de 32 individuos que tomaron dosis de 200 y 400mg de M y de la orina de 16 individuos a los que se les administró placebo. Las muestras fueron aleatorias, esto es, no se sabía cuáles eran las muestras con M y cuáles con placebo. Con los resultados obtenidos se clasificaron efectivamente las 16 negativas y 32 positivas muestras. Al evaluar el suero y la orina de los individuos que tomaron aspirina y acetaminofen, demuestra que estas sustancias no interfieren en el análisis. La diferencia de este método analítico con los reportados anteriormente es que es un estudio farmacocinético, difiere los disolventes utilizados para la extracción (Burnat y Gorman 2002 utilizan una fase sólida absorbente), la composición de la FM (Gorman usa ACN y buffer de fosfatos pH 2.5 para plasma y pH para orina; Burnat usa ACN y ácido ortofosfórico; y Moachon ACN y CH_3COOH. la ventaja de este método es que elimina el riesgo de intoxicación asociados al uso de ACN y diclorometano y los efectos de la acidez de los buffers de fosfatos en la columna cromatográfica y las bombas. La sensibilidad del método es comparable con la de Burnat y Gorman, aunque la sensibilidad se puede incrementar además de resuspender el extracto en una cantidad menor de FM (100 L), inyectando un volumen mayor o usando una columna con DI más pequeño.



Cromatogramas de modafinil (19.8 µg/mL) y el estandar interno (feniltio)ácido acético extraído de orina.



Cromatograma de modafinil (10.0 µg/mL) y el estandar interno (feniltio) acido acético extraído de plasma.

Figura 36 Cromatogramas.

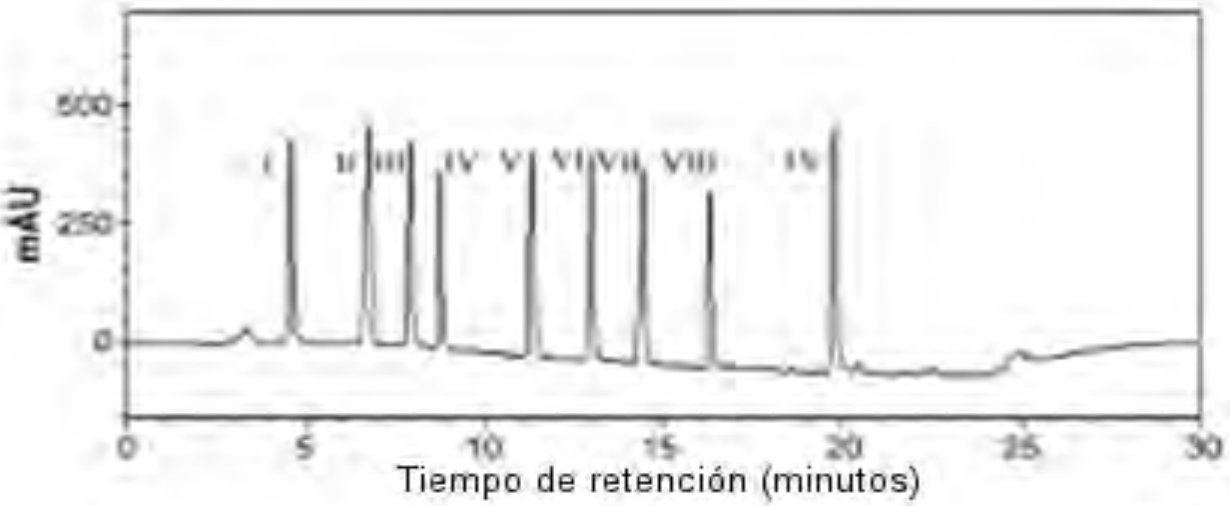
TABLA 12 DETERMINACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE CL EN FASE REVERSA PARA LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SUSTANCIAS RELACIONADAS DE MODAFINIL EN GRANDES CANTIDADES DEL FÁRMACO.

Nageswara R, Shinde DD, Kumar M. 2007

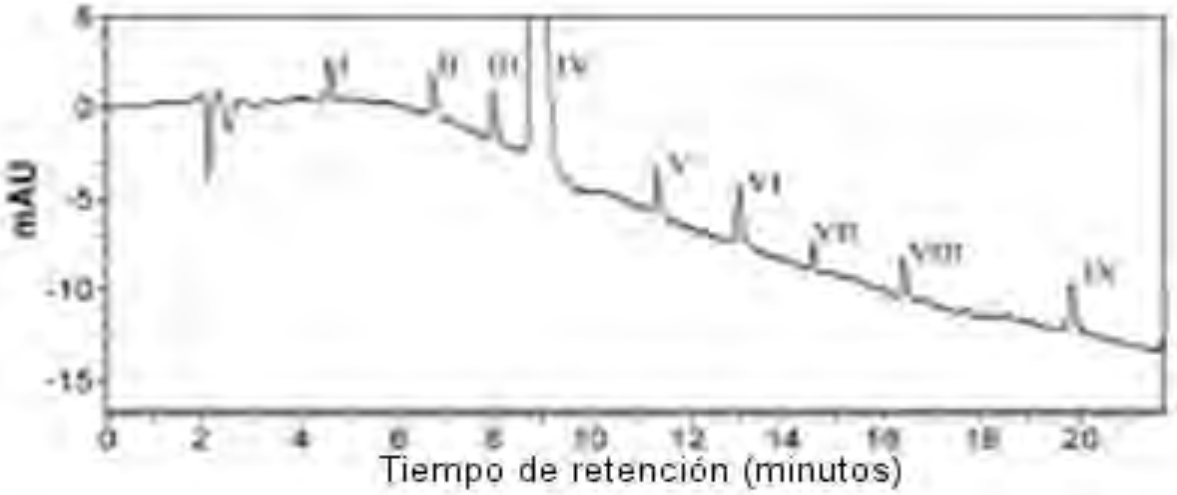
MATRIZ	ESTUDIO APLICADO A/EN:	TIPO DE DETERMINACIÓN	PROPÓSITO DEL ESTUDIO	TIPO DE ELUCIÓN		FASE MÓVIL	
						COMPONENTES	PROPORCIÓN
NA	Graneles	CLAR para separar y cuantificar sustancias relacionadas de modafinil como producto terminado.	Evaluar el efecto de pH, temperatura y modificador orgánico en la resolución.	Fase Reversa	Gradiente	ACN: Acetato de amonio 0.02M	Na
DETECTOR	COLUMNA				TEMPERATURA		TIEMPO DE ANALISIS
	D.I.	MARCA	LONGITUD	TAMAÑO DE PARTÍCULA	Columna	Automuestreador	
Detector de arreglo de fotodiodos (Shimadzu) 225 nm	4.6 mm	Kromasil C18	25 cm	5 µm	30 °C	30 °C	20 minutos
VOLUMEN DE INYECCIÓN	t_R	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	VELOCIDAD DE FLUJO	EQUIPO	RENDIMIENTO DEL SISTEMA	OBSERVACIONES	VALIDACIÓN
NA	8 min	LOD: $2.10X10^{-8}$ g LOQ:$6.11x10^{-8}$ g.	NA	2 bombas, autoinyector, desgasificador.	NA	NA	especificidad, exactitud, precisión, linealidad, robustez, LOD

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	Las soluciones de sulfuro, sulfóxido, MS, MA y etil éster fueron preparadas disolviendo cantidades conocidas de los componentes en la misma disolución usada como fase móvil

Se desarrollo un método cromatográfico capaz de eluir y resolver M y sus sustancias relacionadas originadas desde la síntesis. Se estudiaron los efectos de pH, temp y el % de modificador orgánico en la resolución. Separación y cuantificación de sustancias relacionadas: sulfuro, sulfóxido, MS, MA y derivados de éster, éstos son 8 intermediarios que pueden estar presentes como impurezas potenciales en los productos finales de modafinil. Este método no sólo es adecuado para monitorear las reacciones durante el proceso sino también como aseguramiento de la calidad de modafinil. De acuerdo a la ICH, los límites de sustancias relacionadas e impurezas en ingredientes activos debe ser ≤0.1 %. Para productos finales, las impurezas en la dosis diaria del fármaco ≤ 2 g/día debe ser reportado con un umbral ≤ 0.05 %, umbral de identificación ≤ 0.10 % y un umbral de calificación ≤ 0.15 %. Para fármacos de uso diario con dosis ≥ 2g/día deben ser 0.3, 0.05 y 0.05 % respectivamente. Por eso hay una gran necesidad de métodos analíticos, los cuáles sean útiles para monitorear los niveles de impurezas en los productos finales de M durante el proceso de desarrollo. Gradiente de elución con ACN 30% al min 0, con un incremento gradual a 60% a los 8 min, un incremento a 80% a los 13 min, de 13 a 20 min 90% a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min a 30 ºC. El disolvente fue filtrado a través de un filtro de PTFE 0.45 µm y desgasificado con vacío. Adecuabilidad del sistema: se llevó a cabo utilizando 0.1 % de todos los intermediarios del proceso cargados al M y evaluados al hacer 5 inyecciones. El sistema fue considerado como adecuado al tener un factor de coleo para modafinil ≤1.2. La resolución fue mayor a 3.9. Todas las sustancias que se sintetizaron fueron caracterizadas por HNMR y espectrometría de masas. Los compuestos III y IV tuvieron poca resolución. Varios sistemas isocráticos han sido probados para la separación y resolución de los compuestos, pero debido a la alta diferencia en polaridad del sulfuro, sulfóxido y sulfona, los esfuerzos no rinden resultados satisfactorios. Como la polaridad es diferente, todos los compuestos muestran diferente comportamiento en la retención. El orden de elución de los 9 compuestos en condiciones específicas fue: ácido>amida>éster y sulfóxido>sulfóxido>sulfuro. Todas las sustancias relacionadas muestran absorción en el rango de 210-235 nm. Efecto de la temperatura: la temperatura no mostró ningún cambio en el orden de elución pero hubo un pequeño efecto en el tiempo de retención, resolución y factor de coleo. Se midió el efecto a 7 diferentes temperaturas: 15, 20, 25, 30,35,40 y 45 ºC. Modafinil, ha mostrado una menor resolución de 3.69 a 15ºC y la más alta resolución= 4.0 a 30ºC. Por lo que esta última fue la elegida para el análisis de todos los compuestos mostrando una buena resolución y factores de coleo en un rango aceptable. Efecto del pH: con una disminución de pH el coleo se incrementa y el K' decrece para todos los compuestos. Aun pH de 6.5 se obtuvieron picos simétricos y con buena resolución.

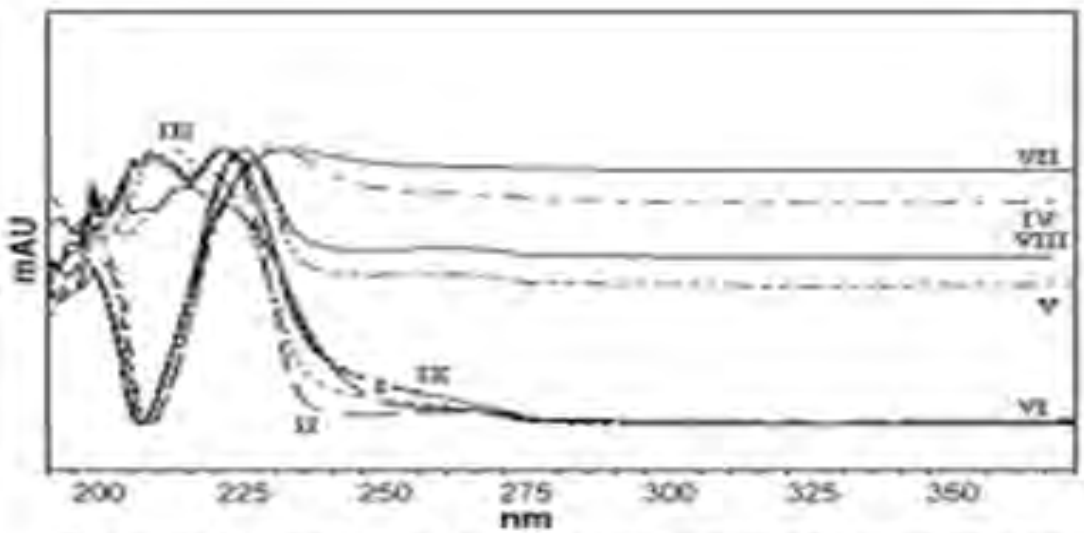


Cromatograma típico de una mezcla sintética de modafinil (IV) y sus compuestos relacionados.

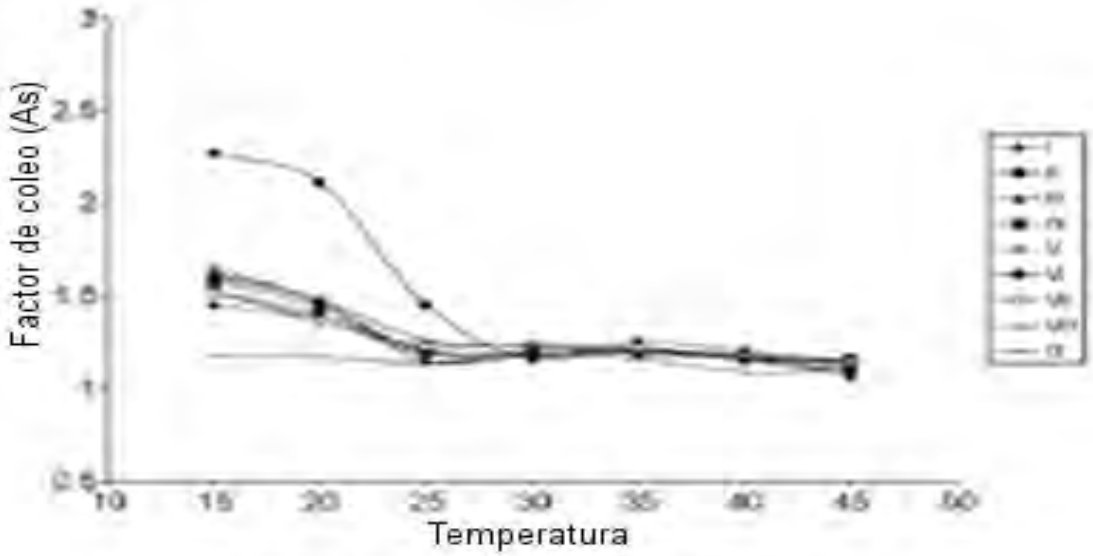


Cromatograma típico de modafinil (IV) cargado con 0.1% de sustancias relacionadas.

Figura 37 Cromatogramas de modafinil.



Espectro de absorción UV (IV) y sus sustancias relacionadas.



Efectos de temperatura en el coleo de picos.

Figura 38 Espectros de absorción y As.

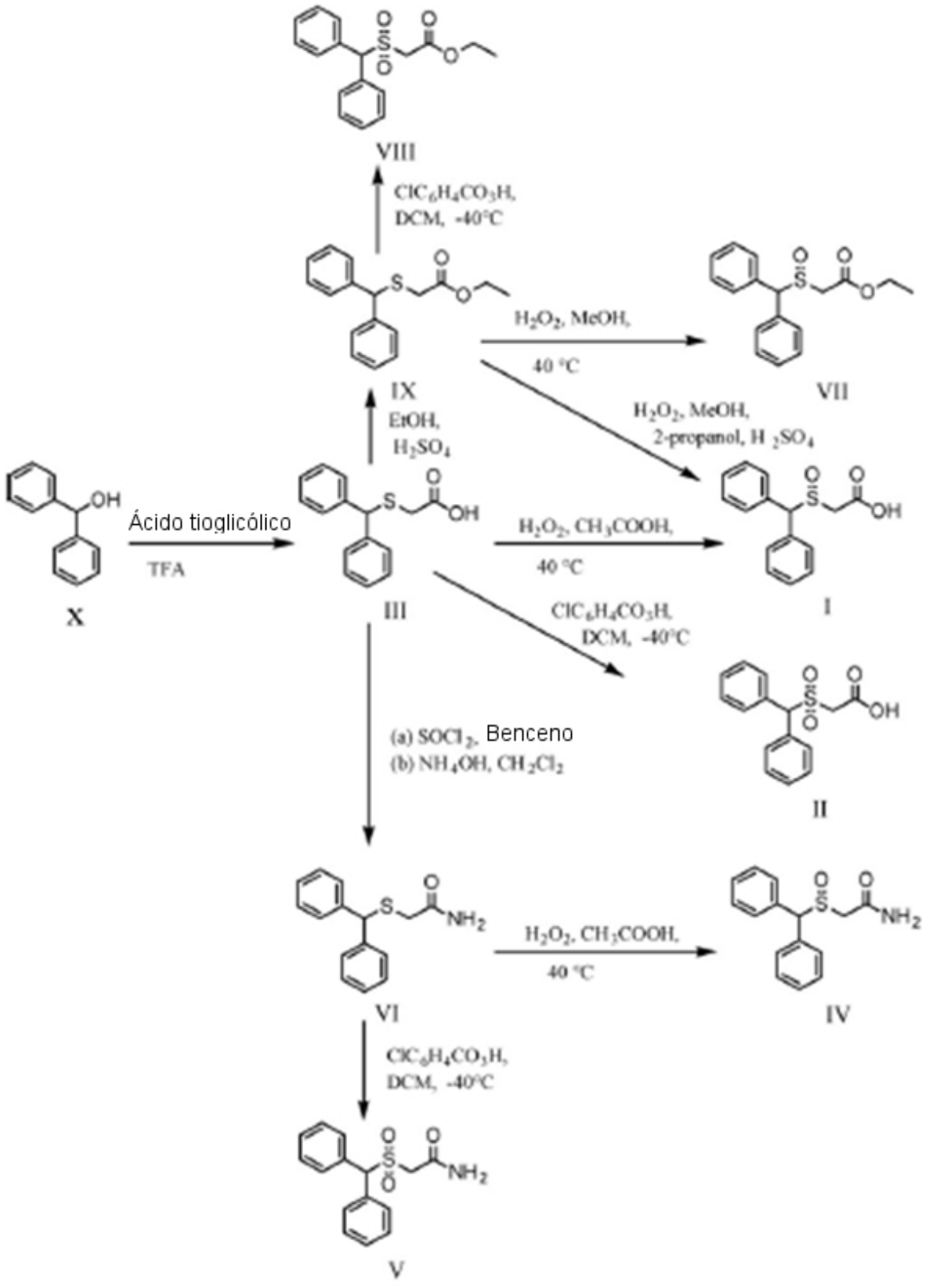
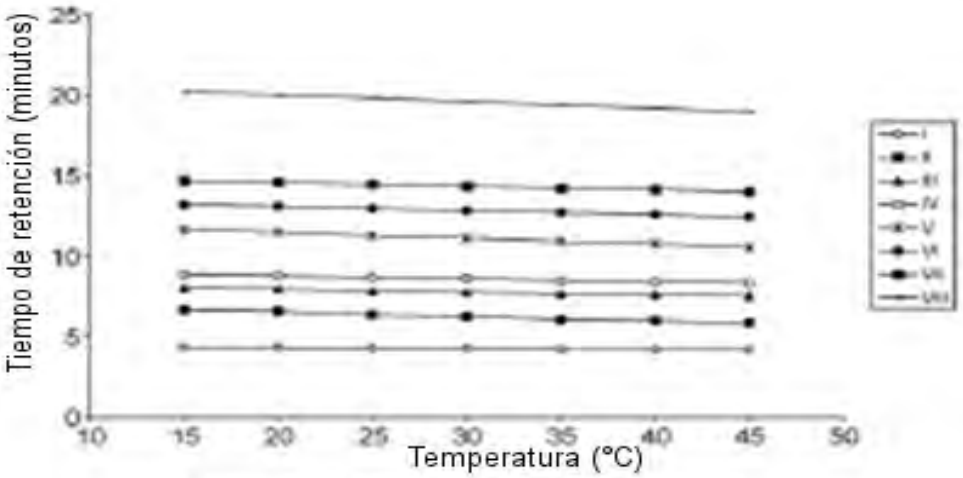

VIII
$ClC_6H_4CO_3H$, DCM, -40°C
IX
H_2O_2, MeOH, 40 °C
VII
EtOH, H_2SO_4
H_2O_2, MeOH, 2-propanol, H_2SO_4
Ácido tioglicólico
TFA
X
III
H_2O_2, CH_3COOH, 40 °C
I
$ClC_6H_4CO_3H$, DCM, -40°C
II
(a) $SOCl_2$, Benceno
(b) NH_4OH, CH_2Cl_2
VI
H_2O_2, CH_3COOH, 40 °C
IV
$ClC_6H_4CO_3H$, DCM, -40°C
V

Figura 39 Reacciones químicas involucradas en la síntesis de modafinil y sus sustancias relacionadas: I: modafinil sulfóxido ácido; II: modafinil sulfona ácido; III: modafinil sulfuro ácido; IV: modafinil sulfóxido; V: modafinil sulfona; VI: modafinil sulfuro; VII: modafinil éster sulfóxido; VIII: modafinil éster sulfona; IX: modafinil éster sulfuro; X: bencidrol.

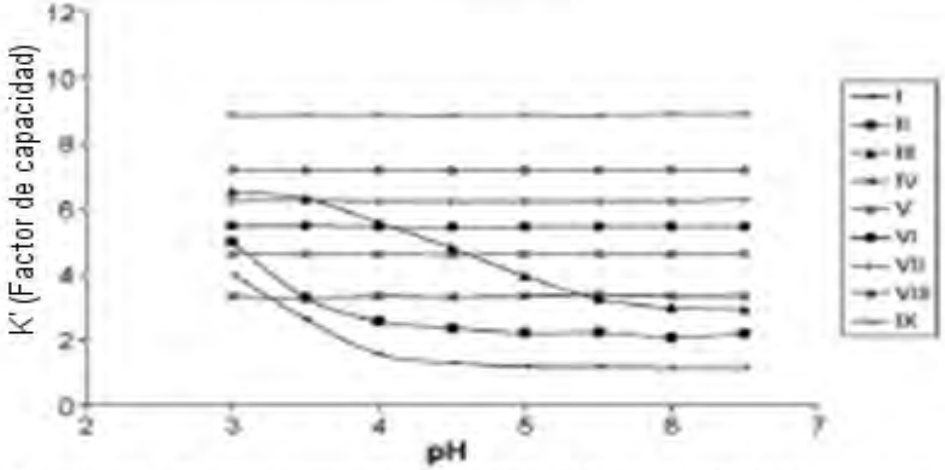


Efecto de la temperatura en la retención.

Efecto de pH en el coleo de los picos.

Factor de coleo (As)

pH	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
6.5	1.08	1.05	1.14	1.20	1.05	1.11	1.21	1.29	1.20
6.0	1.21	1.25	1.30	1.33	1.28	1.25	1.29	1.37	1.34
5.5	1.42	1.34	1.42	1.50	1.24	1.33	1.45	1.42	1.37
5.0	1.47	1.37	1.47	1.53	1.33	1.40	1.49	1.51	1.46
4.5	1.51	1.46	1.41	1.54	1.46	1.49	1.54	1.53	1.60
4.0	1.74	1.53	1.55	1.61	1.63	1.54	1.57	1.64	1.71
3.5	1.55	1.59	1.57	1.83	2.12	1.95	1.71	1.71	1.98



Efecto del pH en los factores de capacidad de modafinil (IV) y sus sustancias relacionadas.

Figura 40 Efecto de temperatura y pH.

Tabla 13 Un método para la determinación de los niveles de plasma de los enantiómeros de modafinil, ±-modafinil ácido y modafinil sulfona por inyección directa de plasma humano y cromatografía bidimensional quiral-aquiral.

Cass QB, Ferreira T. 2008

MATRIZ	ESTUDIO APLICADO A/EN:	TIPO DE DETERMINACIÓN	PROPÓSITO DEL ESTUDIO	TIPO DE ELUCIÓN		FASE MÓVIL	
						COMPONENTES	PROPORCIÓN
Plasma	Humanos	Separación de columnas acopladas usando un medio de acceso restringido	Determinación en estudios farmacocinéticos	Fase Reversa	Gradiente	KH_2PO_4 0.01 M pH 5.1:CH_3CN:MeOH	73:22.5:4.5
DETECTOR	COLUMNA				TEMPERATURA		TIEMPO DE ANALISIS
	D.I.	MARCA	LONGITUD	TAMAÑO DE PARTÍCULA	Columna	Automuestreador	
UV-VIS (240-228 nm)	0.46 cm	Amilosa tris[(S)-1-fenilmetilcarbamato]	15 cm	7 µm	Temp. Ambiente	Temp. Ambiente	30 min
M:228 nm MA:228 nm MS:240 nm	0.46 cm, 0.7 cm	Octil BSA, APS-Hypersil	1.0 cm, 20 cm	10 µm, 5 µm			
VOLUMEN DE INYECCIÓN	t_R	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	VELOCIDAD DE FLUJO	EQUIPO	RENDIMIENTO DEL SISTEMA	OBSERVACIONES	VALIDACIÓN
100 µL	(±)MA:10 min (+)M:11 min (-)M:14 min	LOQ (+)-M: 0.100 µg/mL	0.8 mL/min	Shimadzu 2 bombas, autoinyector, desgasificador, interfase	280 inyecciones de plasma de 100µL	(+)modafinil fue el 1º en eluir.	Linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad y selectividad, LOQ, LOD, estabilidad, %recobro

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	Preparación de las muestras de plasma cargado: Para preparar las muestras de plasma fortificado, se hicieron alícuotas de 20 µL y el disolvente se evaporó bajo una corriente de nitrógeno. Los analitos secos fueron reconstituidos usando 200 µL de plasma humano. Alícuotas de 190 µL se colocaron en el automuestreador y se inyectaron 100 µL en el sistema CLAR con cambio de columna.
SOLUCIÓN STOCK	Solución estándar: Las soluciones stock fueron preparadas de acuerdo a M (20 mg), (±) MA y MS (10 mg) disueltos en 10 mL MeOH. Las tres soluciones fueron preparadas por separado (500 µg/mL) en alícuotas de 500 µL diluidas con 10 mL de MeOH.
CURVA DE CALIBRACIÓN	Se usaron sol std de M, MA y MS para cargar las muestras de plasma y hacer la curva de calibración para cada analito a las siguientes concentraciones: 0.100, 0.250, 0.500, 0.800, 2.00, 3.50 y 5.00 µg/ml para (+)M; 0.150, 0.250, 0.500, 0.800, 2.00, 3.50 y 5.00 µg/ml para (-)M y MA; 0.500, 0.800, 1.00, 2.00, 3.50 y 5.00 µg/ml para MS.

Sistema CLAR bidimensional: La separación de columnas acopladas que usan un medio de acceso restringido como la primera dimensión para excluir macromoléculas y retener micro moléculas, ha sido exitosamente usado para un gran número de fluidos biológicos. Se uso un sistema CLAR bidimensional acoplando un medio de acceso restringido (RAM) (una columna de albumina con suero bovino (BSA)) a una columna quiral (amilosa trsi[(S)-1-feniletilcarbamato]. La cuantificación se hace con la preparación de la muestra on-line. El sistema consiste en 2 bombas Shimadzu, una de las bombas contiene una válvula FCV-AL para la selección del disolvente. Una válvula de muestra CLAR 7000 Nitronic EA fue usada para automatizar el cambio de columna. El orden de elución fue determinado por la inyección de (+) y (-) M a las condiciones de separación establecidas. Los enantiómeros enriquecidos fueron obtenidos por una separación enantiomérica, usando una columna amilosa tris[(S)-1-feniletilcarbamato] cubierta con APS-Hypersil como fase estacionaria usando hexano: EtOH (50:50) como fase móvil a 3 ml/min. Las actividades ópticas de los enantiómeros separados fueron definidas usando un polarímetro Perkin Elmer modelo 241. A condiciones analítica y semipreparativa (+) M fue el primer enantiómero en eluir. Procedimiento del cambio de columna: La posición del dispositivo cambiador de columna alterno entre las posiciones uno y dos y fue controlado a través de eventos cronomatizados usando el Class-VP Software. Inicialmente, el cambiador de columna fue colocado en la posición uno y la muestra de plasma humano fue inyectada en la columna RAM. La secuencia de tiempo utilizada se enlista en la tabla uno. La válvula six-port permaneció en esta posición por 5.20 min, mientras que las primeras macromoléculas fueron descargadas por 2.5 min a una velocidad de flujo de 1 mL/min usando KH_2PO_4 0.01 M pH 2.5:CH_3CN (95:5) como FM y después eluyeron los analitos a 0.8 ml/min usando KH_2PO_4 0.01 M pH5.1:CH_3CN (70:30). Al mismo tiempo, la columna analítica fue acondicionada con KH_2PO_4 0.01 M pH5.1:CH_3CN (73:22.5:4.5) liberados por la bomba dos a una velocidad de flujo de 0.8 mL/min. Entonces, la válvula cambia a la posición dos redireccionando el flujo desde los desechos a la columna analítica; los analitos fueron eluidos dentro de la columna quiral entre 5.20 y 6.80 min a

una velocidad de flujo de 0.8 mL/min. Al término de este tiempo, la válvula fue cambiada de regreso a la posición uno y la bomba uno permaneció durante 10 min liberando KH_2PO_4 0.01 M pH5.1:CH_3CN (70:30) a una velocidad de flujo de 0.8 mL/min, para la última descarga de los solutos retenidos. Antes de acondicionar la columna RAM (1mL/min) con la FM inicial de la RAM, la columna fue limpiada durante 8 min usando KH_2PO_4 0.01M pH5.1:CH_3CN (40:60), también a una velocidad de flujo de 1mL/min. Después de la transferencia de los analitos a las columnas quirales, estos fueron analizados usando la misma FM en la que la columna quiral fue acondicionada (desde 6.8 a 30 min). No se requirió tiempo para la preparación de la muestra. Validación del método: Linealidad, selectividad, exactitud y precisión, recobro, LOQ, LOD y estabilidad. Recientemente una amplia gama de columnas RAM que permiten la inyección directa de fluidos biológicos han sido reportadas y han generado gran interés por que disminuyen tiempo de análisis. Permiten la inyección directa de las muestras biológicas, la columna RAM es capaz de remover componentes endógenos con alta eficiencia. Las fases estacionarias derivatizadas a base de polisacáridos han probado ser muy eficientes en la resolución de series de sulfóxidos quirales. El uso de amilosa trsi[(S)-1-feniletilcarbamato] en fase reversa muestra el mejor desempeño en la separación de enantiómeros de M y fue elegida como columna analítica. Para determinar el perfil de elución y los tiempos de retención de los analitos en la columna RAM, la columna fue directamente conectada al detector UV. Aunque las proteínas del plasma podrían eluir en los primeros cinco minutos usando solamente agua como FM, para precisar la retención del MS, fue necesario evaluar la influencia del pH de la FM. Para el cambiador de columna y la columna quiral fue necesario evaluar la influencia del pH en a resolución de los 4 compuestos. Para esto fue usado un buffer de fosfatos (0.01M) a diferente pH con ACN como modificador (75:25) a 0.5 mL/min. Es evidente una disminución en el factor de retención para MA por el incremento del pH del buffer de fosfatos, demostrando que la resolución entre los enantiómeros del ácido y M pueden ser ajustados por el pH de la FM. No se ha llevado a cabo ninguna evaluación de la separación de los enantiómeros del MA, en este estudio se lleva a cabo la cuantificación de la mezcla racémica. El tiempo de vida y la estabilidad de las columnas quiral y RAM BSA probaron ser muy buenas. La calidad del rendimiento de ambas columnas se mantuvo con más de 280 inyecciones de plasma de 100 µL cada una. La adsorción de residuos protéicos en los frits de acero inoxidable incrementó la presión de la columna RAM durante el desarrollo del método, pero con un solo paso de limpieza del frit se disminuyó la presión y se restauró la columna a su nivel de desempeño original.

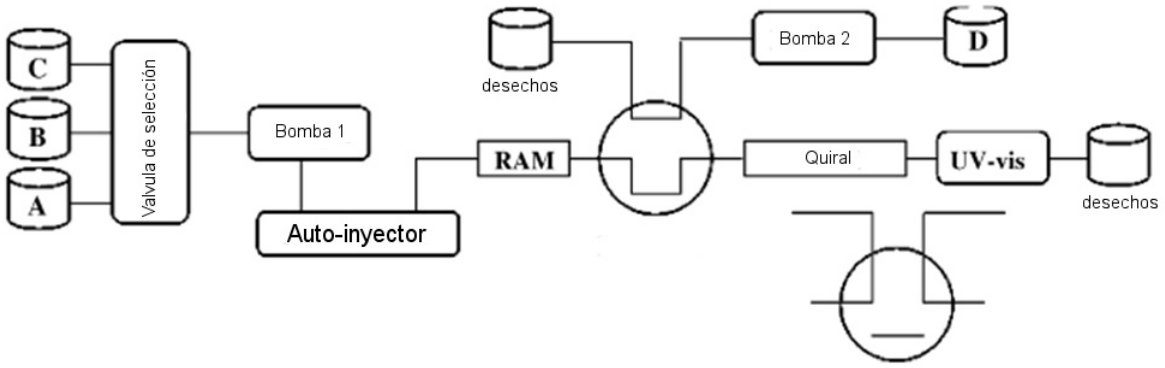
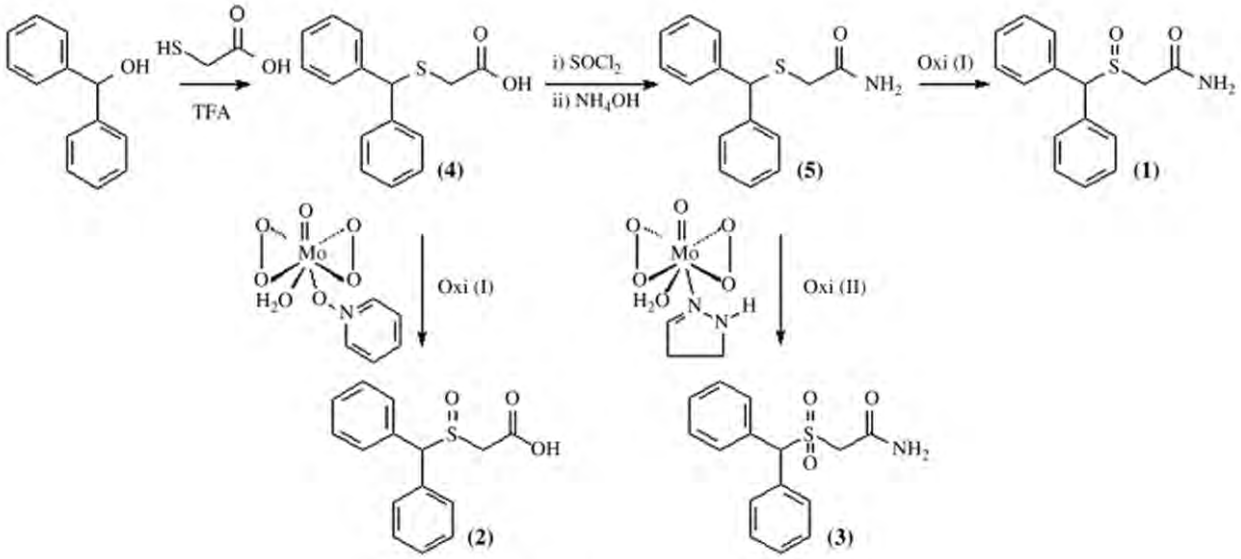


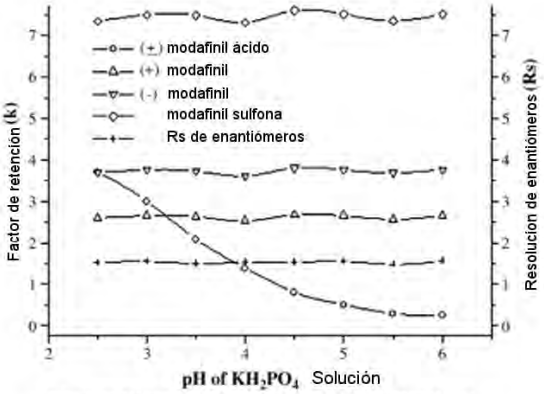
Diagrama esquematico del sistema de cambio de columnas

Figura 41 CLAR bidimensional.

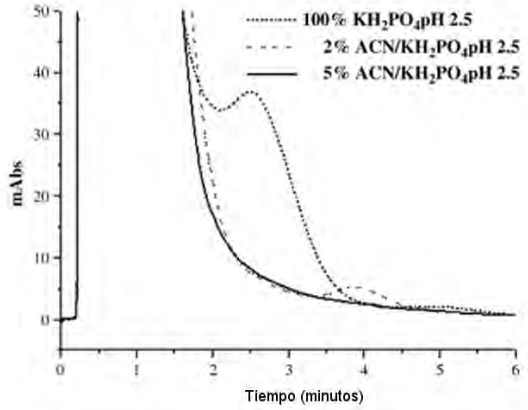


Esquema de reacción usado para la síntesis de M,(±)MC y MS.

Figura 42 Reacciones involucradas en la síntesis de modafinil

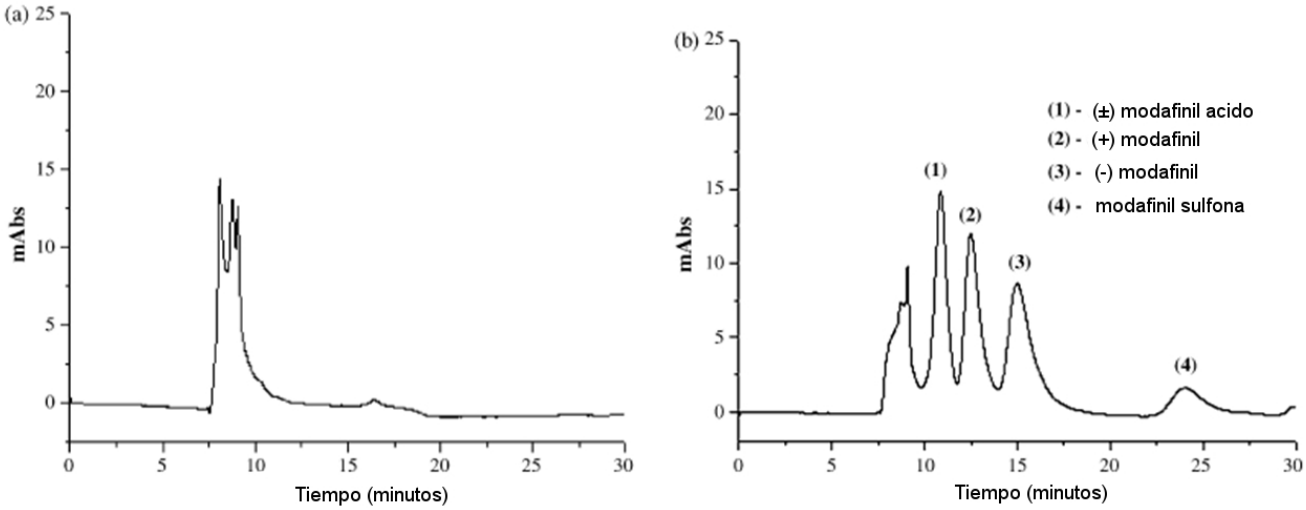


Influencia del uso del bufer de fosfatos (0.01M) a diferente pH con ACN como modificador orgánico (75:25,v/v) a 0.5 mL/min en los factores de retención de (±)MA en la resolución de los enantiómeros de modafinil en la columna quiral.



Cromatogramas típicos de los perfiles de exclusión de proteínas plasmáticas.

Figura 43 Efecto pH y perfiles de exclusión de proteínas plasmáticas.



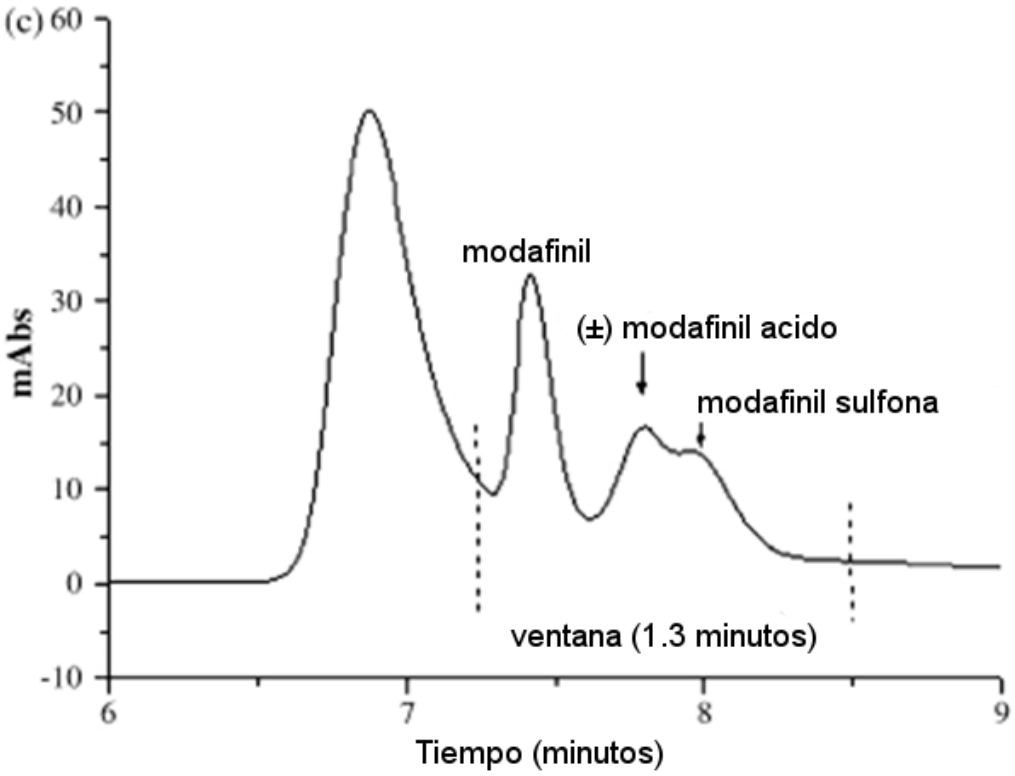


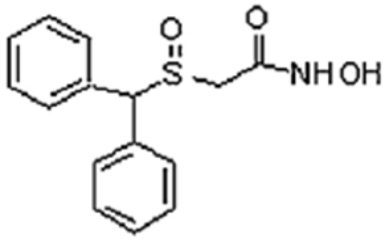
Figura 44 Cromatogramas de: (a) Plasma control. (b) Plasma cargado con los analitos a 0.25µg/mL en las condiciones establecidas. (c) Muestra la ventana de tiempo usado para la transferencia de los analitos a 0.25µg/mL, de la columna de medio de acceso restringido a la columna quiral.

Tabla 14 Determinación y farmacocinética de adrafinil en ratas por CL acoplada a espectrometría de masas con ionización electrospray.

Nageswara R, Shinde DD, Kumar M, Agawane S. 2008

MATRIZ	ESTUDIO APLICADO A/EN:	TIPO DE DETERMINACIÓN	PROPÓSITO DEL ESTUDIO	TIPO DE ELUCIÓN		FASE MÓVIL	
						COMPONENTES	PROPORCIÓN
Suero	Ratas	Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas con una Ionización Electrospray	Determinación y farmacocinética.	Fase Reversa	Isocrática	ACN:H_2O:CH_3COOH	35:65:0.1
DETECTOR	COLUMNA				TEMPERATURA		TIEMPO DE ANALISIS
	D.I.	MARCA	LONGITUD	TAMAÑO DE PARTÍCULA	Columna	Automuestreador	
Espectro de masas en modo ión positivo	4.6 mm	Kromasil C18 Finnigan Surveyor LC Pump	250 mm	5.0 µm	30 °C	20 °C	20 min
VOLUMEN DE INYECCIÓN	t_R	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	VELOCIDAD DE FLUJO	EQUIPO	RENDIMIENTO DEL SISTEMA	OBSERVACIONES	VALIDACIÓN
20µL	M=7.25 min MA=9.90 min	16.5 ng/mL	1.0 mL/min	Finnigan Surveyor Bomba, automuestreador, espectrómetro de masas	NA	NA	Exactitud, Precisión, LOQ

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	Extracción en fase sólida (SPE). Se extrajo 1mL de sangre. El suero se separa por centrifugación a 4500 x 5 min. Se almacenó a -20°C. El porcentaje de recobro a 3 diferentes concentraciones (baja, media y alta) fue de 90.2% para modafinil. Los cartuchos se lavaron con 1 mL de MeOH seguidos de 1mL de agua. 300 µL de suero se cargaron con las soluciones de trabajo de adrafinil, M y MA a concentraciones adecuadas. La muestra se aplicó al cartucho y se lavó con 1mL de agua. Se eluyó la muestra con 1mL de ACN. Se inyectaron 20 µL al sistema cromatográfico.
SOLUCIÓN STOCK	La solución stock de modafinil se disolvió en metanol que contenía 0.05% de ácido fórmico (generar el espectro de masas protonado de los analitos) para obtener una concentración final de 0.50 mg/mL de modafinil.
CURVA DE CALIBRACIÓN	Se uso suero control para la curva de calibración y la validación. La curva de calibración se llevó a cabo por adición std a un blanco de suero. Curva estándar lineal de 16.5 hasta 5000 ng/mL. Se construyó variando la concentración inicial del control desde 16.5 Adrafinil, 21 M y 25.4 de MA hasta 5000 ng/mL. Las concentraciones de las muestras de la concentración inicial individuales fueron 30, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 y 5000 ng/mL.
Determinación de modafinil, adrafinil y su metabolito ácido en una sola corrida cromatográfica. Adrafinil en el suero de rata fue estable durante tres ciclos de congelamiento-descongelamiento (a temp. amb) en 6h. Es generalmente metabolizado en una forma activa llamada modafinil. Ambos, adrafinil y modafinil sirven como agonistas adrenérgicos alfa 1. Incrementan la actividad locomotora en ratones ratas, perros y monos. Administración oral de adrafinil 20 mg/ Kg. Farmacocinética: modelo no compartamental. El MS fue operado en modo ion positivo. Voltaje de spray: 5kV, con capilar de transferencia de temperatura de 300 °C. Se uso Argón como gas de colisión a una presión de 1.5 mTorr. Las energías de colisión fueron de 20-40 eV.	



Estructura química de adrafinil

Figura 45 Estructura química de adrafinil.

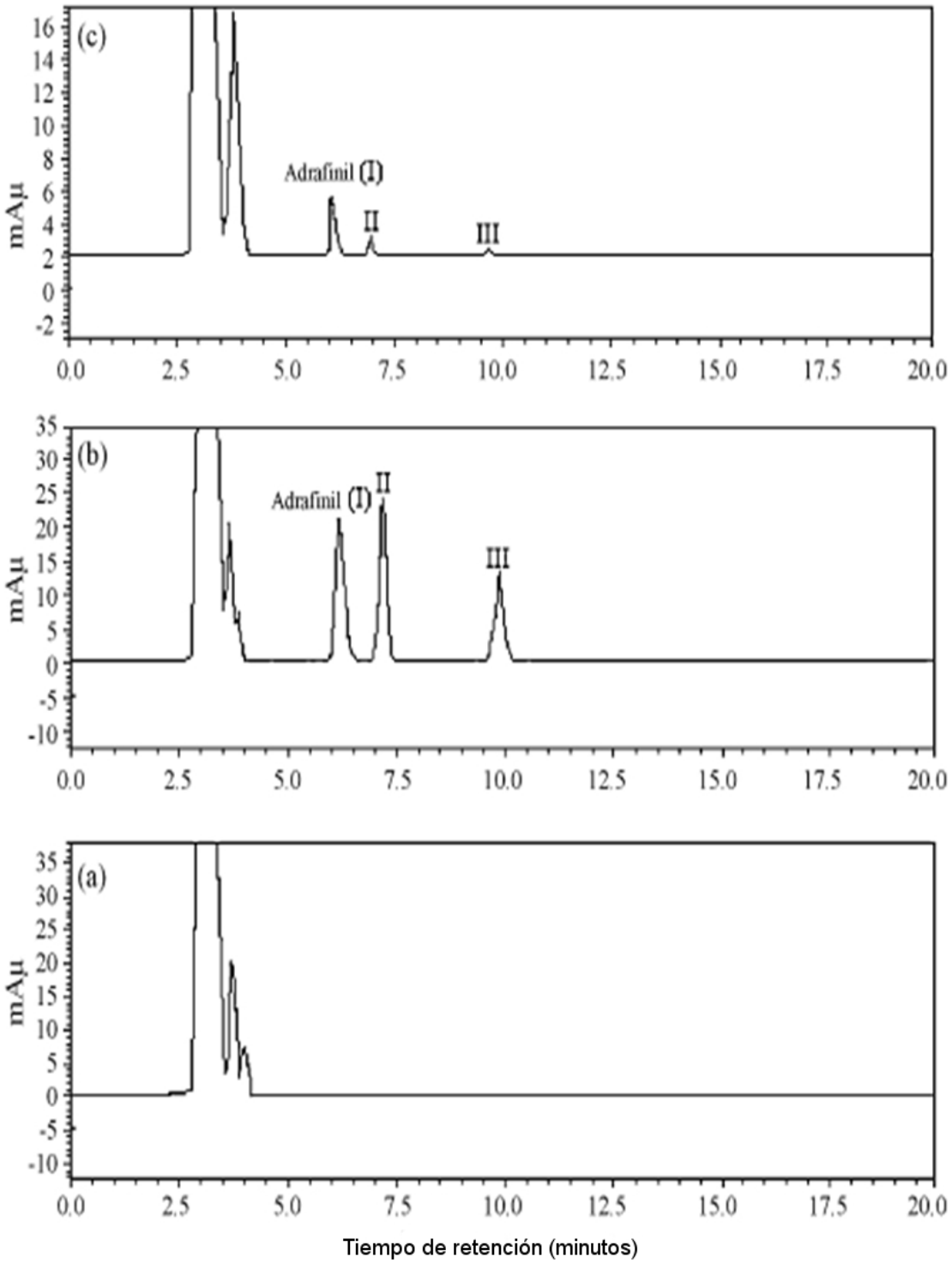


Figura 46 Cromatogramas de: (a) Suero control de rata. (b) Suero de rata cargado con 5000ng/mL de adrafinil (I), M (II) y MA (III). (c) Muestra de suero de rata después de 4 horas de una dosis oral de adrafinil de 20mg/Kg.

Se evaluaron distintos métodos y técnicas de varios autores, empleadas en la determinación de modafinil. La mayoría de estos métodos son llevados a cabo empleando CLAR en sus distintas modalidades: CLAR clásica (Tabla 6, 7, 9, 11); CLAR quiral (Tabla 8, 10, 13) y CLAR acoplada a espectrometría de masas (Tabla 14).

Así mismo, los métodos que existen para la caracterización de este compuesto son: análisis cristalográfico de rayos X, las actividades ópticas se determinan con polarímetro, IR, HNMR, CNMR y punto de fusión.

Todos los ensayos analizados en este trabajo, a excepción de la Tabla 12, que es un estudio aplicado a graneles de producto terminado en la síntesis de modafinil, se llevaron a cabo en matrices biológicas como suero, plasma y orina. La preparación de la muestra, para la limpieza y purificación, se lleva a cabo mediante extracciones en fase sólida (Tabla 7, 10, 14), extracciones líquido-líquido (Tabla 6, 8, 9) y hay un caso donde no se requiere tratamiento previo de la muestra, ya que la extracción se lleva a cabo dentro del mismo sistema cromatográfico utilizando una columna BSA (Tabla 13).

Debido al punto anterior, en el paso donde se prepara la muestra, es muy importante saber que lo que estoy recuperando sea de manera repetible. Esto se puede saber determinando el porcentaje de recobro. La manera de cuantificar la pérdida de muestra, es mediante la adición de un estándar interno para controlar la pérdida (repetibilidad).

Todos los ensayos descritos llevan a cabo una calibración por adición de un patrón interno y una corrida de la matriz control (no contiene modiodal), ya que debido a la naturaleza de las muestras (biológica), se tiene que comprobar que no existen interferencias debidas a los constituyentes de la matriz.

Con el pasar de los años, los métodos se van optimizando, prueba de esto es el tiempo de análisis requerido, en los primeros estudios los tiempos van desde los 45 minutos, hasta los más actuales de 20 minutos, incluso 30 minutos sin necesidad de tiempo adicional para la preparación de la muestra (Tabla 13).

Los rangos de longitud de onda utilizados en la detección UV-VIS, abarcan rangos que van desde los 225 hasta los 240 nm.

En lo que se refiere a las fases móviles utilizadas, el método de la Tabla 11 difiere en los disolventes utilizados en los demás métodos (Tablas 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13 y 14) para la extracción, todos estos utilizan una composición de la fase móvil a base de ACN, buffer de fosfatos, MeOH, CH_3COOH, CH_3COONH_3. La ventaja de este método es que elimina el riesgo de intoxicación asociados al uso de ACN y diclorometano (son sustancias que se pueden absorber por inhalación del vapor a través de la piel y por ingestión) y los efectos de la acidez de los buffers de fosfatos en la columna cromatográfica y las bombas.

Todos los métodos que utilizan amortiguadores se encuentran dentro del rango máximo: 10^{-2}M, ya que si es mayor puede haber precipitación de sales.

Todos los análisis utilizan fases estacionarias con tamaños de partícula entre 3-10µm, lo que proporciona una alta eficiencia, sensibilidad, tiempos de análisis cortos y un consumo de disolventes reducido. Ninguno de los métodos reportados menciona la forma de las partículas de la columna. Hay que tener en cuenta que al reducir el tamaño de partícula, se puede aumentar la eficiencia.

Las ciclodextrinas y sus derivados son los selectores quirales más comúnmente utilizados en separaciones quirales (Tabla 8). Los requerimientos para una separación quiral en fase reversa utilizando una columna de ciclodextrinas son: la presencia de al menos un sustituyente de tamaño apropiado para formar un complejo de inclusión con la cavidad de la ciclodextrina y un sustituyente sobre o cerca del centro quiral con la potencia de interactuar con los grupos hidroxilo en la cavidad de la boca de la ciclodextrina. Los dos anillos aromáticos de modafinil hacen posible que ocurra el complejo de inclusión. El oxígeno del sulfinil y probablemente la amida de modafinil tengan la función de interactuar con los grupos hidroxilo de las ciclodextrinas.

Los volúmenes de inyección usados están dentro de lo permisible1-50µL, ya que si fueran muy altas se incrementaría la altura y los picos pudieran perder eficiencia. La Tabla 8 utiliza un volumen de inyección 100µL, se justifica con el procesamiento de la muestra dentro del sistema cromatográfico.

En lo que refiere a la cantidad de muestra inyectada, las concentraciones utilizadas van de 10-100µg, ya que si se inyecta más cantidad de muestra la columna puede ya no retener. Las velocidades de flujo van 0.3-1.4 mL/min. A mayor velocidad de flujo, también se puede ver comprometida la eficiencia (disminuye).

La sensibilidad se puede incrementar, además de re suspender el extracto en una cantidad menor de fase móvil (100µL), inyectando un volumen mayor o usando una columna con DI más pequeño. La Kd significa que la afinidad del soluto a la fase estacionaria es alta, en este caso de enantiómeros todo depende de la energía de superficie (Energía de Gibbs) para medir su espontaneidad.

En lo que se refiere al efecto de la temperatura y pH, la Tabla 9 muestra que hay una mejor resolución a pH 2.5, la Tabla 12 muestra que no hay efecto en el tiempo de resolución debido a un incremento de temperatura, pero al incrementarla, hay una disminución en el coleo de los picos (As). La Tabla 13 muestra que no hay gran variación al incrementar pH en el factor de retención (k') y en la resolución (Rs) para (±)-MA, (+)-M, (-)-M y M, pero sí para MS.

Todos los estudios que siguen el perfil farmacocinético, alcanzan la concentración máxima de modafinil a las 5 horas.

Los tiempos de retención para modafinil se encuentran entre los 7 y 11 minutos; (R)-modafinil: 19min (S)-modafinil: 22min (Tabla 8); (R)-modafnil: 11min y (S)-modafinil: 16min (Tabla 10); (R)-modafinil: 11min y (S)-modafinil: 14min (Tabla 13); MA 10-14 minutos.

En muestras biológicas el valor máximo de CV de la respuesta analítica es del 15%. En todos los métodos el valor máximo no sobrepasa este valor.

La validación de los métodos manejan los parámetros de linealidad, exactitud, precisión, LOQ, LOD, estabilidad y porcentaje de recobro. Sólo hay un método que determina robustez (Tabla 12). Este parámetro es importante llevarlo a cabo cuando hay un cambio en el sistema, por ejemplo, un cambio de columna (detector celda, termostato). Cuando hay un cambio en el método, por ejemplo, un cambio de disolvente, conviene determinar el parámetro de tolerancia. Si las diferencias no son mayores al 2% hay robustez y tolerancia.

A continuación se muestra una tabla con la importancia de la validación de los métodos analíticos:

Tabla 16. Parámetros a evaluar durante la validación de un método analítico[9]

TIPO ESTADÍSTICO	TIPO OPERATIVO/ECONÓMICO
Exactitud, Rastreabilidad	Inversión
Precisión, Incertidumbre	Mantenimiento
Reproducibilidad	Rapidez
Especificidad	Facilidad de uso
Selectividad	Simplicidad
Límite de detección	
Límite de cuantificación	
Robustez	

VIII. CONCLUSIONES

El comportamiento en el orden de elución de los compuestos es el siguiente: estándar interno>MS>MA>M, y (S)-modafinil>(R)-modafinil.

Es posible llevar a cabo la separación de enantiómeros en columnas C18.

La cromatografía en fase reversa en fases estacionarias a base de ciclodextrinas puede llevarse a cabo, ya que muestran robustez y una excelente reproducibilidad. La resolución de los enantiómeros de modafinil y sus metabolitos se puede lograr usando un amplio rango de buffers (fosfatos y CH_3COOH) y ACN o MeOH como modificadores orgánicos. Para mantener un valor de seguridad de pH de 2-7 lo ideal es usar buffer de fosfatos.

Lo más sencillo es llevar a cabo un método isocrático, pero en este caso que puede haber varias interferencias probablemente debidas a la matriz, lo ideal es hacerlo por gradiente.

Un ensayo en gradiente nos proporciona una alta resolución, pero mayor consumo de tiempo de análisis y disolventes.

El mejor método desarrollado es el que utiliza un sistema CLAR bidimensional, ya no requiere tiempo para la preparación de la muestra. La única restricción es que debido a la complejidad del equipo, éste incrementa su costo.

IX. PROPUESTAS

Método sugerido:

Llevar a cabo el protocolo para la obtención de muestras de plasma de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998.

Preparación de la muestra: Extraer en fase sólida 1 mL de plasma: pasar primeramente en el cartucho C18 con MeOH, seguido de HCl 0.05 M, la muestra de plasma y 100 µL de estándar

interno; evaporar a sequedad y reconstituir con fase móvil. Inyectar al sistema cromatográfico.

Condiciones del sistema cromatográfico:

Columna:	Columna quiral a base de ciclodextrinas
Características columna:	10-25 cm de longitud con tamaño de partícula de 3-10 µm
Fase Móvil:	Buffer de fosfatos : MeOH
Proporción:	60:40
Velocidad de Flujo:	1 mL/min
pH:	2.5-4
Tipo de elución:	Isocrática
Cromatografía:	Fase reversa
Temperatura:	30 °C
Volumen de inyección:	20 µL
Detector:	UV-VIS
Longitud de onda:	225-240 nm
Concentración:	50 µg
Estándar interno:	(Feniltio) ácido acético

Los parámetros mencionados arriba son la propuesta inicial para iniciar el análisis práctico de modafinil, pero conforme el método se vaya desarrollo, tendrán que hacerse los ajustes necesarios.

Conviene hacer una evaluación de los parámetros cromatográficos (resolución, eficiencia, factor de capacidad, selectividad) de los cromatogramas obtenidos en los métodos de cuantificación estudiados para obtener los resultados teóricos.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Avendaño C. Introducción a la química Farmacéutica. 3ª ed.. México: Mc Graw Hill Interamericana; 1997. p. 843-847.
2. Hanai T. HPLC a practical guide. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1999.
3. Yost R, Ettre L, Colon R. Introducción a la cromatografía líquida práctica. Estados Unidos de América: Perkin-Elmer; 1980. p. 3, 17-30.
4. Reglamento de Validación de Métodos Analíticos Requeridos para el Registro Sanitario de Medicamentos ante el Ministerio de Salud. Decreto No 29968-S. Gaceta N° 231 del 30 de noviembre del 2001.
5. Waters High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Primer [en línea] 2007 [fecha de acceso 27 de Mayo de 2009]. URL disponible en: http://www.waters.com/watersdivision/ContentD.asp?watersit=JDRS-5LTGBH
6. Katz E, Eksteen R, Schoenmakers P, Miller N. Handbook of HPLC. USA: Chromatographic Science Series; v. 78; 1998. p. 39
7. Skoog D. Principios de Análisis Instrumental. 5ª ed. España: Mc Graw-Hill; 2001. p. 785-793.
8. Shah P, Midha K, Dighe S, McGilveray J, Skelly P, Yacobi, et al. Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies. J. Pharm. Sci. 1992; 81 (3):309-312.
9. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
10. Rouessac F, Rouessa A. Análisis Químico Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas. España: Mc Graw Hill; 2003.
11. Watson D. Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemistry. China: Churchill Livingstone; 1999
12. SSA. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Vol. 1, FEUM 9ªedición. México 2008, 874-875.
13. Farmacopea de los Estados Unidos de América, Formulario Nacional. USP 32 NF 27, 2009: 621-628, 1634-1636, 2995-2996

14. Comisión de Validación de Métodos analíticos. Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A. C. 8,20-21. 2002.
15. McNair H, Esquivel B. Cromatografía líquida de alta presión. Serie de química, monografía No. 10. USA: 1980. p.1-46.
16. Johnson L, Stevenson R. Basic Liquid Chromatography. Varian Associates. USA: 1978.p. 4-13.
17. McNair H, Polite L. Curso de HPLC, Ciudad Universitaria, UNAM ABC; D.F. Noviembre 2001, México; p I.1-Xb.5
18. Gennaro AR. Remington Farmacia. 20ª ed.. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2003. p. 687-717.
19. Villafuerte Robles L. Estabilidad de Medicamentos. México: Instituto Politécnico Nacional; 2002. p. 353-366.
20. Salem H., Saleh .A.; J. Pharm. Biomed. Anal. 28 (2002) 1205-1213.
21. Settle F. Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. USA: Prentice Hall; 1997. p. 147-164.
22. Takeba K., Fujinama K.; J. Chromatogr. Anal. 812 (1998) 205-211
23. Meyer R. V. Practical High Performance Liquid Chromatography. Germany: John Wiley and Sons Ltd.; 1998. p 109-166.
24. Snyder R., Kirkland J. USA: Wiley and Sons, Inc.; 1979.
25. Florey K. Testosterone Enanthate. En Klaus Florey. Analytical Profiles of Drug Substances Vol.4. London: Academic Press; 1975. p. 452- 465.
26. Martínez R. Curso en uso y cuidado de columnas cromatográficas. En Centro A.F. de Estudios Tecnológicos. México. 2007.
27. Rubinson K, Rubinson J. Química analítica contemporánea. 1ª ed.. México: Prentice Hall; 2000. p. 406-429.
28. Harris D. Análisis químico cuantitativo. México: Grupo Editorial Iberoamericana; 1992. p. 621-625,650-659.
29. Quattrocchi OA, Abelaira de Andrizzi SI, Laba RF. Introducción a la HPLC, Aplicación y práctica. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro SA; 1992. p. 329-334.
30. Pool F, Colin A. Chromatography today. USA: Elsevier; 1991.358
31. García de Marina A, Del Castillo B.; Cromatografía líquida de alta resolución México: Limusa; 1988.

32. Lough W. High Performance Liquid Chromatography. Fundamental principles and practice. Blackie; 1996. p. 50-59.

33. Willard H. Métodos Instrumentales de Análisis. México: Grupo Editorial Iberoamericana; 1991. p. 505-517,603-608.

34. Varcalcel M. Técnicas analíticas de separación. Barcelona: Reverte S.A.; 1988. p. 335-385,437-459.

35. Rossevac F. Métodos y técnicas instrumentales modernas. Análisis químico. España: Mc Graw Hill; 2003. p. 7-27.

36. Gary B. Métodos instrumentales de análisis en química clínica. España: Acribia S.A.; 1987. p. 187-207.

37. Walton H. Modern chemical analysis and instrumentation. USA: Marcel Dekker; 1973. p. 253-254.

38. Weston A. HPLC and CE. Principles and practice. USA: Academic Press; 1997. p. 283-286.

39. Braithwaite A, Smith FJ, Smith JF. Chromatographic methods. USA: Kluwer. Academic Publishers; 1999. p. 13-23.

40. Ahuja S, Jespersen N. Modern Instrumental Analysis. 2005. p. 568-569.

41. British Pharmacopoeia Volume I & II. 6a edición. [acceso 27 de Mayo del 2009] Disponible en: http://online6.edqm.eu/ep604/#doc_1_of_44

42. Blackwell AD, Paterson NS, Barker RA, Robbins TW, Sahakian BJ. The effects of modafinil on mood and cognition in Huntington's disease. J. Psychopharmacology ; 2008; 199: 29-36

43. Willie JT, Renthal W, Chemelli RM, Miller MS, Scammell TE, Yanagisawa M, Sinton CM. Modafinil more effectively induces wakefulness in orexin-null mice than in wild-type littermates. J. Neurosc. 2005; 130: 983-995

44. Boss C, Brisbare-Roch C, Jenck, F. Biomedical Application of Orexin/Hypocretin Receptor Ligands in Neuroscience. J. Med. Chem. 2009; 52 (4): 891-903.

45. Lange R, Volkmer M, Heesen C, Liepert J. Modafinil effects in multiple sclerosis patients with fatigue. J Neurol 2009; 25 (6): 645-650.

46. Sanneke V. Neuroprotection in Parkinson's disease: modafinil and Δ9-tetrahydrocannabinol. 2007

47. Cass QB, Galatti TF. A method for determination of the plasma levels of modafinil enantiomers, (±)-modafinic acid and modafinil sulphone by direct human plasma injection and bidimensional achiral–chiral chromatography. J. Pharm. Biom. Anal: 2008; 46: 937-944.

48. Morrison RT, Boyd RN. Química orgánica. 5a edición 1998 Pearson Addison Wesley pp 123-135

49. McMurry J. Química organica. 6a ed.. Thomson; 2006. p. 275-291

50. Scott Raymond P.W. Chromatographic Detectors. Design, Function and Operation. USA: Chromatographic science series; v. 73; 1996. p. 297-305.

51. Brian A. Bidlingmeyer, Jhon Wiley & Sons, Inc., New Cork. Practical HPLC Methodology and Applications. [en línea] 2006 [fecha de acceso 23 de Junio de 2009] (p. 9). URL disponible en: http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/tendencias.jpg

52. Nageswara R, Shinde DD, Kumar M, Agawane S. LC-ESI-MS determination and pharmacokinetics of adrafinil in rats. Journal of Chromatography B 2008; 873: 119-123.

53. Stanley S, Ching H. Screening for basic drugs in equine urine using direct-injection differential-gradient LC-LC coupled to hybrid tandem MS/MS. Journal of Chromatography B 2006; 1-14.

54. Gorman SH. Determination of modafinil, modafinil acid and modafinil sulfone in human plasma utilizing liquid-liquid extraction and high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B 2002; 767:269-276.

55. Moachon G, Matinier D. Simultaneous determination of modafinil and its acid metabolite by high-performance liquid chromatography in human plasma. J. Chromatogr. B 1994; 64: 91-96.

56. Burnat P, Robles F, Do B. High-performance liquid chromatographic determination of modafinil and its two metabolities in human plasma using solid phase extraction. J. Chromatogr. B 1998; 706:295-304.

57. Cass QB, Khon CK, Calafatti SA, Aboul-Enein HY. An enantioselective assay for (±)-modafinil. J. Pharm. Biomed. Anal. 2001; 26:123-130.

58. Cass QB, Ferreira T. A method for determination of the plasma levels of modafinil enantiomers, ±-modafinic acid and modafinil sulphone by direct human plasma injection and bidimensional achiral-chiral chromatography. J. Pharm. Biomed. Anal. 2008; 46: 937-944.

59. Nageswara R, Shinde DD, Kumar M. Development and validation of a reversed phase liquid chromatographic method for separation and determination of related-substances of modafinil in bulk drugs. Talanta 2007; 73: 407-414.

60. Schwertner HA, Kong SB. Determination of modafinil in plasma and urine by reversed phase high-performance liquid-chromatography. J. Pharm. Biomed. Anal. 2005; 37: 475-479.

61. Gorman SH. Determination of the D- and L-enantiomers of modafinil in human plasma utilizing liquid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography. J. Chromatog. B 1999; 730: 1-7.

62. Tseng YL, Uralets V, Lin CH, Kuo FH. Detection of modafinil in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. J. Pharm. Biomed. Anal. 2005; 39: 1042-1045.

63. Ternois J. *et. al.* Asymmetric synthesis of modafinil and its derivatives by enantioselective oxidation of thioethers: comparision of various methods including synthesis in ionic liquids. Tetrahedron: *Asymmetry*. 2007; 18: 2959-2964.

64. Olivo HF, *et. al.* Microbial oxidation/amidation of benzhydrysulfanyl acetic acid. Synthesis of (±)-modafinil. Tetrahedron: *Asymmetry.* 2005; 16: 3507-3511.

65. Prinziano T, *et. al.* Synthesis and determination of the absolute configuration of the enantiomers of modafinil. Tetrahedron: *Asymmetry.* 2004; 15: 1053-1058.

66. Renou L, et. al. Chiral discrimination at the solid state of Methyl 2-(Diphenylmethylsulfinyl)acetate. Cristal growth & design. 2007; 7(9): 1599-1607

67. In Y, et. al. Crystal and molecular structure of an (S)-(+)-enantiomer of modafinil, a novel wake-promoting agent. Chem. Pharm. Bull. 2004; 52(10): 1186-1189.

68. Berkecz R, et. al. HPLC enantioseparation of 1-(α-Aminobenzyl)-2-naphtol and 2-(α-Aminobenzyl)-1-naphtol analogs on a β–Ciclodextrin-based chiral satationary phase. Chromatographia. 2007; 65: 337-341.

69. Bojarski J, et. al. What's new in chromatographic enantioseparations. Curr. Anal. Chem. 2005; 1: 59-77.

70. Ward TJ. Chiral separations. Anal. Chem. 2000; 72: 4521-4528.

71. ICH. International Conference on Harmonization of Validation of Analytical Procedures. 2005.

72. CFR 21. Code of Federal Regulations Title 21 Part 320. Bioavailability and Bioequivalence Requirements. 2009.