



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

*Desarrollo de una metodología para la identificación y cuantificación de un neuroestimulante en orina y tabletas utilizando extracción en barra magnética (SBSE: Stir Bar Sorptive Extraction) seguido de CG-EM*

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

**BEATRIZ PORTILLA JUÁREZ**

**MÉXICO, D.F.**

**2013**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **JURADO ASIGNADO:**

Presidente: **Ernestina Cervera Flores**  
Vocal: **María Teresa Buentello Rodríguez**  
Secretario: **Araceli Patricia Peña Álvarez**  
1er Suplente: **Silvia Citlalli Gama González**  
2do Suplente: **Kenneth Rubio Carrasco**

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio 101, Departamento de Química Analítica, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, UNAM.

## **ASESOR DEL TEMA**

---

Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

## **SUSTENTANTE**

---

Beatriz Portilla Juárez

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de brindarme mi formación académica. A la Facultad de Química por permitirme crecer como persona y profesionalmente.

A mi familia, por brindarme todo su apoyo y amor incondicional y sobre todo por su comprensión. A mi mamá Elizabeth, mamá Jovita, Toto, Liz, Vicky, Yoel, mis padrinos Sra. Doris y Sr. Eduardo, mis tíos Cleo y Sam.

A la Dra. Araceli Peña Álvarez por la asesoría, apoyo, confianza, orientación y amistad brindada en la realización de este trabajo de tesis y por su tiempo invertido.

A la M. en C. Rocío del Carmen Juárez C. por su apoyo y amistad durante mi estancia.

A mis amigos del laboratorio 101, porque no solo fueron compañeros, sino amigos. Alex, Felipe, Fabián, Gaby, Vianey, Cristal, Hugo, Miguel y Luis. Por sus enseñanzas y recuerdos.

# Índice

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	5
Objetivo principal	5
Objetivos particulares	5
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	6
1.1. El abuso de los medicamentos	6
1.1.2. Agencia Mundial Anti-Dopaje (WADA)	7
1.1.3. Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte (CONADE)	7
1.2. Abuso de drogas y sustancias en el deporte	8
1.2.1. Estimulantes del Sistema Nervioso Central	8
1.2.2. Fisiología del estado de vigilia	8
1.3. Modafinilo	10
1.3.1. Generalidades	10
1.3.2. Propiedades farmacodinámicas	11
1.3.3. Propiedades farmacocinéticas	12
1.4. Muestras utilizadas para exámenes de anti-dopaje	13
1.4.1. Sangre	13
1.4.2. Orina	14
1.4.3. Saliva / Fluido oral	14
1.4.4. Pelo y uñas	14
1.5. Técnicas de preparación de muestra miniaturizadas	15
1.6. Principio de SBSE	16
1.6.1. Extracción y Desorción	18
1.6.1.1. Proceso de extracción	18
1.6.1.2. Desorción térmica (DT)	19
1.6.1.3. Desorción líquida (DL)	20
1.6.2. Barras recubiertas para SBSE	20

1.6.3. Factores que afectan la extracción	21
1.6.4. Factores que afectan la desorción	21
1.6.5. Limitaciones de la técnica SBSE	22
1.6.6. Aplicaciones de SBSE	22
1.6.6.1. Ambiental	22
1.6.6.2. Alimentos	23
1.6.6.3. Biomédicas	23
1.7. Definición de cromatografía	23
1.8. Cromatografía de gases	24
1.8.1. Clasificación de CG	24
1.8.1.1. Cromatografía gas-sólido	24
1.8.1.2. Cromatografía gas-líquido	25
1.8.2. Instrumentación	25
1.8.3. Cromatografía acoplada a espectrometría de masas	26
1.9. Espectrometría de masas	26
1.9.1. Instrumentación	27
<b>CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	<b>29</b>
2.1. Material y equipo	29
2.1.1. Sistema cromatográfico	29
2.1.1.1. Condiciones cromatográficas	29
2.1.2. Materiales y equipo para la preparación de la muestra	31
a. Acondicionamiento de barras	31
b. Limpieza del material	32
2.1.3. Reactivos y Excipientes	33
2.1.4. Estándar secundario del modafinilo	33
2.1.4.1. Procedimiento para la obtención del estándar secundario de modafinilo	34
2.1.5. Muestras	34
a. Blanco de orina	34
b. Muestra de orina del voluntario	35
c. Tabletas comerciales	35
2.1.6. Preparación de disoluciones estándar de modafinilo	35
2.2. Experimentación	36
2.2.1. Esquema analítico	36

2.2.2. Caracterización e identificación del estándar de modafinilo	37
2.2.3. Optimización de parámetros de la extracción con barra magnética	37
2.2.3.1. Optimización de la metodología para el análisis de orina	37
a. Límite de detección experimental	38
b. pH del medio de extracción	38
c. Tiempo de extracción	38
d. Adición de sal	38
2.2.3.2. Optimización de la metodología para el análisis de tabletas	39
a. Derivatización	39
b. Límite de detección experimental	39
c. Medio de extracción	39
d. Tiempo de extracción	40
2.2.4. Validación	40
2.2.4.1. Validación del método para el análisis de orina	40
a. Límites de detección y de cuantificación	40
b. Precisión	40
c. Linealidad	41
d. Exactitud	41
2.2.4.2. Validación del método para el análisis de tabletas	42
a. Límites de detección y de cuantificación	42
b. Precisión	42
c. Linealidad	42
d. Exactitud	43
2.2.5. Análisis de muestras	44
2.2.5.1. Determinación de modafinilo en orina	44
a. Metodología optimizada para la extracción de modafinilo en orina	44
b. Identificación de metabolitos del modafinilo en orina	44
c. Cuantificación de modafinilo en orina	45
2.2.5.2. Determinación de modafinilo en tabletas	45
a. Metodología optimizada para la extracción de modafinilo en tabletas	45
b. Interferencia de los excipientes en tabletas	45
c. Cuantificación de modafinilo en tabletas	46

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
3.1. Estándar secundario de modafinilo	47
3.1.1. Extracción de estándar secundario de modafinilo	47
3.1.2. Punto de fusión	48
3.1.3. Espectroscopía infrarroja	48
3.1.4. Espectrometría de Masas por FAB	48
3.1.5. Identificación del estándar de modafinilo por SBSE-CG-EM	49
3.2 Resultados de la metodología para el análisis de orina	50
3.2.1. Características macroscópicas de la orina blanco	50
3.2.2. Características macroscópicas de la muestra de orina del voluntario	50
3.2.3. Optimización de la metodología para el análisis de orina	51
a. Límite de detección experimental	51
b. pH del medio de extracción	52
c. Tiempo de extracción	53
d. Adición de sal	54
3.2.4. Metodología seleccionada para la extracción en orina	54
3.2.5. Validación del método de SBSE	55
a. Linealidad	55
b. Precisión	55
c. Exactitud	56
3.2.6. Análisis cualitativo de modafinilo en orina del voluntario	58
a. Identificación de modafinilo en orina del voluntario	58
b. Identificación de metabolitos en orina del voluntario	60
3.2.7. Análisis cuantitativo de modafinilo en orina del voluntario	62
3.3. Resultados de la metodología para el análisis de tabletas	63
3.3.1. Optimización de la SBSE para el análisis de tabletas	63
a. Derivatización	63
b. Límite de detección experimental	65
c. Medio de extracción	66
d. Tiempo de extracción	67
3.3.2. Metodología seleccionada para la extracción en tabletas	67
3.3.3. Validación del método de SBSE	68
a. Linealidad	68



b. Precisión	68
c. Exactitud	69
3.3.4. Análisis cualitativo	70
a. Identificación de modafinilo en tabletas	70
b. Estudio de la posible interacción de excipientes de las tabletas	71
3.3.5. Análisis cuantitativo	74
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES	75
REFERENCIAS	76
ANEXO I	80
ANEXO II	83

# Abreviaturas

AcCN	Acetonitrilo
CG	Cromatografía de Gases
CGL	Cromatografía Gas-Líquido
CGS	Cromatografía Gas-Sólido
CL	Cromatografía de Líquidos
CONADE	Comisión Nacional del Cultura Física y Deporte
CV	Coefficiente de Variación
DL	Desorción Líquida
DLLME	Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (siglas en inglés)
DMCA	Dirección de Medicina y Ciencias Aplicadas
DT	Desorción Térmica
EG	Etilenglicol
EM	Espectrometría de Masas
FAB	Bombardeo con Átomos Acelerados (siglas en inglés)
FDA	Food and Drug Administration
GABA	ácido $\gamma$ -aminobutírico
LPME	Microextracción en Fase Líquida (siglas en inglés)
MAE	Extracción Asistida por Microondas (siglas en inglés)
MeOH	Metanol
MTBSTFA	N-(tert-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida
PDMS	Polidimetilsiloxano
PLE	Extracción con Fluidos Presurizados (siglas en inglés)
RAM	Material de Acceso Restringido (siglas en inglés)
SBSE	Extracción por Sorción en Barra Magnética (siglas en inglés)
SCAN	Barrido total de iones
SDME	Microextracción con Gota Pendiente (siglas en inglés)
SFE	Extracción con Fluidos Supercrítico (siglas en inglés)
SIM	Monitoreo Selectivo de Iones (siglas en inglés)
SNC	Sistema Nervioso Central

SPE	Extracción en Fase Sólida (siglas en inglés)
SPME	Microextracción en fase sólida (siglas en inglés)
TBDMS	Tert-butildimetil-silil
TDU	Unidad de Desorción Térmica
TMN	Tuberomamilar
VLPO	Núcleo Preóptico Ventrolateral
WADA	Agencia Mundial Anti-dopaje

## RESUMEN

Se desarrolló una metodología utilizando la extracción por sorción con barra magnética (SBSE) en modo de inmersión y con desorción líquida a temperatura ambiente, seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, para la determinación de modafinilo a nivel de trazas (mg/L o µg/L) en orina y en tabletas comerciales.

Se obtuvo un estándar mediante la extracción del principio activo de tabletas comerciales. La extracción se realizó con acetonitrilo, la disolución se filtró y se recrystalizó en metanol. El estándar se caracterizó mediante espectroscopia infrarroja, punto de fusión y espectrometría de masas. El producto se denominó como estándar secundario.

Para la extracción y preconcentración de modafinilo en extracción con barra magnética (SBSE) se utilizó una barra recubierta de polidimetilsiloxano y etilenglicol (PDMS-EG), la extracción se realizó durante 60 min con agitación a 500 rpm y a pH=5. La desorción se realizó con 500µL de acetonitrilo, durante 30 min, a 400 rpm y se inyectó 1µL al CG-EM. La determinación de modafinilo en tabletas, se realizó en agua desionizada a pH ≈ 5 y 6 durante 30 min a 500 rpm. La desorción se realizó bajo las mismas condiciones que en orina.

Ambos métodos presentaron linealidad y precisión aceptables en los intervalos de concentración evaluados. Para la metodología del análisis de orina, se obtuvo un coeficiente de correlación  $R > 0.99$  y un coeficiente de variación  $CV < 12\%$ . Para la metodología del análisis de tabletas se obtuvo un coeficiente de correlación  $R > 0.99$  y un coeficiente de variación  $CV < 8\%$ .

El recobro en orina se evaluó en forma relativa y los valores obtenidos fueron entre 89% y 125%. Se realizó una comparación con extracción en agua donde se obtuvieron valores entre 76% y 110%. Se estimó un recobro absoluto  $< 28\%$  en orina.

El recobro de tabletas se evaluó en forma relativa obteniendo valores entre 95% y 121%, y se estimó un recobro absoluto  $< 20\%$ .

Con la metodología optimizada se analizó una muestra de orina de un voluntario que ingirió modafinilo en condiciones controladas, cuyo análisis se realizó de forma directa y mediante hidrolisis con la  $\beta$ -glucuronidasa.

Los métodos desarrollados utilizando SBSE-CG-EM permiten la identificación y cuantificación de modafinilo en orina y tabletas respectivamente. La extracción mediante SBSE mostró características requeridas que cumplen con la de miniaturización de las técnicas de preparación de muestra y desarrollo de la química verde.

## INTRODUCCIÓN

Algunos fármacos son utilizados sin autorización médica para la restauración y mejoramiento en el nivel de vigilia. La población que acostumbra el uso de estos fármacos son estudiantes, generalmente de nivel universitario, deportistas o personas sometidas a un alto nivel de estrés; un ejemplo de estos fármacos es el modafinilo, que se encuentra clasificado como estimulante del sistema nervioso central (SNC)<sup>1</sup>.

El modafinilo es un neuroestimulante con propiedades neuroprotectoras, está indicado para los tratamientos de somnolencia diurna asociada con narcolepsia, Trastorno Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH) y Síndrome de Apneas Obstructivas durante el Sueño (SAOS)<sup>2</sup>. El modafinilo incrementa la concentración del glutamato e inhibe la actividad ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), provocando la disminución del sueño y aumenta el grado de lucidez sin rebote<sup>3</sup>.

El uso de fármacos para mejorar el rendimiento en el ámbito deportivo es controlado por la Agencia Mundial Antidopaje (World Anti-Doping Agency); la cual publica anualmente una lista de sustancias prohibidas, que pueden estar sujetas a prohibición o con un límite de uso.

Dentro de las diferentes clases de drogas y fármacos prohibidos están los neuroestimulantes<sup>1,4</sup>. La detección de esta familia de compuestos es un reto analítico debido a su presencia en matrices complejas como los fluidos biológicos. Por lo tanto, contar con metodologías sensibles, precisas, confiables, rápidas, robustas y de bajo consumo de reactivos y disolventes es una necesidad para la química analítica.

La química analítica cuenta con múltiples técnicas de preparación de muestras de acuerdo al estado de agregación de la muestra. Algunas técnicas para el manejo de muestras líquidas son: extracción con membrana (ME siglas en inglés), extracción líquido-líquido, purga y trampa, extracción con gota pendiente, extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME) y extracción con barra magnética (SBSE)<sup>5</sup>.

La SBSE es una técnica de preparación de muestra que consiste en una barra magnética recubierta de un polímero, donde un analito se distribuye mediante equilibrios de sorción con base en su coeficiente de reparto. Es una técnica novedosa que fue desarrollada por Pat Sandra y colaboradores en el año de 1999<sup>6</sup>. La SBSE es una evolución de la SPME y presenta ciertas ventajas debido a un mayor volumen de fase extractante (30-250  $\mu$ L), haciéndola una técnica de mayor sensibilidad<sup>6, 7</sup>.

El acoplamiento de SBSE a CG-EM es una alternativa para el análisis de sustancias a nivel de trazas, por lo que el objetivo de este trabajo fue el desarrollo de una metodología que pueda ser utilizada en el análisis de antidopaje y eventualmente para el análisis de modafinilo en tabletas disminuyendo el tiempo de análisis y los pasos de preparación de muestra.

## OBJETIVOS

### Objetivo principal

Desarrollar y validar un método analítico utilizando extracción con barra magnética (SBSE, por sus siglas en inglés) por inmersión y desorción líquida seguida de CG-EM para la determinación de modafinilo que sea sensible, confiable, sencillo y rápido a nivel de trazas (mg/L o µg/L).

### Objetivos particulares

- Optimizar las condiciones de extracción de modafinilo mediante SBSE.
- Establecer las condiciones cromatográficas y espectrométricas para la determinación de modafinilo.
- Aplicar la metodología desarrollada a muestras de orina y tabletas.



## Capítulo 1

### ANTECEDENTES

#### 1.1. El abuso de medicamentos

La Organización Mundial de la Salud calcula que más del 50% de los medicamentos se prescriben, dispensan o venden de forma inapropiada y que la mitad de los pacientes no los utilizan correctamente. El uso incorrecto puede adoptar la forma de un uso excesivo o indebido de medicamentos de venta con o sin receta médica.

El abuso de los medicamentos puede tener efectos nocivos en el paciente y constituye un desperdicio de recursos farmacéuticos. La OMS establece que el mal uso de los medicamentos en el sector público y privado corresponden al 40% y 30% respectivamente<sup>8</sup>.

El uso de drogas y fármacos en el deporte es una práctica muy antigua, que se remonta al siglo III a.C. Se cree que algunos competidores griegos consumían una mezcla de semillas de ajonjolí y hongos alucinógenos para aumentar su rendimiento. A principios del siglo XX, las sustancias más utilizadas para mejorar el rendimiento eran estrofnina, cafeína, heroína y cocaína. En las primeras olimpiadas de la era moderna (1904) el maratonista Thomas Hicks compitió bajo los efectos de una mezcla de brandy con estrofnina, lo cual tuvo consecuencias fatales en el deportista. Sin embargo, fue hasta 1968, en los Juegos Olímpicos celebrados en México, cuando se instauraron las pruebas antidopaje por primera vez<sup>9</sup>. Con el tiempo las pruebas antidopaje han aumentado en cantidad, calidad y complejidad debido al desarrollo de nuevas drogas y formas de administración para aprobar fraudulentamente los exámenes antidopaje.

El término antidopaje se refiere al conjunto de actividades y procedimientos para la determinación de sustancias que modifiquen el rendimiento y desempeño del sujeto. El término 'dopaje' se refiere al incremento del

rendimiento físico y/o de la resistencia del organismo mediante la administración de sustancias naturales o sintéticas.

### **1.1.2. Agencia Mundial Antidopaje (World Anti-Doping Agency)**

La Agencia Mundial Antidopaje (WADA) es una fundación independiente creada Comité Olímpico Internacional (COI). Fue inaugurada el 10 de noviembre de 1999 en Lausana (Suiza) para promover, coordinar y monitorear la lucha contra el dopaje en el deporte<sup>1</sup>. Las actividades de la agencia incluyen investigación científica, educación, desarrollo de programas antidopaje y el establecimiento del *Código Mundial Antidopaje* (documento que regula el dopaje en el deporte a nivel mundial).

Los propósitos del Programa Mundial Antidopaje en el que se enmarca son:

- Proteger el derecho fundamental de los deportistas a participar en actividades libres de dopaje, fomentar la salud y garantizar la equidad en el rendimiento deportivo.
- Coordinar y verificar la eficacia de los programas antidopaje a nivel internacional.

La WADA publica una la lista de sustancias y métodos prohibidos que condicionan el rendimiento del competidor. El documento se utiliza como un estándar internacional que indica los lineamientos de competitividad en el ámbito deportivo. La lista se actualiza anualmente y la edición más reciente se publica en el sitio Web de la WADA<sup>4</sup>.

### **1.1.3. Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte (CONADE)**

En México, la CONADE es el organismo encargado de fomentar y promover la cultura física, recreación y el deporte. Dentro de esta institución, se ubica la Dirección de Medicina y Ciencias Aplicadas (DMCA), este departamento se encarga del análisis de sustancias prohibidas en los deportistas afiliados al Sistema Nacional del Deporte durante los eventos de competencia.

El control analítico cumple lineamientos conforme a la Agencia Mundial Antidopaje, la norma ISO 9001:2000 y es sujeto de acreditación por parte de la norma ISO 17025<sup>11</sup>.

Esta institución está certificada por la Entidad Mexicana de Acreditación y en proceso de certificación por parte de la WADA.

## **1.2. Abuso de drogas y sustancias en el deporte**

El abuso de sustancias estimulantes en el deporte puede ser un indicador de consumo en la población juvenil. Los estimulantes más comunes son las anfetaminas y sus análogos, cocaína, efedrina, anorexizantes, modafinilo, carfedón y metilfenidato; entre los narcóticos, se encuentran heroína, metadona, cannabinoides, derivados de fentanilo y morfina. Tales sustancias están prohibidas porque favorecen el desempeño atlético al ser consumidas en los eventos de competición. Los análisis de estas sustancias son de rutina y su determinación es en conjunto con otras sustancias como los agentes anabolizantes, hormonas peptídicas,  $\beta$ -2agonistas, diuréticos y glucocorticosteroides. La lista de sustancias prohibidas en el deporte se revisa por lo menos anualmente para incluir nuevas sustancias<sup>4</sup>.

### **1.2.1. Estimulantes del Sistema Nervioso Central**

Los estimulantes del sistema nervioso central (SNC) son sustancias que aumentan la excitabilidad en diversas regiones cerebrales. Los principales efectos producidos por estas drogas son aumento en el estado de vigilia y estímulo de la función motora provocando mayor lucidez mental, disminución de la fatiga, mejora en la capacidad de concentración, incremento de energía y motivación<sup>13</sup>. El modafinilo esta clasificación como un estimulante del sistema nervioso central.

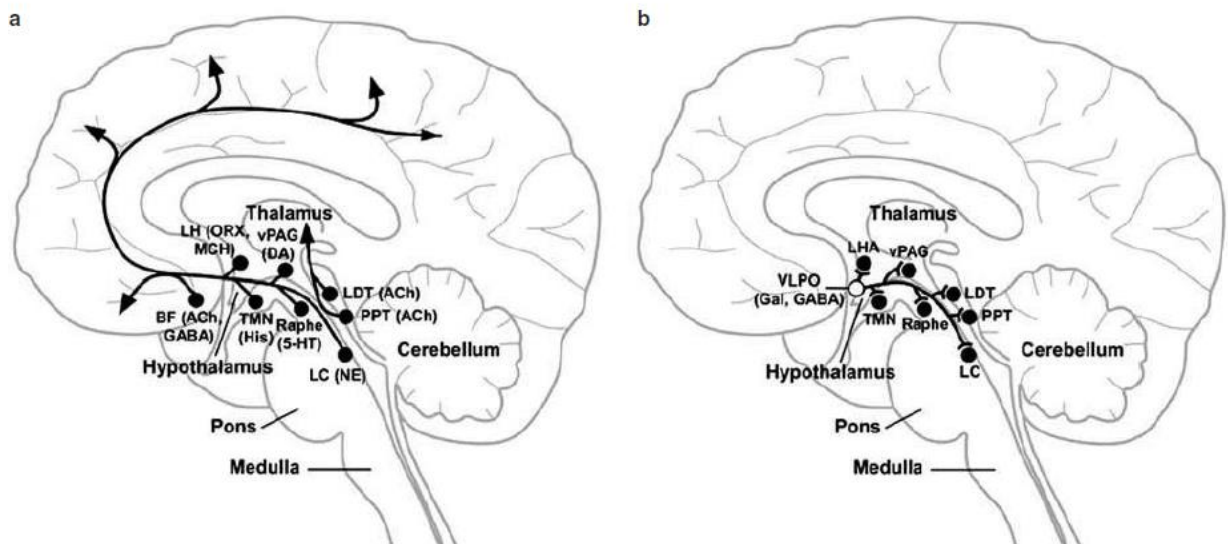
### **1.2.2. Fisiología del estado de vigilia**

La actividad del estado de vigilia depende del sistema activador o facilitador ascendente (perteneciente al sistema reticular), el cual está mediado por distintas vías neuronales que se encuentran en el tronco cerebral superior. El estado de vigilia es inducido por múltiples neurotransmisores como: acetilcolina, noradrenalina (norepinefrina), dopamina, histamina, serotonina y orexina<sup>3,14</sup>.

El sistema activador ascendente esta conformado por cúmulos de neuronas noradrenérgicas “NE” (locus Coeruleus “LC”), colinérgicas (núcleo pedunculopontino y tegmental lateral “PPT / LDT”). Así como neuronas serotoninérgicos “5-HT” (núcleo dorsal del Rafe), dopaminérgicas “DA” (sustancia gris periacueductal ventral vPAG) e histaminérgicas His (núcleo tuberomamilar “TMN”)<sup>15</sup>.

Estos sistemas producen excitación cortical por medio de las vías del tálamo dorsal/ventral dentro del hipotálamo, y el cerebro anterior basal (BF). Ésta última vía recibe contribuciones de orexina (ORX), la hormona concentradora de melanina (MCH), neuronas del área hipotálmica lateral (LHA), así como de GABAérgico o acetilcolinérgicos (ACh) y neuronas de la BF. (Ver figura 1.a)

En la figura 1.b se muestra las proyecciones del núcleo preóptico ventrolateral (VLPO; círculo abierto) para los principales componentes del sistema de activación ascendente. Las neuronas VLPO son principalmente activas durante el sueño y contienen los neurotransmisores inhibidores<sup>14, 15</sup>.



**Figura 1. Sistema de activación ascendente<sup>14</sup>.**

### **1.3. Modafinilo.**

A finales de 1970, la empresa farmacéutica francesa Lafon sintetizó un fármaco utilizando como reactivos sulfinilo y benzhidrilo al que se denominó adrafinilo. En 1986 se utilizó en Francia como parte de un tratamiento contra los efectos de narcolepsia. En los años 1990 se caracterizó el modafinilo, como componente principal del adranifilo.

En Estados Unidos de América se conoce como Provigil y ha estado disponible desde 1998; fue hasta el año 2001, que el modafinilo se comercializó por Cephalon Inc., quien ahora posee los derechos mundiales a la droga<sup>16</sup>.

En México, el modafinilo se comercializa bajo el nombre de Modiodal® en presentación de tabletas con 200mg de principio activo. El costo del medicamento es entre 400 y 500 pesos. La Ley General de Salud indica que el modafinilo se encuentra clasificado en el grupo IV, lo que implica que es un medicamento prescrito<sup>17</sup>.

#### **1.3.1. Generalidades**

El modafinilo es un neuroestimulante promotor de la vigilia, que brinda un efecto protector en las neuronas corticales de la degeneración inducida por el glutamato.

Es un medicamento controlado indicado para el tratamiento de:

- Somnolencia diurna excesiva asociada con narcolepsia.
- Hipersomnia idiopática.
- Trastorno de déficit de atención e hiperactividad (TDAH) (también conocido como disfunción cerebral mínima, daño cerebral mínimo, disfunción cerebral menor, síndrome hiperkinético en niños o síndrome psíquico-orgánico en niños).
- Síndrome de apneas obstructivas durante el sueño (SAOS).
- Otros trastornos relacionados con somnolencia diurna.

El modafinilo no está químicamente relacionado con los estimulantes del sistema nervioso central (SNC), como metilfenidato y anfetamina<sup>2</sup>.

El modafinilo también es utilizado para pacientes con cáncer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica y depresión producto de la fatiga ocasionada por la enfermedad. Se ha observado que el estado de ánimo y la

calidad de vida de estos pacientes mejoran con la administración de modafinilo<sup>18</sup>.

### **1.3.2. Propiedades farmacodinámicas**

El mecanismo de acción del modafinilo es aún incierto, aunque actualmente el estudio en animales parece estar relacionado con la disminución de GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) y con el incremento de los niveles de glutamato. Sin embargo, los sistemas de catecolaminas, dopamina y serotonina son esenciales para los efectos del modafinilo en GABA. Se estima que los sistemas histaminérgicos y adrenérgicos son importantes para los efectos del modafinilo sobre la locomoción. Aún no está elucidado el efecto del modafinilo sobre el neuropéptido orexina<sup>3,18</sup>.

#### *Vías dopaminérgicas:*

La administración en diferentes dosis incrementa los niveles de dopamina [3H dopamina] extracelulares en la corteza prefrontal (PFC). Por el contrario el modafinilo hiperpolariza las neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral (VTA) y la sustancia negra; esta inhibición es debida por la sulpirida (un antagonista del receptor D2) y por nomifensina (un inhibidor de la recaptación de dopamina)<sup>3, 14</sup>.

#### *Vías noradrenérgicas:*

Actualmente existen estudios que demuestran que el modafinilo no se une a receptores adrenérgicos e incrementa los niveles de noradrenalina en la PFC e hipotálamo medio en ratas. El aumento de noradrenalina inhibe la actividad de las neuronas VLPO<sup>3, 14</sup>.

#### *Vías glutamatérgicas y serotoninérgicas:*

La administración de modafinilo incrementa los niveles del neurotransmisor glutamato en el tálamo, hipocampo, área pre-óptica media (MPA) e hipotálamo posterior. El sistema de catecolaminas es importante durante el incremento del glutamato, ya que el pretratamiento con neurotoxinas dopaminérgicas y el antagonista del  $\alpha_1$ -adrenoreceptor, invierte los efectos del modafinilo en GABA.

Se ha comprobado que el modafinilo reduce los niveles del neurotransmisor inhibitorio GABA e incrementa los niveles de glutamato y serotonina en diversas áreas del cerebro de los organismos estudiados.

Al igual que las catecolaminas el sistema de serotonina es esencial para los efectos en GABA<sup>3, 14</sup>.

*Vías orexinérgicas:*

El modafinilo también interactúa con neuronas orexinérgicas, porque se ha observado que los pacientes con narcolepsia y deficientes en orexina, se ven beneficiados con el uso del fármaco. Las interacciones de modafinilo y neuronas orexinérgicas no están completamente descritas en la actualidad<sup>3,14</sup>.

*Vía histaminérgica:*

El modafinilo incrementa los niveles de TMN histaminérgico e histamina en el hipotálamo anterior en ratas. La administración intraperitoneal de modafinilo ha demostrado un aumento de la actividad locomotora en ratas. Debido a lo anterior, la histamina es importante para los efectos de locomoción inducidos modafinilo<sup>3,14</sup>.

### **1.3.3. Propiedades farmacocinéticas**

*Absorción.*

El modafinilo es absorbido después de la administración oral. La vida media de eliminación es entre 9 y 14 horas después de una dosis única de 200 ó 400 mg. La concentración máxima de modafinilo en plasma se presenta entre 1 y 4 horas. La biodisponibilidad de una tableta de 200 mg comparada con una microsuspensión acuosa es cerca del 100%. Tras la ingesta de dosis múltiples de 200, 400 y 600 mg diarios de modafinilo, se alcanza una concentración plasmática estable en un periodo de 2 a 4 días de dosificación. Las concentraciones plasmáticas alcanzadas con 200 mg de modafinilo diario tienen un intervalo de 6 y 2 µg/mL. Los valores respectivos después de una dosificación diaria de 400 mg son aproximadamente 11 y 3 µg/mL. La vida

media de eliminación es de 13 a 18 horas después de la última ingesta del régimen de dosis múltiples<sup>2,19</sup>.

*Distribución y unión a proteínas:*

El modafinilo se une moderadamente a proteínas del plasma (61-65%), esencialmente a la albúmina. La unión a proteínas en plasma no está afectada por el modafinilo ácido. El modafinilo se distribuye en mayor volumen con respecto al volumen total de agua en el cuerpo (0.6 L/kg) alcanzando valores entre 0.61 ó 0.8-0.9 L/kg<sup>2,19</sup>.

*Metabolismo y eliminación:*

El modafinilo es metabolizado después por medio de la hidroxilación del anillo aromático, desaminación y oxidación. Es excretado principalmente por orina en forma libre (menos del 10%) y en metabolito ácido (por lo menos 60% de la dosis). La depuración total de modafinilo, tras la administración de una dosis única es aproximadamente de 60 mL/min. La eliminación renal es aproximadamente de 3 mL/min, sugiriendo que el metabolismo hepático es la vía primaria para su eliminación<sup>2,19, 20</sup>.

#### **1.4. Muestras utilizadas para exámenes de antidopaje**

Para determinar la presencia de sustancias farmacéuticas y/o narcóticas, se realiza utilizando diferentes fluidos corporales. El tipo de muestra biológica debe elegirse de acuerdo a la información que se requiere con base en el consumo crónico o transiente. La saliva, sangre y orina se utilizan para detectar un consumo reciente; el pelo y uñas se utilizan para detectar un consumo en un periodo de tiempo mayor.

##### **1.4.1. Sangre**

La sangre es el fluido más utilizado porque se obtiene información rápida sobre el ingreso, distribución y efecto de una sustancia sobre los órganos blanco. La toma de sangre, es un proceso altamente invasivo<sup>12</sup>. El estudio tiene un alto grado de confiabilidad ya que soporta los resultados de otros análisis.



### **1.4.2. Orina**

El estudio de orina es complementario al análisis de sangre, ya que proporciona información sobre el metabolismo y/o transformación de la sustancia ingerida. El muestreo de orina puede ser abundante sin necesidad de usar técnicas invasivas. Por regla general, se estima que cualquier sustancia extraña y sus metabolitos se encuentra en mayor concentración en orina con respecto a la sangre y con el perfil de la sustancia o metabolitos se puede obtener información farmacodinámica.

Sin embargo, las pruebas de orina presentan desventajas porque son limitadamente comparables con los resultados de los análisis de sangre. Un resultado positivo en orina no es indicativo de un consumo reciente. El muestreo de orina requiere de instalaciones adecuadas para que la toma de muestra sea bajo condiciones controladas; se requiere inversión de tiempo y de personal capacitado<sup>12</sup>.

### **1.4.3. Saliva / Fluido oral**

La saliva es un fluido incoloro, transparente y de baja viscosidad producido por las glándulas salivales de la cavidad oral. Las muestras de saliva proporcionan información sobre la influencia de drogas en la persona a corto y largo plazo. La obtención de saliva facilita el muestreo biológico porque no existe invasión de la privacidad de la persona y no requiere instalaciones ni personal especializado<sup>12</sup>.

### **1.4.4. Pelo y uñas**

El cabello y las uñas no son muestras biológicas que indiquen sobre un consumo de drogas reciente y por tanto no son representativos para los controles antidopaje. Su alto contenido en queratina induce la incorporación de drogas a su estructura y proporciona un historial del consumo en el individuo. Existen marcadores para determinar el nivel del consumo con base en el tiempo<sup>12</sup>.

### **1.5. Técnicas de preparación de muestra miniaturizadas**

La determinación de compuestos orgánicos en diferentes matrices requieren de un paso previo al proceso de separación y detección, estos pretratamientos son conocidas como técnicas de preparación de muestra. La miniaturización y uso limitado de disolvente en las técnicas de preparación de muestra es una tendencia en la actualidad y una alternativa para el desarrollo de la química verde.

La aplicación de energía con microondas para la digestión de la muestra fue propuesta por primera vez en 1975. La extracción asistida por microondas (MAE) es una técnica que trabaja con radiaciones electromagnéticas que inducen velocidades de calentamiento acelerado en intervalos de tiempo corto. Esta técnica ahorra disolvente, es rápida y eficiente desde el punto de vista del energético. Otra alternativa es la extracción con fluidos supercríticos (SFE), basado en la extracción de analitos con un fluido en condiciones supercríticas. Desarrollado a mediados de la década de los años 1980 para superar las dificultades de la extracción en muestras sólidas. El uso de CO<sub>2</sub> supercrítico evitó el efecto secundario de los disolventes orgánicos.

La extracción con fluidos presurizados (PLE) es una evolución de la extracción Soxhlet, donde los disolventes se calientan por encima de su punto de ebullición. Las altas temperaturas generan una mayor solubilidad y aumentan la tasa de difusión del soluto hacia el disolvente. El sistema presurizado evita la ebullición del disolvente y permite la penetración en la muestra. PLE proporciona una alta eficiencia en la extracción del analito de interés utilizando bajos volúmenes de disolvente y la disminución del tiempo de extracción.

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica de preparación de muestra que consiste en un sorbente que actúa como una fase de atrapamiento y permite preconcentrar, aislar, separar y purificar el analito de interés. Con la finalidad de utilizar volúmenes reducidos de disolvente en comparación con la SPE, se desarrolló la microextracción en fase sólida (SPME) en 1989, la cual se basa en la sorción de analitos en una fibra recubierta por un polímero. Así mismo, la SPME evolucionó a la extracción por sorción con barra magnética (SBSE) desarrollada en 1999, a diferencia de la SPME la cantidad de fase extractante es 50 a 250 veces mayor lo que le confiere una mayor sensibilidad. El formato de la técnica permite mayor facilidad de uso y durabilidad.

La microextracción en fase líquida (LPME) es una técnica que se basa en la extracción líquido-líquido, y utiliza un volumen de disolvente extractante reducido. Las dos principales variantes que se han desarrollado son: microextracción con gota pendiente (SDME) y microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)<sup>21</sup>.

### 1.6. Extracción por sorción con barra magnética (SBSE)

La extracción por sorción con barra magnética, es una técnica que combina la extracción y preconcentración del analito de interés. Se basa en los equilibrios controlados por los coeficientes de reparto que tiene el soluto entre la fase polimérica y la fase acuosa de la muestra. Estudios anteriores correlacionan estos coeficientes de reparto con los coeficientes de distribución de octanol-agua. Aunque no sea totalmente correcta esta deducción, el coeficiente de distribución de octanol-agua indica de forma aproximada la distribución de un analito entre dos fases inmiscibles<sup>5</sup>. El equilibrio de sorción depende de la relación de volúmenes de las fases extractante y de extracción. Esta relación se demuestra mediante la ecuación.

$$K_{o/w} \approx K_{PDMS/w} = \frac{C_{PDMS}}{C_w} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \frac{V_w}{V_{PDMS}} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \beta$$

El coeficiente de reparto entre el polímero y la fase acuosa ( $K_{PDMS/w}$ ) está definido como la relación de la concentración del analito en la fase polimérica ( $C_{PDMS}$ ) entre la concentración del analito en la fase acuosa ( $C_w$ ) al equilibrio. Esta relación es igual a la masa del analito en la fase polimérica ( $m_{PDMS}$ ) entre la masa del analito en la fase acuosa ( $m_w$ ) por la relación de los volúmenes de ambas fases  $\beta$  ( $\beta=V_w/V_{PDMS}$ )<sup>5, 6</sup>.

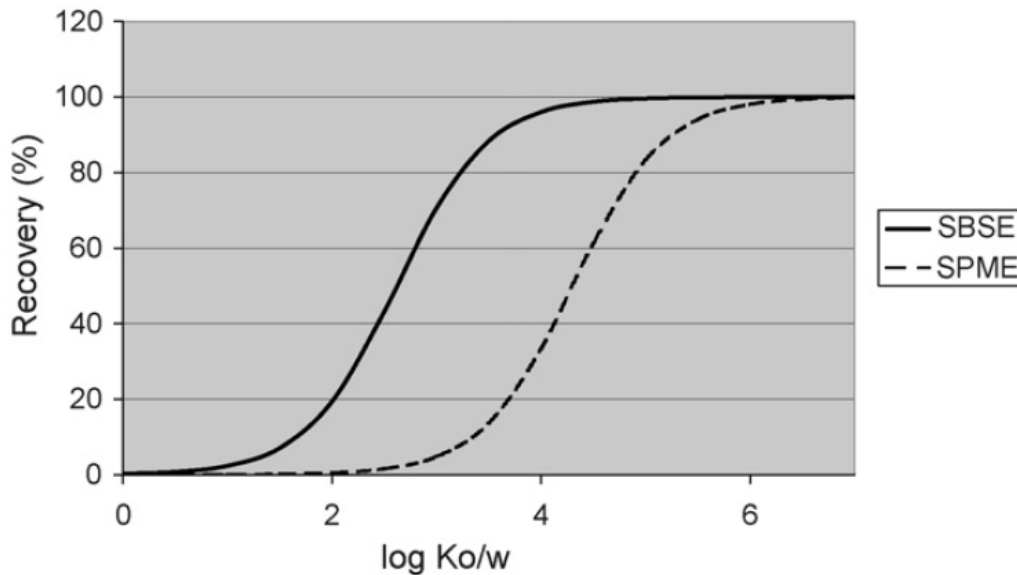
Debido a las propiedades fisicoquímicas de la interfase entre la disolución y la barra de extracción, el proceso de distribución ocurre hasta alcanzar el equilibrio<sup>7</sup>.

Por lo cual una extracción eficiente depende del coeficiente de reparto del analito entre ambas fases ( $K_{PDMS,w}$ ). El recobro teórico (R%) se puede obtener mediante la relación<sup>7</sup>:

$$m_{w,0} = m_{PDMS} + m_w$$

$$R = \frac{m_{PDMS}}{m_{w,0}} = \frac{K_{PDMS,w}}{K_{PDMS,w} + \beta}$$

La técnica de SBSE es una preparación de muestra novedosa basada en el principio de la SPME, con la diferencia de un volumen extractante mayor y un formato de dispositivo distinto. El volumen de fase extractante de la fibra es de 0.5µL y el volumen de la barra es de 25-100µL. La figura 2 muestra la comparación del recobro teórico de un soluto en función de  $\log K_{o/w}$  para SPME (100µm grosor de fase, 0.5µL de PDMS) y de SBSE (1cm x 0.5mm grosor de fase, 25µL PDMS) utilizando 10 mL de muestra<sup>7</sup>.



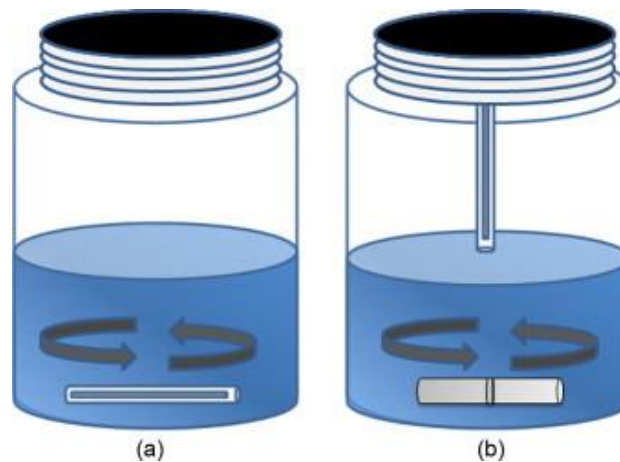
**Figura 2.** Recobro teórico entre las técnicas de SPME y SBSE<sup>7</sup>.

### 1.6.1. Extracción y desorción

La extracción con barra magnética consiste en dos pasos: extracción y desorción, los pasos se describen a continuación.

#### 1.6.1.1. Proceso de extracción

La extracción con barra magnética puede ser en modo de inmersión o headspace (en espacio de cabeza) (ver figura 3). El equilibrio de distribución se modifica al condicionar factores que afectan la extracción <sup>6,7</sup>.



**Figura 3.** Extracción de SBSE: modo de (a) inmersión y (b) headspace<sup>7</sup>.

En la extracción en modo de inmersión, la barra se agita en la muestra bajo condiciones físicas y químicas controladas. Después de la extracción, la barra se enjuaga con agua destilada con la finalidad de remover sales, azúcares, proteínas u otros componentes de la muestra.

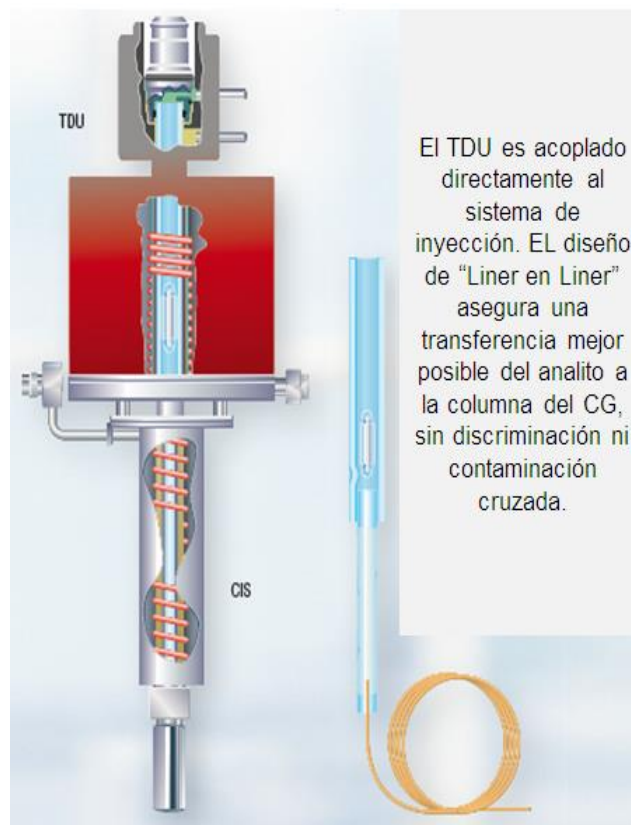
La extracción en headspace consiste exponer la barra al espacio de cabeza en el que se encuentra el vapor confinado de una muestra líquida. La muestra generalmente se agita con el fin de favorecer la distribución del soluto hacia la fase de vapor<sup>6,7</sup>.

Después de la extracción, el paso a seguir es la desorción térmica o líquida previo al análisis instrumental.

### 1.6.1.2. Desorción térmica (DT)

Algunas aplicaciones de SBSE requieren del uso de desorción térmica (DT) seguida de CG para el análisis de los componentes retenidos en la fase polimérica de la barra; este modo de trabajo evita el uso de disolventes orgánicos y permite la completa introducción de los solutos extraídos. Sin embargo, la DT requiere un dispositivo especializado denominado unidad de desorción térmica (TDU) acoplado al cromatógrafo. La TDU consiste en un dispositivo que eleva la temperatura y permite la desorción de los compuestos de la barra; este proceso se realiza a temperaturas entre 150-300°C con un tiempo de duración de 15 a 30 minutos.

Los compuestos desorbidos llegan a un inyector PTV, que utiliza un criofoco (temperaturas de -150 a 40°C) para garantizar la transferencia cuantitativa de los analitos provenientes de la TDU, previo a su separación cromatográfica<sup>6, 7</sup>. (Ver figura 4)



**Figura 4.** Unidad de desorción térmica (TDU)<sup>22</sup>.

### 1.6.1.3. Desorción líquida (DL)

La desorción líquida (DL) es una alternativa a la DT cuando los solutos analizados son termolábiles, el acoplamiento es con cromatografía de líquidos (CL), electroforesis capilar (EC) o cuando no se cuenta con la unidad TDU. En DL la barra se sumerge en un disolvente que disminuye la interacción del analito de interés con el polímero e induce su distribución hacia el disolvente.

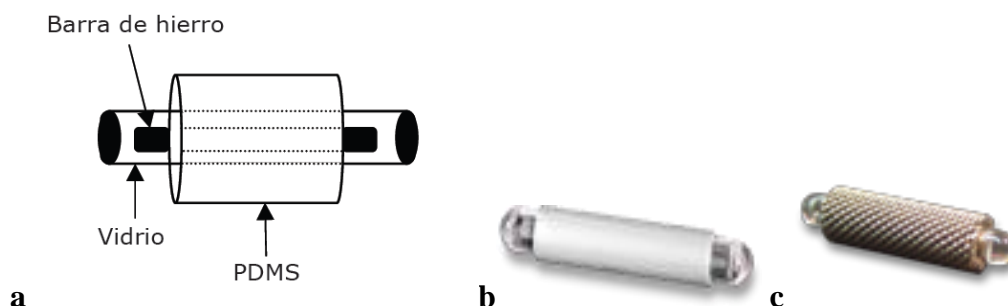
El volumen desorción mínimo está limitado a la completa inmersión de la barra y el disolvente debe ser compatible con el polímero.

El acetonitrilo (AcCN), metanol (MeOH) o mezclas con agua y disoluciones reguladoras, son los disolventes de desorción más utilizados. La DL es un modo de trabajo utilizado para los analitos que pueden ser desorbidos de la fase polimérica con rendimientos relativamente altos<sup>6,7</sup>.

La DL es una alternativa para evitar el desgaste la fase extractante con respecto a la DT.

### 1.6.2. Barras recubiertas para SBSE

Las barras magnéticas utilizadas para SBSE, tienen una cubierta de vidrio donde se encuentra adherida la fase polimérica. Tienen dimensiones de 1 ó 2 cm de longitud y están recubiertas con capas poliméricas de 0.5 ó 1 mm de grosor. Las fases comúnmente utilizadas son polidimetilsiloxano (PDMS) o de polidimetilsiloxano y etilenglicol (PDMS-EG). Son comercializadas por Twister<sup>TM</sup>, Gerstel GmbH, Müllheim a/d Ruhr, Alemania.



**Figura 5.** Barras de extracción: (a) esquema de una barra para SBSE, (b) barra recubierta de PDMS y, (c) barra recubierta de PDMS-EG<sup>22</sup>.

La barra recubierta de PDMS es para la extracción de compuestos no polares con uniones inespecíficas ( $\log K_{o/w} > 4$ ), donde el intervalo de polaridad se puede aumentar mediante la adición de una sal<sup>6, 7</sup>.

La barra recubierta de PDMS-EG cuenta con una rejilla de metal inerte para su estabilización mecánica. Para uniones inespecíficas de compuestos no polares hasta compuestos polares donantes de enlaces de hidrógeno<sup>22</sup>.

Recientemente, se han desarrollado otras fases mediante la tecnología sol-gel para obtener capas poliméricas delgadas (30 $\mu$ m). Con un sorbente biocompatible, conocido como material de acceso restringido (RAM), cuya aplicación es para análisis de muestras muy complejas como son los fluidos biológicos<sup>23</sup>.

Un ejemplo es el recubrimiento de alquil-diol (RAM), el cual permitió la extracción de cafeína en sangre equina, evitando la interferencia por parte de las proteínas de la matriz<sup>23</sup>.

### **1.6.3. Factores que afectan la extracción**

Las variables que afectan a la extracción son: tiempo de extracción, ajuste del pH, adición de una sal inerte y/o modificador orgánico, velocidad de agitación, temperatura de extracción, volumen de muestra a extraer y dilución de la muestra. El cambio de pH, adición de una sal inerte o modificador orgánico provocan cambios en el equilibrio de distribución en términos fisicoquímicos y cinéticos<sup>5-7</sup>.

### **1.6.4. Factores que afectan la desorción**

En la DT, la temperatura de desorción y la temperatura del criofoco son las variables más estudiadas. Algunos autores recomiendan no trabajar a temperaturas muy elevadas con el fin de aumentar el tiempo de vida de la barra.

Para la DL, el tipo de disolvente, volumen y tiempo de desorción son las variables más estudiadas<sup>5-7</sup>.



### **1.6.5. Limitaciones de la técnica SBSE**

Una de las desventajas de la técnica es que la barra no puede ser desorbida directamente en el inyector split/splitless de un cromatógrafo de gases. Por lo tanto se requiere un paso adicional en la metodología desarrollada.

El enjuague o lavado de la barra se realiza manualmente, por lo que puede introducir errores en la determinación.

Como en otras técnicas de preparación de muestra para análisis de trazas, la eficiencia de la SBSE puede verse fuertemente afectada por la complejidad de la matriz. Por ejemplo, sustancias orgánicas o inorgánicas disueltas pueden causar interferencia con la extracción de los solutos de interés en la fase polimérica de la barra<sup>5-7</sup>.

### **1.6.6. Aplicaciones de SBSE**

La SBSE tiene numerosas aplicaciones ambientales, en alimentos, farmacia y biomédica.

#### **1.6.6.1. Ambiental**

Las primeras aplicaciones con barra magnética fueron para el análisis ambiental. La principal ventaja de esta técnica, es que puede ser aplicada a compuestos orgánicos volátiles (VOC's) y compuestos semivolátiles. Sin embargo, la mayoría de las aplicaciones es a compuestos semivolátiles.

Se han realizado diversos estudios para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's), utilizando ambos tipos de desorción (líquida y térmica) demostrando alta eficiencia de extracción y mayor sensibilidad con respecto con SPME<sup>24</sup>.

De igual manera se han desarrollado metodologías para la determinación de bifenoles policlorados (PCB's)<sup>25</sup>, compuestos volátiles en agua potable y determinación de compuestos emergentes en aguas tratadas.

### **1.6.6.2. Alimentos**

Las aplicaciones de SBSE en alimentos puede ser clasificada en tres categorías: análisis de componentes minoritarios (compuestos volátiles, aditivos), determinación de compuestos a nivel de trazas (aldehídos, haloanisoles) y el análisis de contaminantes prioritarios y no prioritarios. Algunas investigaciones describen el análisis de compuestos volátiles en plantas y en frutos, incluyendo fresas, uvas y frambuesas. Utilizando extracción por inmersión y en modo headspace.

La técnica de SBSE en headspace es utilizada para el análisis de compuestos volátiles y compuestos aromáticos en café, vino, cerveza, whiskey y sake. También es aplicada para la determinación de plaguicidas a nivel de trazas en alimentos como vino, frutos y vegetales<sup>26</sup>.

### **1.6.6.3. Biomédicas**

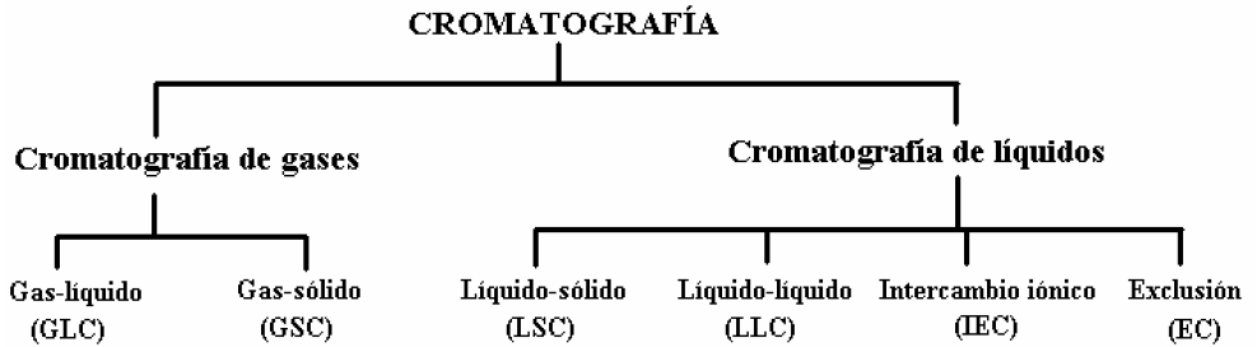
Así como en las aplicaciones en alimentos, la extracción con barra magnética puede ser empleada en el análisis de muestras biológicas. Se han realizado estudios para la determinación de compuestos volátiles y semivolátiles en orina, plasma y saliva.

Una aplicación interesante es la determinación de sustancias de uso común en muestras de orina animal y de excreción glandular. También se describen análisis de barbitúricos en orina y sus metabolitos en fluidos biológicos<sup>27</sup>.

## **1.7. Definición de cromatografía.**

La cromatografía es un método físico de separación donde los componentes a separar se distribuyen entre una fase estacionaria y una fase móvil<sup>28</sup>. Dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria y de la fase móvil se pueden distinguir distintos tipos de cromatografía.

En la figura 6 muestra la clasificación general de cromatografía con base en la fase móvil y la subdivisión con respecto a la fase estacionaria.



**Figura 6.** Clasificación de cromatografía.

### 1.8. Cromatografía de gases

En cromatografía de gases (CG) una muestra vaporizada es transportada por un gas acarreador hacia la columna, donde los compuestos se separan con base a su presión de vapor y su afinidad con la fase estacionaria, los compuestos separados salen del sistema y a este proceso se le denomina elución.

La temperatura es el parámetro que influye en la separación de los analitos; a mayor temperatura menor separación, debido a la disminución de eficiencia, reducción en el número de equilibrios provocando que el analito interactúe limitadamente con la fase estacionaria.

La fase estacionaria puede ser sólida o líquida y esto denomina dos formas de cromatografía de gases; cromatografía gas-sólido (CGS) y cromatografía gas-líquido (CGL)<sup>29</sup>.

#### 1.8.1. Clasificación de CG

##### 1.8.1.1. Cromatografía gas-sólido

La cromatografía gas-sólido se basa en la sorción de los analitos sobre la superficie sólida de la fase estacionaria. Actualmente este tipo de cromatografía tiene mínimas aplicaciones, ya que es menos eficiente que la cromatografía gas líquido. Dentro de las aplicaciones se encuentran la separación de ciertas especies gaseosas de baja masa molecular<sup>28</sup>.

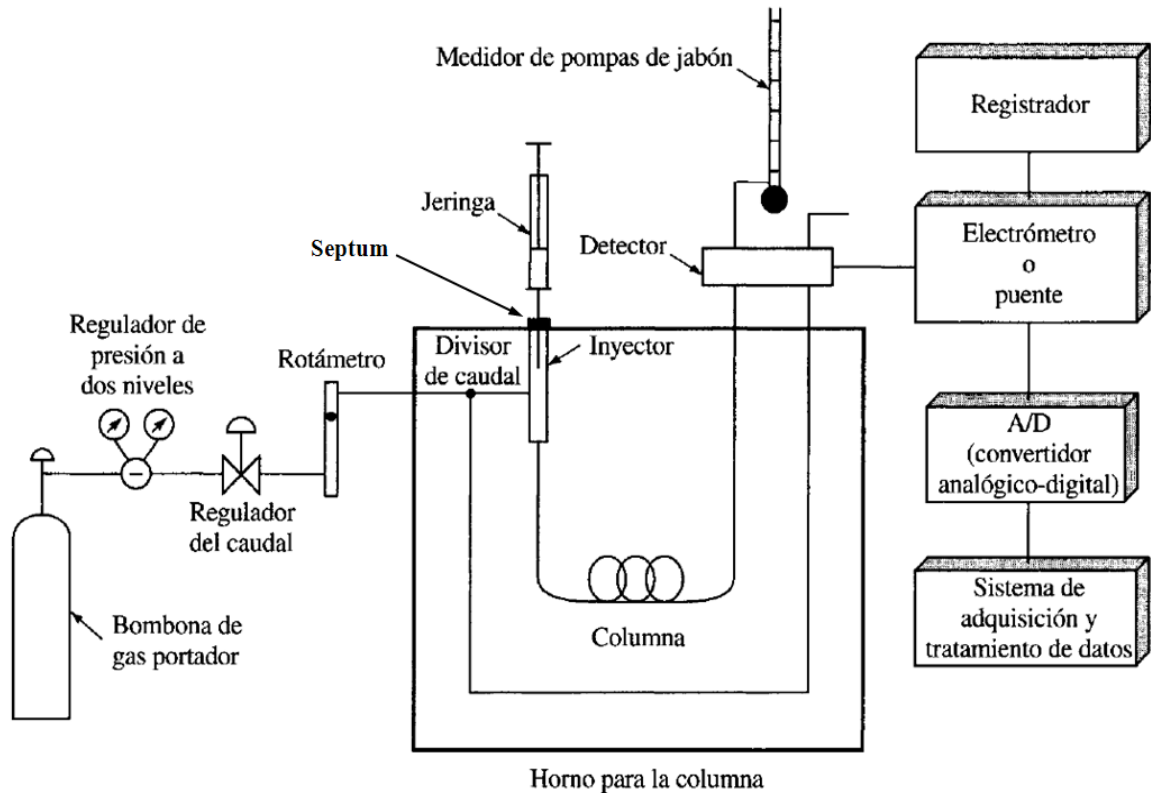
### **1.8.1.2. Cromatografía gas-líquido**

La cromatografía gas-líquido se basa en la distribución del analito en una fase líquida, que son polímeros de alto punto de ebullición. Las aplicaciones de la cromatografía gas-líquido es muy amplia y más del 90% de los análisis cromatográficos se realizan mediante esta técnica. El concepto de cromatografía gas - líquido fue utilizado por primera vez en 1941 por Martin y Synge, quienes fueron pioneros en el desarrollo de la cromatografía de distribución líquido – líquido<sup>28</sup>.

### **1.8.2. Instrumentación**

En la figura 7 muestra el esquema de un cromatógrafo de gases. La muestra volátil se inyecta a través de un septa (un disco de goma de silicona), en un inyector, en el que se evapora rápidamente. El vapor es transportado a través de la columna por el gas acarreador, que puede ser He, N<sub>2</sub>, o H<sub>2</sub>. Los analitos se separan en la columna y llegan a un detector cuya respuesta es debida a un fenómeno específico. La respuesta se transforma en una señal eléctrica que es registrada mediante un sistema de cómputo o integrador.

Los análisis térmicos en cromatografía de gases son: análisis isotérmico y con programa de temperaturas. La complejidad de la muestra determina el tipo de análisis térmico que debe realizarse pueden realizarse en dos tipos. El detector se mantiene a una temperatura más alta que la columna para evitar posibles condensaciones de los analitos<sup>30</sup>.



**Figura 7.** Esquema de un cromatógrafo de gases.

### 1.8.3. Cromatografía acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía de gases–espectrometría de masas (CG-EM), es una herramienta poderosa que combina un sistema de separación muy eficiente y un detector altamente selectivo y específico. El cromatógrafo de gases separa los componentes de una mezcla y el espectrómetro de masas proporciona información que ayuda en la identificación estructural de cada componente.

### 1.9. Espectrometría de masas

Es una técnica microanalítica que separa iones gaseosos con base en su relación masa y carga ( $m/z$ ). La información que se obtiene de un espectro de masas es el grado de fragmentación de un compuesto, así como la isotopía que lo conforma

Un espectrómetro de masas es un detector que se utiliza para análisis cualitativo y cuantitativo, donde se obtiene el espectro de masas de los analitos en estudio. La espectrometría de masas se basa en la ionización de moléculas mediante distintas técnicas (bombardeo con átomos, electrones, iones,

moléculas o fotones); los iones formados son acelerados, filtrados, separados, detectados y tabulados con respecto a su relación de masa y carga<sup>30</sup>.

En los sistemas acoplados la muestra es sometida a separación cromatográfica, el analito de estudio sale de la columna del CG y es comúnmente sometido a electroionización en alto vacío. El bombardeo electrónico ocurre con una energía de 70 eV en una cámara de ionización. Los iones son acelerados y dirigidos hacia el analizador másico, donde se filtran con base en su momentum, carga, frecuencia de oscilación o tiempo de vuelo<sup>28</sup>.

Esta técnica es muy sensible y sus límites de detección son del orden de fentogramos (fg).

Los modos de trabajo para espectrometría de masas son el barrido total de iones (SCAN) y monitoreo selectivo de iones (SIM), lo que permite mayor selectividad, especificidad y sensibilidad<sup>31</sup>.

### **1.9.1. Instrumentación**

El espectrómetro de masas consta de cinco componentes: sistema de introducción de muestra, cámara de ionización, analizador de másico, sistema de detección y sistema de registro<sup>30</sup>.

El sistema de introducción permite la entrada de la muestra hacia la cámara de ionización con la mínima pérdida de vacío ( $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  torr). Los espectrómetros de masas más modernos son capaces de introducir muestras mediante sonda directa o a través de un cromatógrafo<sup>32</sup>.

En la cámara ionización los analitos son ionizan y alinean en forma de un haz que se direcciona con un voltaje positivo. Alternativamente, la ionización se lleva a cabo por energía térmica o eléctrica. Normalmente, el sistema de entrada y la cámara de ionización están combinados en un dispositivo único. El producto de la ionización es acelerado hacia el analizador másico<sup>32</sup>.

El analizador de másico funciona en similitud con una rejilla de un espectrómetro óptico. El filtro de iones se realiza de acuerdo a la masa y carga del ion a diferencia de la separación con base en la longitud de onda de los fotones.

Existen diversos tipos de espectrómetros de masas, dependiendo de la naturaleza del analizador de másico<sup>32</sup>.

Al igual que en un espectrómetro óptico, un espectrómetro de masas contiene un detector (sensible a iones) que transforma el corriente iónica en una señal eléctrica que se procesa y almacena en un ordenador. El resultado se tabula en términos de abundancia relativa con respecto a al relación de masa y carga de cada ion y a este gráfico se le denomina espectro de masas <sup>32</sup>.

## Capítulo 2

### DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 2. 1. Materiales y equipo

##### **2.1.1. Sistema cromatográfico**

Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N con columna capilar Quadrex-5 de sílice fundida, 30m (5% difenil 95% polidimetilsiloxano), 0.25mm de diámetro interno, 0.25 $\mu$ m de grosor de la fase y un inyector Spit/Splitless, con detector selectivo de masas Agilent 5973 Network.

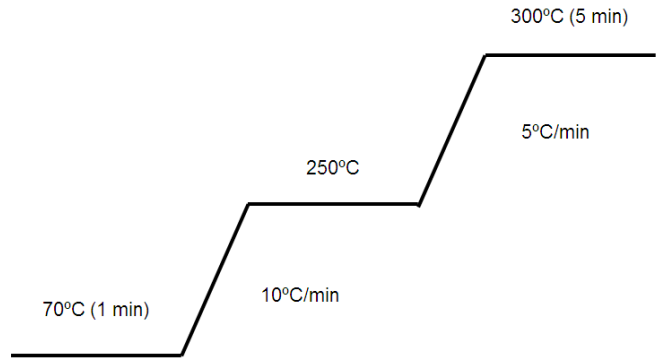
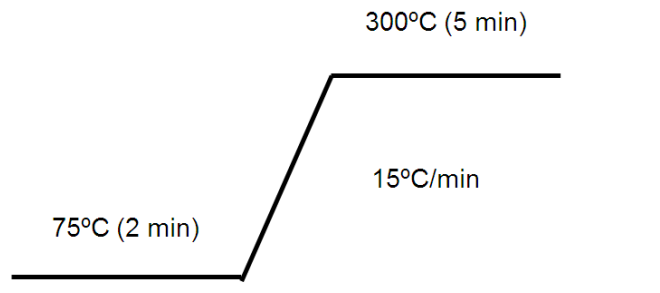
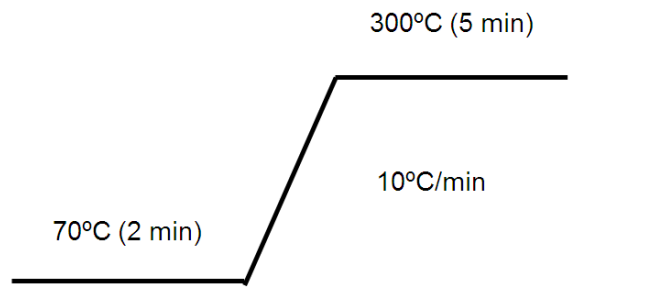
##### **2.1.1.1. Condiciones cromatográficas**

Se utilizó Helio como gas acarreador a flujo constante de 1mL/min. La temperatura del inyector fue de 250°C y se trabajó en modo splitless con tiempo de 1min. La temperatura de la línea de transferencia fue de 280°C, la fuente de ionización fue de 230°C, la energía de ionización fue de 70eV y la temperatura del cuadrupolo estuvo a 150°C.

En la tabla 1 se presentan los programas de temperatura correspondientes para cada metodología.



**Tabla 1.** Programas de temperatura utilizados.

Tipo de análisis	Programa de temperatura
<b>Análisis cualitativo en orina</b>	 <p data-bbox="686 806 877 851">Modo: SCAN</p>
<b>Análisis cuantitativo en orina y en tabletas</b>	 <p data-bbox="686 1265 845 1310">Modo: SIM</p>
<b>Análisis cualitativo en tabletas</b>	 <p data-bbox="686 1724 877 1769">Modo: SCAN</p>

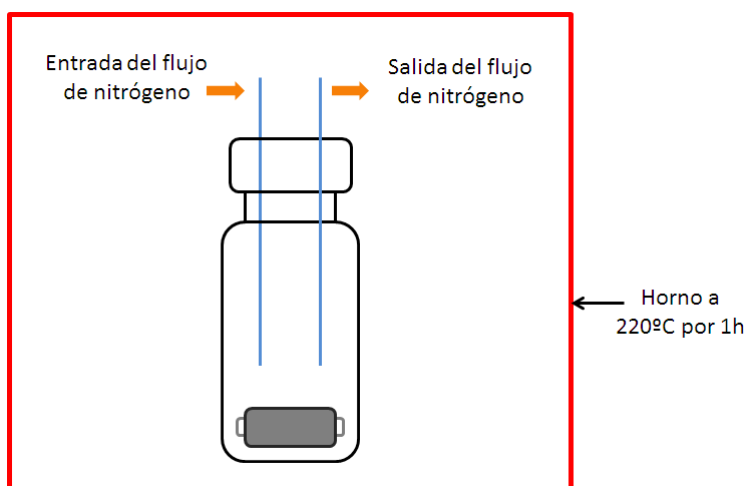
**2.1.2. Materiales y equipo para la preparación de la muestra**

- Barra EG/Silicone Twister™, Gestel GmbH, Müllheim a/d Ruhr, Alemania. Las dimensiones de la barra fueron de 10mm de largo recubierta con 32μL de copolímero (polidimetilsiloxano y etilenglicol) en una rejilla de metal inerte para la estabilización mecánica (Ver figura 5c).
- Jeringas Hamilton de vidrio de 10, 100, 250μL.
- Frascos vial de 11mL con tapón de rosca.
- Material de vidrio Pyrex: matraces aforados de 5, 10, 25, 50, 100 y 250mL, pipetas volumétricas de 1, 2, 5, y 10mL; pipetas graduadas de 1, 2mL; vasos de precipitados de 20, 50, y 100mL; matraz Kitasato de 50mL.
- Embudo Büchner de 5cm de diámetro.
- Pipeta Pasteur de vidrio.
- Espátula de níquel-cromo.
- Nave de pesado de vidrio.
- Barra magnética de 5cm.
- Membrana de Nylon de 0.45μm de apertura.
- Parrilla de agitación Thermo Scientific Super-Nuova.
- Balanza Analítica Starorius CP1245.
- Equipo para medición del punto de fusión Electrothermal Mel-Temp modelo 1001D.
- Potenciómetro OAKTON pH 510 series.

**a. Acondicionamiento de barras**

Para todo el desarrollo del proyecto de investigación, se emplearon tres barras de PDMS-EG. Una de las barras se acondicionó térmicamente y las otras se acondicionaron con disolvente.

La primera barra de extracción se colocó en un vial conectado a un sistema de flujo con hidrógeno a temperatura controlada. El acondicionamiento se llevó a cabo a 220°C durante 60 min y se verificó el acondicionamiento, agitando la barra en 500μL de acetonitrilo a 500rpm por 60 min. Se inyectó 1μL al CG-EM. La figura 8 muestra el esquema del sistema de acondicionamiento térmico



**Figura 8.** Acondicionamiento térmico de la barra.

La segunda y tercera barra se acondicionaron con 500 $\mu$ L acetonitrilo, con agitación durante 90 min a temperatura ambiente. Se inyectó 1 $\mu$ L después de 30 min de agitación para verificar que la barra estuviera limpia de compuestos que pudieran interferir con el analito de interés. Para corroborar la ausencia de interferentes se acondicionaron las barras después de cada extracción con 5 mL de acetonitrilo durante 30 min a 400 rpm.

### **b. Limpieza del material**

Las buenas prácticas de Laboratorio demandan limpieza del material de vidrio que se utiliza. El material de vidrio debe estar físicamente limpio así como químicamente limpio y libre de grasa. Para evitar dichas interferencias se llevó a cabo un minucioso procedimiento de limpieza del material.

El material se colocó en baño de agua con Extran al 10% v/v, posteriormente se enjuagó con abundante agua. Se lavó con acetona y metanol para eliminar cualquier material orgánico que pudiera quedar. El material de vidrio no volumétrico se secó en estufa a 100°C.

El material de vidrio utilizado para las curvas de calibración se dejó sumergido 2 horas en una solución al 1% v/v de ácido nítrico con la finalidad de eliminar residuos adheridos al vidrio. A continuación, se lavó con Extran al 10% v/v y se enjuagó con abundante agua.

### 2.1.3. Reactivos y excipientes

Acetonitrilo grado HPLC (Prolabo), Metanol 99.95% pureza J. T. Baker, Acetona Q.P. pureza 99% Química Alva, agua desionizada nanopure sometida a un desionizador Nanopure (Barnstead Thermolyne, modelo 04747) filtración en un sistema purificador, Hidróxido de potasio 87% pureza J. T. Baker, HCl 37.2% J.T. Baker, Cloruro de Sodio 99.9% pureza J. T. Baker, Buffer de fosfatos 1M pH=7 Merck, enzima  $\beta$ - glucoronidasa.

Celulosa microcristalina (AVICEL PH-102) Química Barsa; Lactosa monohidratada Facultad de Química; croscarmelosa sódica (Ac-Di-Sol) FM; povidona (KOLIDON 30) Química Barsa; estearato de magnesio Adyfarm, almidón Química Barsa.

### 2.1.4. Estándar secundario de Modafinilo

El sistema de aduanas no permitió la entrada del estándar certificado del modafinilo. Por lo que se obtuvo un estándar secundario mediante la extracción del principio activo de tabletas comerciales Modiodal® de 200mg.

**Tabla 2. Modafinilo.**

Estándar	Iones característicos <sup>33</sup> (m/z)	Estructura
<b>Modafinilo</b>	152, 165, 167	<p data-bbox="1059 1547 1305 1576">MM: 273.35 uma</p>

En la tabla 2 se señalan los tres iones característicos para la identificación del modafinilo en espectrometría de masas, su estructura y su masa molecular.

#### **2.1.4.1. Procedimiento para la obtención del estándar secundario de modafinilo.**

Se colocaron 6 tabletas comerciales en un mortero de porcelana, se trituraron y homogenizaron. El sólido se transfirió cuantitativamente a un vaso de precipitados de 100mL y se disolvió con 60mL de acetonitrilo con agitación durante 30 min a 1200 rpm. Posteriormente, la disolución se sonicó durante 30 min y el sobrenadante se trasvasó a un tubo de ensaye que se centrifugó a 900 rpm durante 60 min.

La disolución se filtró con una membrana de nylon de 0.45µm y el disolvente se evaporó a sequedad con flujo suave de nitrógeno. El sólido se redisolvió en metanol para su recristalización en baño de hielo.

El modafinilo así obtenido se identificó y caracterizó por lo que en lo sucesivo se nombrará como estándar y no como estándar secundario.

#### **2.1.5. Muestras**

##### **a. Blanco de orina**

La muestra de orina que se usó para la optimización de la metodología fue obtenida por un voluntario masculino adulto sano. Para la recolección de orina el voluntario llevó una dieta diariamente (Tabla 3) y en ausencia de medicamentos.

**Tabla 3.** Alimentos consumidos por el voluntario durante la recolecta de la muestra.

	<b>Alimento</b>
<b>Desayuno</b>	Agua y/o jugo con fruta y yogurt natural
<b>Entre comida</b>	Huevo cocido con queso panela y una tortilla
<b>Comida</b>	Carne con verduras sin pan ni tortilla
<b>Cena</b>	Carne con verduras sin pan ni tortilla

La dieta se acompañó de una ingesta líquida basada en agua y café para inducir un efecto diurético.

El muestreo de orina se procedió colectando la segunda micción matutina del voluntario. La colecta se efectuó durante dos días consecutivos. La orina colectada se distribuyó en 70 jeringas desechables de 5 mL y se almacenaron en congelación a -20°C. Se determinó el pH de la orina antes de congelar.

**b. Muestra de orina del voluntario**

La muestra de orina se obtuvo de un voluntario joven masculino, que ingirió dos tabletas de modafinilo de 200mg, la orina que se obtuvo fue de 24 horas después de la ingesta. La muestra se almacenó en congelación a -20°C. Esta muestra fue para la identificación y cuantificación con la metodología desarrollada. Se desconoce el régimen de alimentación para este sujeto.

**c. Tabletas comerciales**

Presentación farmacéutica comercial de una caja con 14 tabletas Modiodal® 200mg, lote: MH0501 fecha de caducidad: OCT 2013 compradas en Farmacia.

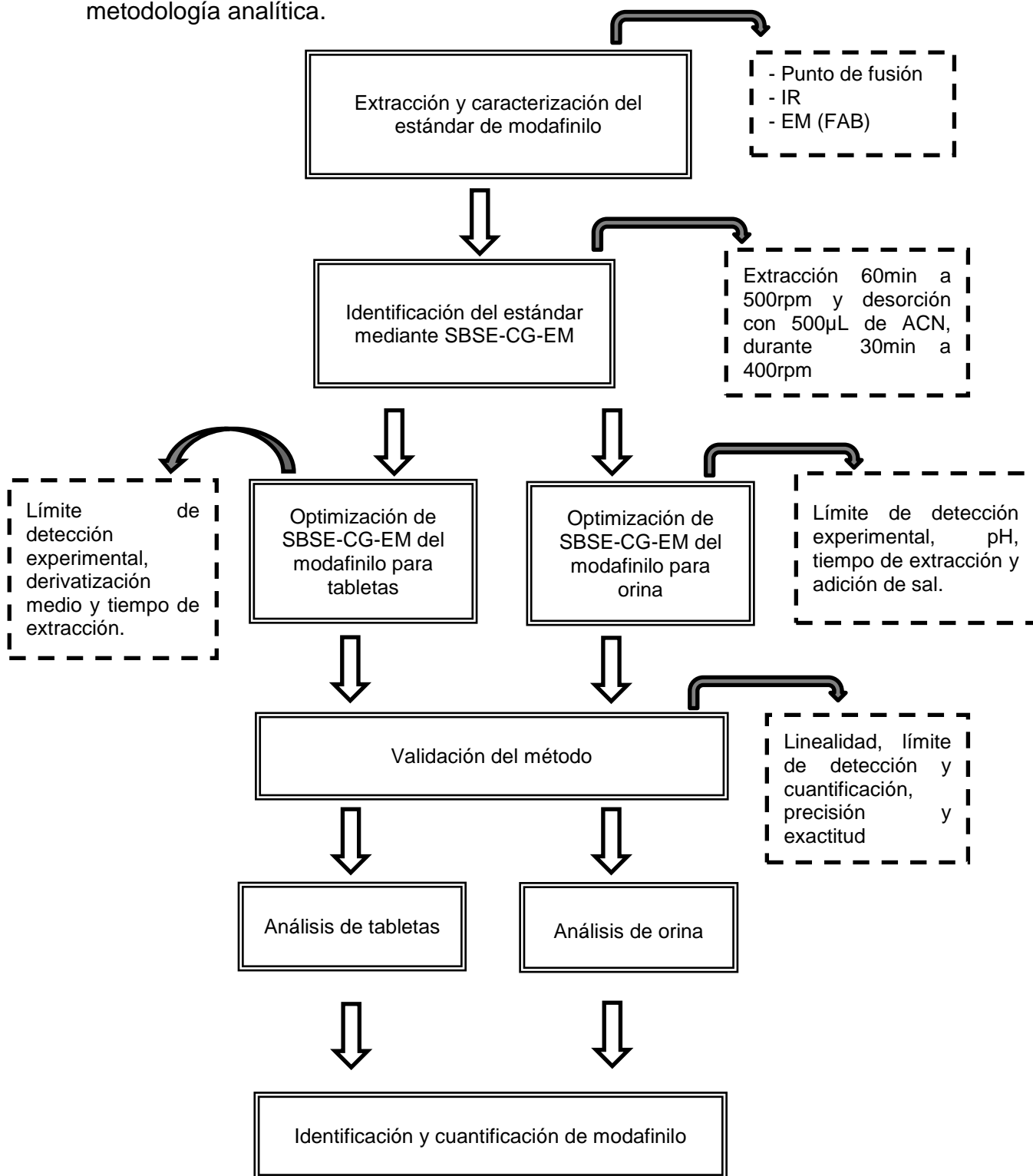
**2.1.6. Preparación de disoluciones estándar de modafinilo**

Se prepararon soluciones estándar de modafinilo en concentración de 10, 100 y 1000 mg/L en metanol. De igual manera, se preparó una disolución de 100 mg/L en acetonitrilo. Las disoluciones se almacenaron en frascos de vidrio, a una temperatura de 4°C para su posterior uso.

## 2.2 Experimentación

### 2.2.1 Esquema analítico

La figura 9 describe las etapas que se llevaron a cabo para desarrollar la metodología analítica.



**Figura 9.** Esquema general de experimentación.

### **2.2.2. Caracterización e identificación del estándar de modafinilo**

Para confirmar el estándar de la extracción del principio activo de las tabletas, se caracterizó mediante su punto de fusión, espectro de infrarrojo y espectro de masas por FAB.

Debido a que el modafinilo no está dentro de la base de datos de la Biblioteca de espectros de Masas del NIST (The Nist Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass SpectraLibrary versión 2.0 del 19 Nov. 2000) y se conocen los iones característicos del modafinilo (ver tabla 2), la identificación se llevó a cabo mediante la inyección de la disolución del estándar.

La disolución del estándar se preparó a una concentración de 1mg/L en agua desionizada, 5mL se sometieron a extracción con la barra durante 60 min a 500rpm y la desorción se efectuó con 500µL de acetonitrilo durante 30 min a 400rpm. Se inyectó 1µL del extracto de la desorción al CG-EM en modo SCAN, para obtener el cromatograma iónico total y el espectro de masas correspondiente.

Se determinaron los tiempos de retención y espectros de masas de disoluciones estándar 100 y 1000 mg/L de modafinilo.

### **2.2.3. Optimización de parámetros de la extracción con barra magnética (SBSE)**

La extracción con barra magnética depende de la constante de reparto del analito en la fase acuosa y la fase polimérica. Esta constante se determina por factores como: pH, tiempo de extracción, temperatura, adición de sal, velocidad de agitación, modificadores orgánicos entre otras, para que la respuesta de la extracción en barra sea máxima.

#### **2.2.3.1. Optimización de la metodología para el análisis de orina**

Para la metodología en orina los factores optimizados fueron: tiempo de extracción, el pH y adición de sal. Para evaluar los parámetros se estableció como variable fija la desorción, la cual se realizó con 500µL de AcCN durante 30 minutos a 400rpm y en temperatura ambiente. Se inyectó 1µl de los extractos de desorción en el CG-EM en modo SIM.



#### **a. Límite de detección experimental**

Con el objetivo de elegir adecuadamente la concentración con la cual se efectuó la optimización de la metodología se obtuvo experimentalmente el límite de detección en orina. Éste se obtuvo con el mayor tiempo de extracción para obtener la máxima respuesta. Se fortificó la orina blanco a 4 niveles de concentración: 50, 100, 250 y 500 µg/L. Se efectuaron las extracciones con 1mL de muestra, durante 90 minutos a 500rpm y la desorción se efectuó como se mencionó anteriormente.

#### **b. pH del medio de extracción**

El pH de extracción se estudió a cuatro valores de pH (pH = 2, 5, 7 y 9) y con el resultado del límite de detección experimental, la orina fue fortificada a 250µg/L. El pH de las disoluciones se ajustó con ácido clorhídrico e hidróxido de potasio respectivamente. La extracción se realizó con 1mL de muestra durante 90 min a 500rpm y la desorción se efectuó como se mencionó anteriormente.

#### **c. Tiempo de extracción**

Con base en el resultado del límite de detección y pH, se fortificó la orina blanco a 250 µg/L y se ajustó a pH=5. Se evaluó el tiempo de extracción realizando el procedimiento a 3 diferentes tiempos: 30, 60 y 90 min. En 1mL de orina se efectuó la extracción con barra a 500rpm y la desorción se realizó como se describió anteriormente.

#### **d. Adición de sal**

Con la finalidad de aumentar la respuesta se preparó una disolución de orina fortificada a 250 µg/L, pH=5 y con 25% de cloruro de sodio sobre la saturación del agua. La disolución se sometió a extracción durante 30 y 60 minutos de extracción a 500rpm. La desorción se efectuó bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

### **2.2.3.2. Optimización de la metodología para el análisis de tabletas**

Para la metodología en tabletas los factores optimizados fueron la derivatización, tiempo y el medio de extracción, se estableció como variable fija la desorción, la cual se realizó con 500µL de AcCN durante 30 minutos a 400rpm y en temperatura ambiente. Se inyectó 1µl de los extractos de desorción en el CG-EM en modo SIM.

Se obtuvo el peso promedio de 6 tabletas, las cuales se pulverizaron y homogeneizaron. El pulverizado resultante se utilizó para la optimización de la metodología.

#### **a. Derivatización**

Se disolvieron en 5mL de agua acidulada (pH=2.34) 100mg de polvo de tabletas (equivalente a 40 mg de modafinilo) y se sometió a extracción durante 30 min a 500rpm; la desorción se efectuó con 500µL de AcCN durante 30 min a 400rpm. El extracto se transfirió a un vial de reacción y se llevó a sequedad bajo flujo de nitrógeno. Se adicionaron 100 µL de N,N-(tertbutildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) y se indujo la reacción a 70°C durante 60 minutos. Se obtuvo el derivado TBDMS-modafinilo y se inyectó 1µL al CG-EM.

#### **b. Límite de detección experimental**

El límite de detección se determinó con el análisis de 100, 50, 25 y 10mg de polvo de tableta (equivalentes a 40, 20, 10 y 4mg de modafinilo). Los sólidos se disolvieron en agua desionizada y se utilizaron 5mL de disolución para cada análisis. La extracción se efectuó durante 30 min a 500rpm; la desorción se efectuó como se mencionó anteriormente. Se inyectó 1µL del extracto de desorción en el CG-EM en modo SIM.

#### **c. Medio de extracción**

El medio de extracción se evaluó pesando de 10mg de polvo de tableta (equivalente a 4mg de modafinilo) y se disolvieron en un volumen de 5mL de agua ácida pH = 2.3 y en agua desionizada respectivamente. Las disoluciones se sometieron a extracción en barra durante 30 minutos a 500rpm y la desorción se realizó bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Se inyectó 1µL del extracto de desorción en el CG-EM en modo SIM.

#### **d. Tiempo de extracción**

Con los resultados anteriores, el tiempo de extracción se evaluó a 30 y 60 minutos. Se preparó una disolución con 10mg de polvo de tableta (equivalente a 4 mg de modafinilo) y se disolvieron en 5mL de agua desionizada. La extracción se realizó a 500rpm y la desorción se realizó con AcCN en las condiciones establecidas. Se inyectó 1µL del extracto de desorción en el CG-EM en modo SIM.

### **2.2.4. Validación**

#### **2.2.4.1. Validación del método para orina**

##### **a. Límites de detección y cuantificación**

En la determinación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC), se fortificó la orina blanco a 0.25mg/L y 0.5mg/L. Se realizaron extracciones independientes por triplicado para cada disolución y se determinó la desviación estándar (DE) de la medición. Los límites de detección y cuantificación se calcularon como 3 y 10 veces el valor de la desviación estándar respectivamente como se muestra a continuación:

$$CV = \left( \frac{\sigma}{\bar{x}} \right) 100$$

$$LD = 3\sigma$$

$$LC = 10\sigma$$

Donde:  $\sigma$  = desviación estándar

$\bar{x}$  = media aritmética

##### **b. Precisión**

La precisión se evaluó mediante el coeficiente de variación (CV) para las concentraciones de la recta de la curva (0.25, 0.5, 1.0, 2.0, y 2.5 mg/L). Se realizaron por triplicado extracciones independientes para cada concentración.

### c. Linealidad

El intervalo estudiado para el modafinilo fue de 0.25 a 2.5 mg/L, en la cual se construyó una curva de calibración de cinco puntos en orina. La curva de calibración se realizó por triplicado y se calcularon los promedios de las mediciones para cada punto de concentración. La tabla 4 muestra los valores de concentración utilizados.

Se realizó una curva de calibración en agua desionizada con el mismo intervalo de concentración utilizado en orina (tabla 5).

Las abundancias relativas se adquirieron por monitoreo selectivo de iones (SIM) con los iones característicos de modafinilo (167, 165 y 152 m/z) y se graficaron en función de la concentración.

**Tabla 4.** Curva de calibración en orina.

Curva de calibración	Puntos de concentración (mg/L)
Orina fortificada	0.25
	0.50
	1.0
	2.0
	2.5

### d. Exactitud

La exactitud del método se evaluó mediante el recobro absoluto y relativo. Se realizaron extracciones para cada punto de la curva de calibración y la concentración de analito se calculó con la ecuación de la recta obtenida para orina y agua desionizada. Los valores obtenidos a partir de ambas ecuaciones corresponden al recobro relativo de la metodología.

Para el cálculo del recobro absoluto, se comparó la cantidad de analito extraído con respecto a la cantidad de analito medido a partir de la inyección directa de los estándares en AcCN. El intervalo estudiado para la curva de calibración en AcCN fueron: 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5mg/L

### **2.2.4.2. Validación del método para tabletas**

#### **a. Límite de detección teórico y cuantificación**

En la determinación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC), se prepararon disoluciones a 0.25mg/L y 0.5mg/L de modafinilo en agua desionizada. Se realizaron extracciones independientes por triplicado para cada disolución y se determinó la desviación estándar (DE) de la medición. Se calculó DE, CV, LD y LC, utilizando las ecuaciones presentadas en la página 40.

#### **b. Precisión**

La precisión se evaluó mediante el coeficiente de variación (CV) para las concentraciones de: 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, y 2.5 mg/L. Se realizaron por triplicado extracciones independientes para cada concentración.

#### **c. Linealidad**

El modafinilo se estudió en el intervalo de 0.25 a 2.5 mg/L, en la cual se construyó una curva de calibración de cinco puntos en agua desionizada. La curva de calibración se realizó por triplicado y se calcularon los promedios de las mediciones para cada punto de concentración. La tabla 5 muestra los valores de concentración utilizados.

Las abundancias relativas se adquirieron por monitoreo selectivo de iones (SIM) con los iones característicos de modafinilo (167, 165 y 152 m/z) y se graficaron en función de la concentración.

**Tabla 5.** *Curva de calibración en agua desionizada.*

<b>Curva de calibración</b>	<b>Puntos de concentración (mg/L)</b>
<b>Agua desionizada</b>	0.25
	0.50
	1.0
	2.0
	2.5

#### **d. Exactitud**

La exactitud del método se evaluó mediante el recobro absoluto y relativo. Se realizaron extracciones para cada punto de la curva de calibración y la concentración de analito se calculó con la ecuación de la recta obtenida para agua desionizada. Los valores obtenidos a partir de la ecuación corresponden al recobro relativo de la metodología.

Para el cálculo del recobro absoluto, se comparó la cantidad de analito extraído con respecto a la cantidad de analito medido a partir de la inyección directa de los estándares en AcCN a las concentraciones mencionadas en el inciso de exactitud de la página 41.

## 2.2.5. Análisis de muestras

### 2.2.5.1. Determinación de modafinilo en orina

#### a. Metodología optimizada para la extracción de modafinilo en orina

Debido a la sedimentación que presentó la muestra, la orina fue filtrada con membrana de nylon de  $0.45\mu\text{m}$  en embudo Büchner y al vacío. En la figura 10 se observa la muestra de orina sedimentada.



**Figura 10.** Muestra de orina antes (izquierda) y después de filtrar (derecha).

Se filtró la orina y se ajustó a  $\text{pH}=5$  con una disolución de HCl. La extracción se efectuó con 1 mL de orina durante 60 min a 500 rpm. La desorción se realizó con  $500\mu\text{L}$  de AcCN durante 30 min a 400 rpm. Se inyectó  $1\mu\text{L}$  al CG-EM. El procedimiento se empleó para la identificación del modafinilo en orina (análisis cualitativo) y en el análisis cuantitativo.

#### b. Identificación de metabolitos de modafinilo en orina

Se hidrolizó una muestra de orina con  $\beta$ -glucoronidasa para la determinación de los metabolitos de modafinilo, los cuales han sido reportados como: ácido de modafinilo, y sulfona de modafinilo mediante el siguiente procedimiento:

Se filtró 1 mL de orina, se le adicionaron 0.5 mL de buffer de fosfatos 1 M a  $\text{pH}=7$  y se agitó con vortex. Posteriormente se adicionaron  $80\mu\text{L}$  de enzima y la reacción llevó a cabo a  $60^\circ\text{C}$  durante 60 min. La extracción se realizó durante 60 min a 500 rpm y la desorción con  $500\mu\text{L}$  de acetonitrilo durante 30 min a 400 rpm. Se inyectó  $1\mu\text{L}$  al CG-EM.

### **c. Cuantificación de modafinilo en orina**

La cuantificación de modafinilo se realizó con el área obtenida de tres extracciones independientes, y por medio de la ecuación de la recta se determinó la concentración de modafinilo en la orina. El área obtenida estuvo en función de los iones fragmento característicos del modafinilo (152, 165, 167 m/z).

#### **2.2.5.2. Determinación de modafinilo en tabletas**

##### **a. Metodología optimizada para la extracción de modafinilo en tabletas**

Se pesaron 10mg de polvo de tabletas (equivalente a 4mg de modafinilo), el sólido se disolvió en 5 mL de agua desionizada y se agitó hasta disolución completa. La disolución se sometió a baño ultrasónico durante 15 min y el sobrenadante se trasvasó a un tubo de ensaye que se centrifugó durante 30 min a 900rpm. La extracción se realizó durante 30 min a 500rpm. La desorción se efectuó con 500 $\mu$ L de acetonitrilo durante 30 min agitando a 400rpm. Se inyectó 1 $\mu$ L al CG-EM. SE realizó el mismo procedimiento para la identificación del modafinilo, el estudio de la interacción de excipientes (análisis cualitativo) y en el análisis cuantitativo en tabletas.

##### **b. Interferencia de excipientes en tabletas**

Se realizó un estudio para verificar la interferencia de excipientes en la determinación de modafinilo; para lo cual se preparó una mezcla de los 6 excipientes utilizados en la formulación del Modiodal®. El objetivo del estudio fue comparar los cromatogramas obtenidos de dos extracciones en presencia de excipientes, con y sin principio activo respectivamente. Los excipientes mencionados en la ficha técnica del modafinilo según la FDA<sup>34</sup>, sugiere que la producción del medicamento se lleva a cabo por granulación vía húmeda que maneja porcentajes de excipientes que se muestran en la tabla 6.



**Tabla 6.** *Porcentaje propuesto de excipiente por tableta comercial.*

<b>Excipiente</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>mg/tableta</b>
Celulosa microcristalina	25	125
Lactosa monohidratada	25	125
Almidón	5	25
Croscarmelosa sódica	2	10
Povidona (polivinilpirrolidona)	2	10
Estearato de Magnesio	1	5
Modafinilo	40	200
Total	100	500

Se realizó la mezcla (tabla 6) de excipientes considerando la proporción en masa para dos tabletas (1g) del producto comercial.

### **c. Cuantificación de modafinilo en tabletas**

La cuantificación de modafinilo se realizó con el área obtenida de tres extracciones independientes, y por medio de la ecuación de la recta se determinó la concentración en tabletas. El área obtenida estuvo en función de los iones fragmento característicos del modafinilo (152, 165, 167 m/z).

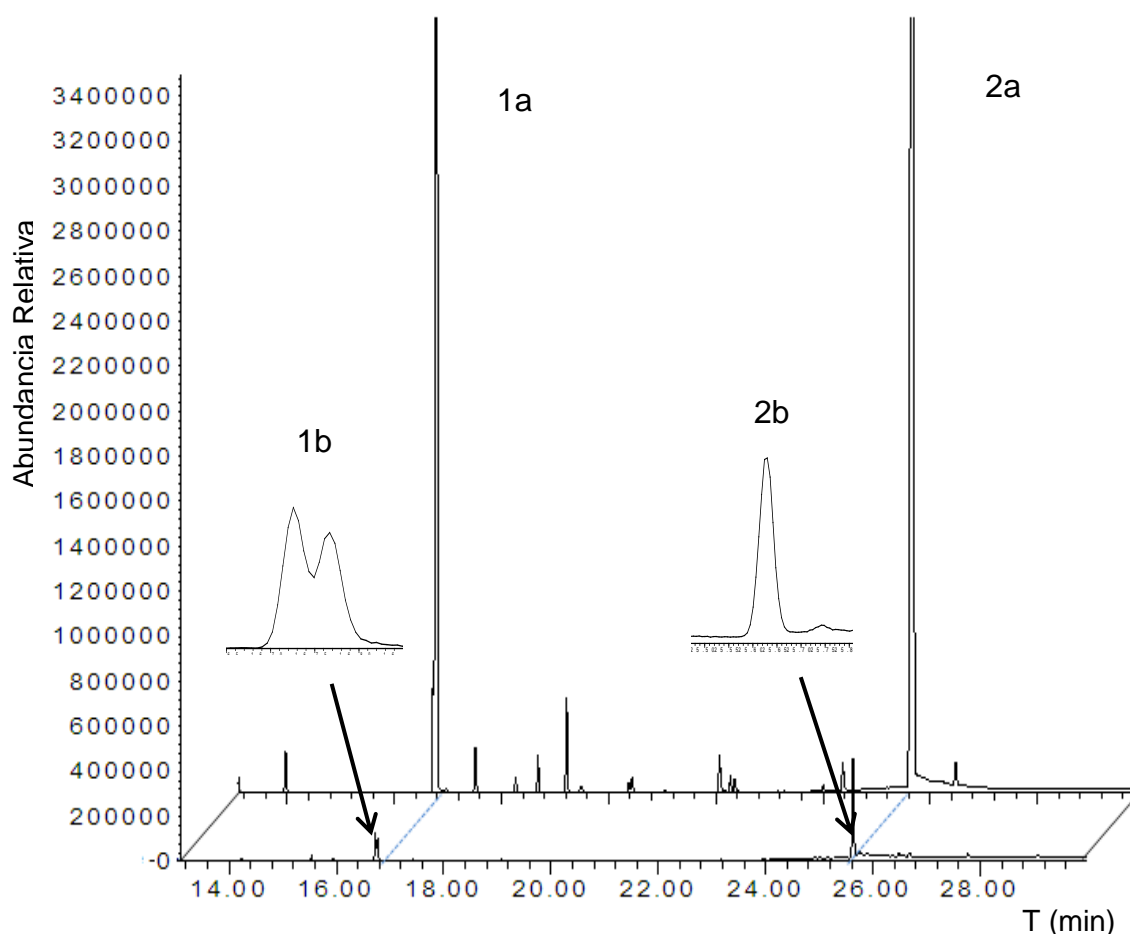
## Capítulo 3

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 3.1. Estándar secundario de modafinilo

## 3.1.1. Extracción de estándar secundario de modafinilo

Después de la extracción y recristalización se obtuvieron 329.2 mg de modafinilo. Se preparó una disolución en metanol (1000 mg/L) del modafinilo cristalizado. El cromatograma iónico total y espectro de masas obtenido de la disolución preparada, se comparó con el cromatograma y espectro de masas de un estándar certificado de modafinilo en metanol (100 mg/L). La figura 11 muestra la comparación de los cromatogramas.



**Figura 11.** Cromatograma iónico total: 1a y 2a estándar obtenido en metanol (1000 mg/L); 1b y 2b estándar certificado de modafinilo en metanol (100 mg/L).

Como se observa en el cromatograma iónico total se obtuvieron los mismos picos cromatográficos y los tiempos de retención del estándar secundario y el estándar certificado.

### **3.1.2. Punto de fusión**

La pureza del modafinilo obtenido se verificó mediante el punto de fusión, cuyo valor fue de 162-163 °C. El punto de fusión reportado en bibliografía es de 164-166 °C<sup>35</sup> en cristales a condiciones estándar (760mm Hg). Se consideró que la presión atmosférica en la ciudad de México es 580 mm Hg<sup>36</sup>, lo que implica una disminución en el punto de fusión.

### **3.1.3. Espectroscopia Infrarroja**

Se obtuvo el espectro de infrarrojo del modafinilo recristalizado, observándose bandas características del grupo amida: las frecuencias de 3304.31 y 3164.15  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del estiramiento en N-H; la frecuencia de 1584.16  $\text{cm}^{-1}$  por torsión en el plano a la vibración de N-H; la frecuencia de 1683.44  $\text{cm}^{-1}$  por la vibración del estiramiento de C=O en amidas primarias. De igual manera se observan las frecuencias correspondientes a los anillos aromáticos: 3069.66 y 3028.90  $\text{cm}^{-1}$  por el estiramiento de C-H; 1584.16, 1494.22 y 1450.07  $\text{cm}^{-1}$  debida a la vibración de C=C; 744.67, 700.29 y 690.08  $\text{cm}^{-1}$  pertenecientes a la monosustitución del anillo aromático.

Las frecuencia correspondiente al sulfóxido fue 1029.07  $\text{cm}^{-1}$  perteneciente a la vibración de S=O. (Ver anexo I)

### **3.1.4. Espectrometría de masas por FAB**

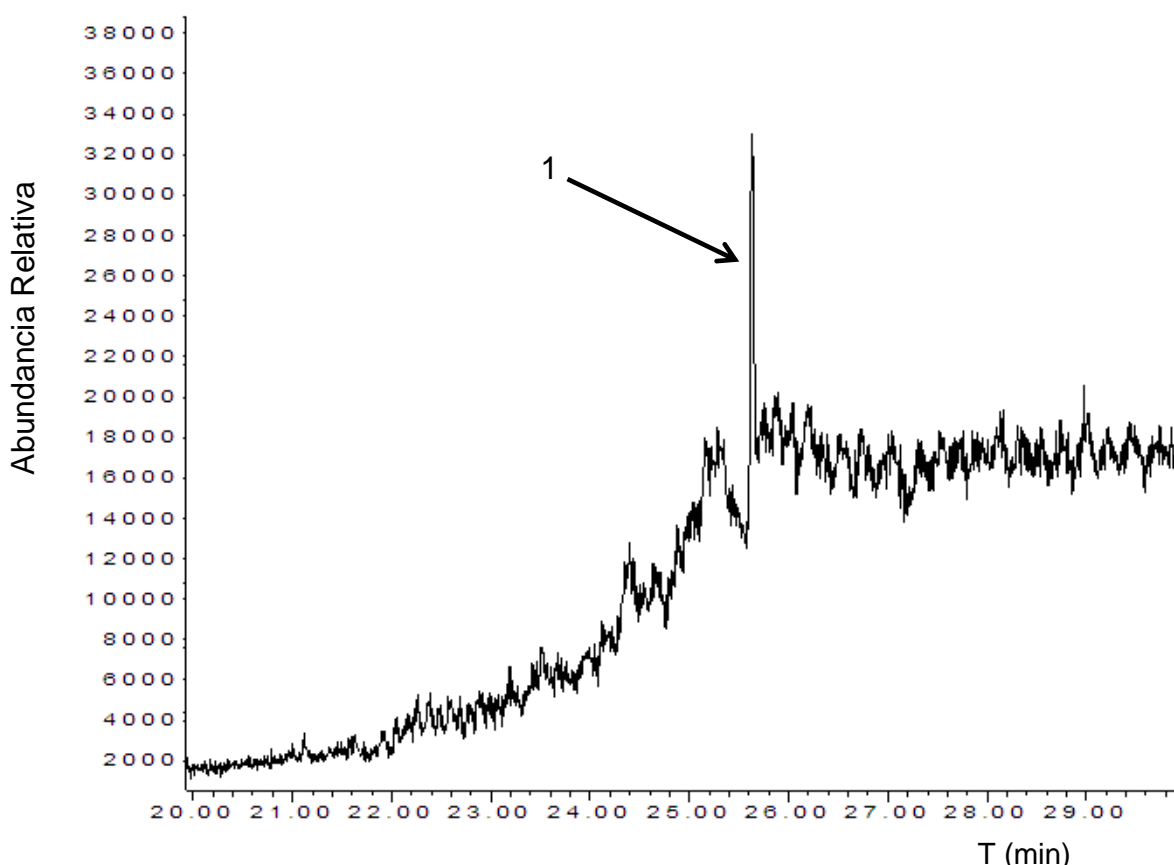
El análisis de espectrometría de masas se realizó por FAB como técnica de ionización (Fast Atom Bombardment) en matriz de glicerol; observándose los iones característicos de modafinilo: 152, 165, 167 m/z. En el espectro de masas (ver anexo I) se puede observar el ion molecular a 274 m/z, el cual no se observa con impacto electrónico, debido a que FAB es una técnica de ionización más suave.

Los resultados obtenidos por espectroscopia infrarroja y espectrometría de masas, fueron comparados con los resultados de otros trabajos reportados en la bibliografía<sup>37</sup>, donde se presentan los espectros de un estándar certificado de

modafinilo y un estudio clínico del analito orina. El modafinilo recristalizado en el laboratorio no muestra diferencias espectroscópicas significativas con lo reportado en la bibliografía.

### 3.1.5. Identificación del estándar secundario de modafinilo por SBSE-CG-EM

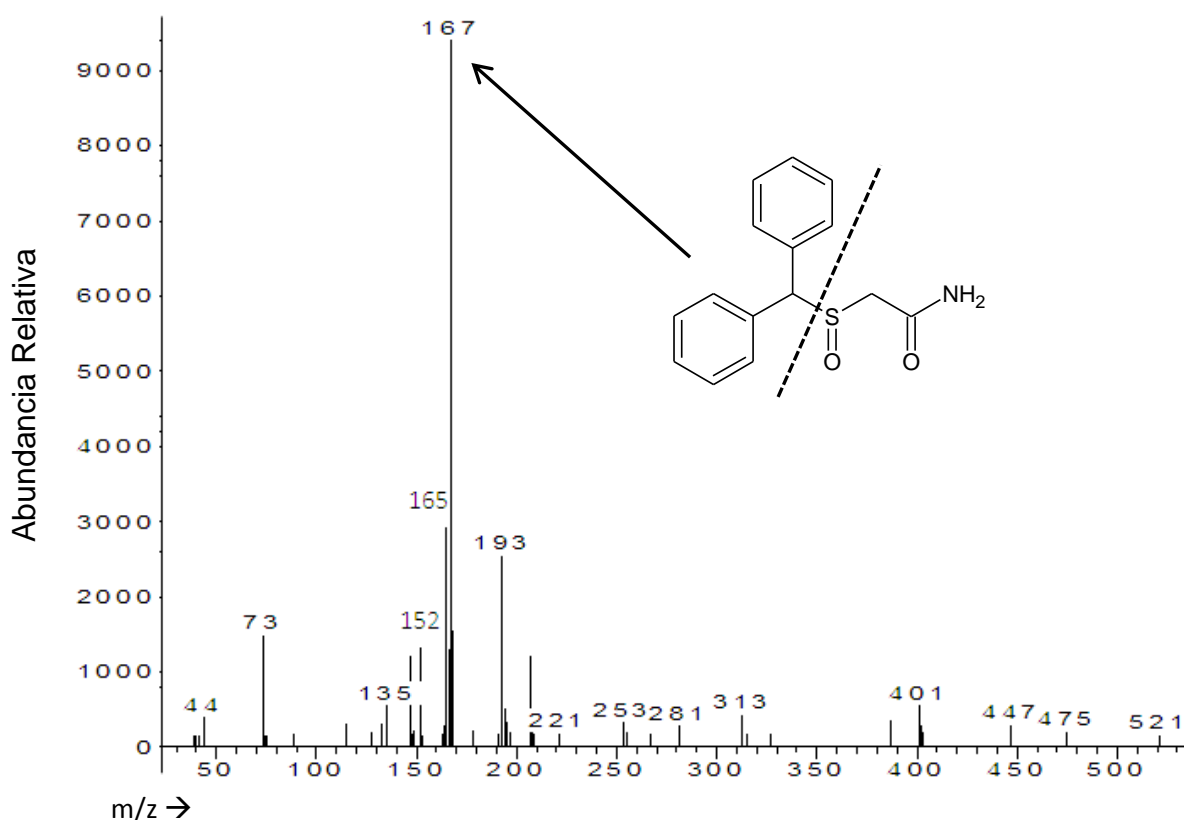
Previo a la optimización de los parámetros de SBSE se realizó la extracción de un estándar de modafinilo a 1mg/L, se aplicó la metodología como se indicó en la sección 2.2.2 y se inyectó 1 $\mu$ L del extracto de desorción obtenido al CG-EM. La figura 12 muestra el cromatograma iónico total del análisis, donde se muestra el pico correspondiente al modafinilo en modo SCAN.



**Figura 12.** Cromatograma iónico total de la extracción de modafinilo (1mg/L) en modo SCAN: 1. modafinilo.

En la figura 13 se muestra el espectro de masas de modafinilo estándar, el cual no presenta el ion molecular. Se observan 3 iones fragmento mayoritarios que corresponden a las relaciones  $m/z$  152, 165 y 167. Sin embargo, se observa

que el patrón de fragmentación muestra tres iones fragmento de mayor abundancia. El pico base correspondiente a 167 m/z pertenece al ion difenilmetinilo, seguido del ion fragmento a 165 y 152 m/z.



**Figura 13.** Espectro de Masas de modafinilo estándar: extracción a 1mg/L.

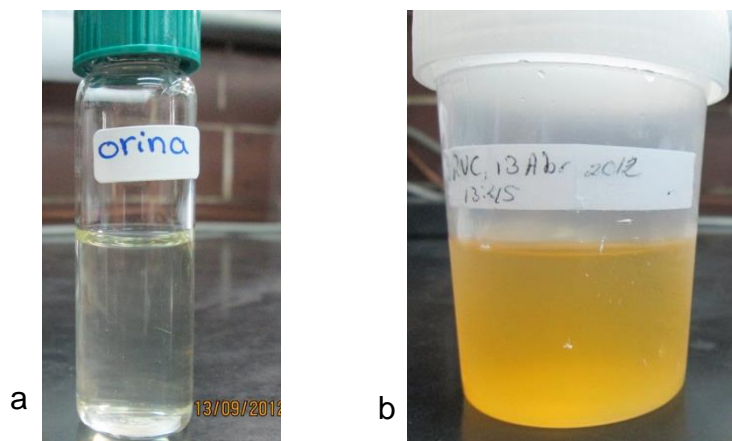
## 3. 2. Metodología en orina

### 3.2.1. Características macroscópicas del blanco de orina

EL volumen de orina recolectada fueron 400mL, presentó una coloración amarillo claro y no se observó turbidez ni sedimentación (Figura 14a).

### 3.2.2. Características macroscópicas de la muestra de orina del voluntario

El volumen de orina recolectada fue 100mL, presentó una coloración amarillo naranja, se observó turbia y con sedimentos (Figura 14b).

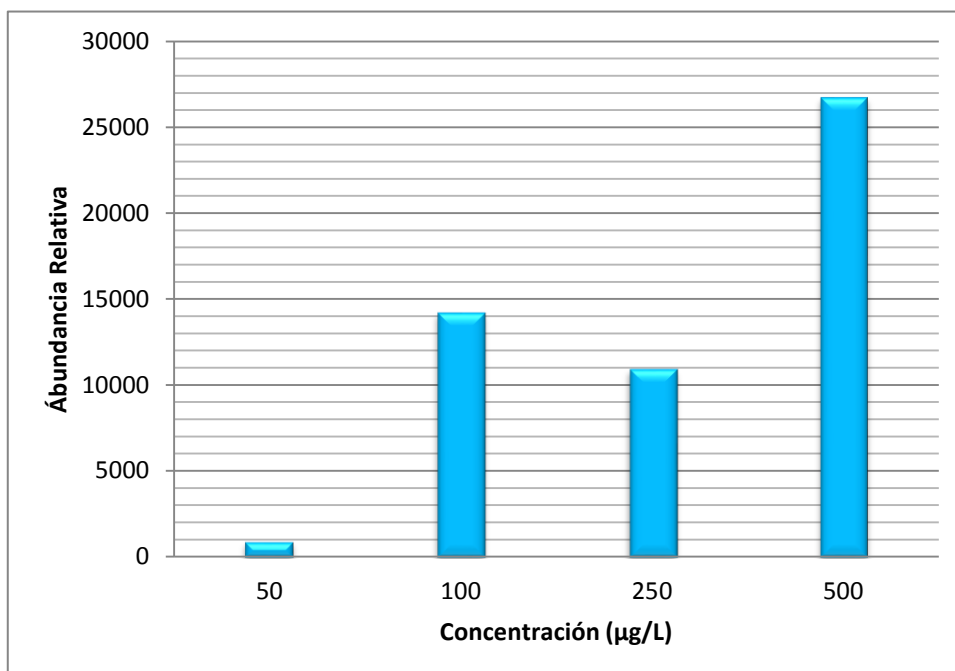


**Figura 14.** Muestras: (a), orina blanco (b), orina con modafinilo,

### 3.2.3. Optimización de la metodología para el análisis de orina

#### a. Límite de detección experimental

Se evaluaron los niveles de concentración de 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{g/L}$ . A continuación se muestra el área de cada nivel de concentración.



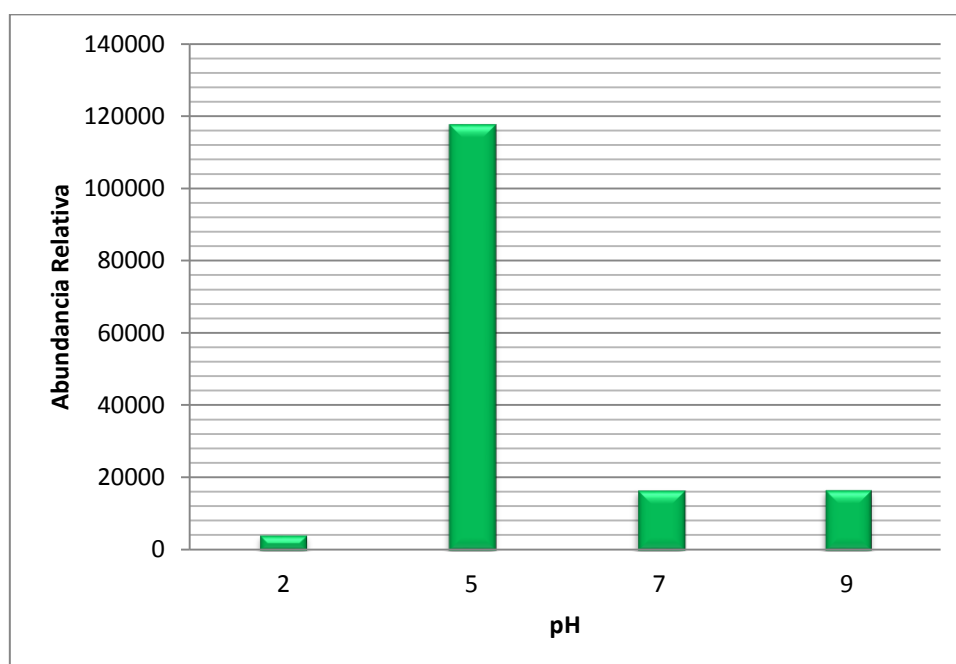
**Figura 15.** Respuesta obtenida a diferentes concentraciones de modafinilo.

En la figura 15 se observó que a 50  $\mu\text{g/L}$  se tuvo un valor de área muy pequeño, lo cual condicionaba su detección. Al realizar la repetición no se obtuvo ninguna respuesta en términos de área. La extracción a 100  $\mu\text{g/L}$  mostró gran variabilidad, escasa repetibilidad y la detección también estuvo condicionada. La incertidumbre asociada al valor de 100  $\mu\text{g/L}$  fue muy grande y no repetible.

Se seleccionó la concentración de 250  $\mu\text{g/L}$  como valor mínimo de concentración detectable y preciso. Esta concentración fue la utilizada para la optimización de la metodología.

#### b. pH del medio de extracción

El pH del medio de extracción se evaluó a 4 valores de pH (pH=2, 5, 7 y 9), utilizando una disolución a 250  $\mu\text{g/L}$ . En la figura 16 se muestra la comparación de áreas para cada extracción a diferente pH.



**Figura 16.** Optimización del pH de extracción para la metodología en orina.

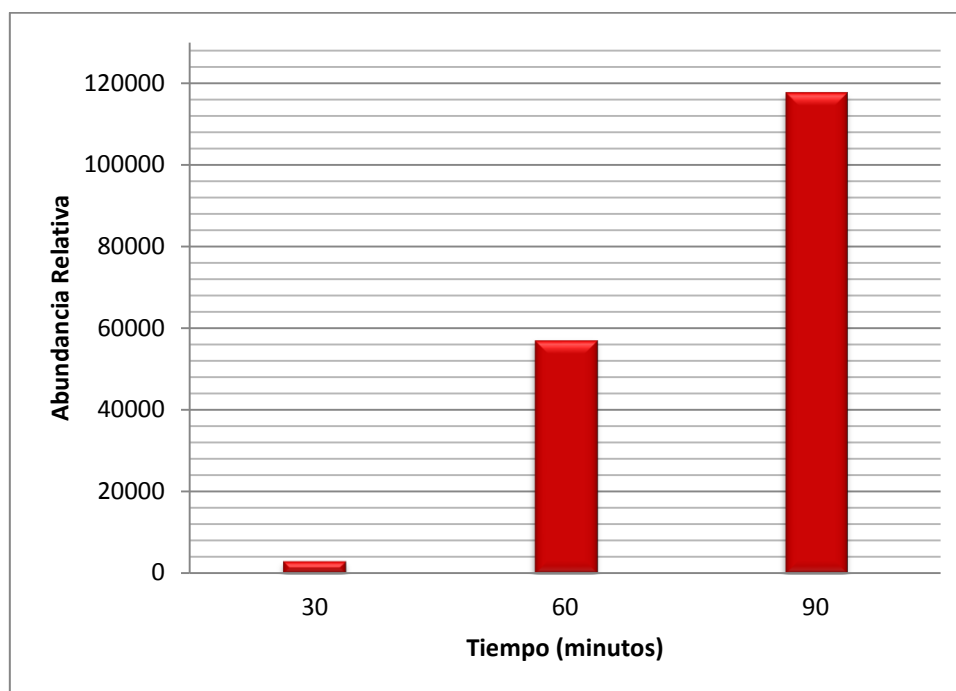
En la figura 16 se observa que a pH=5 la extracción de modafinilo fue máxima. Probablemente la molécula se encuentre en un arreglo estructural que facilite su afinidad hacia la fase extractante. Por otro lado, existe la probabilidad de

que la composición del medio en conjunto con la acidez propicien de forma sinérgica la distribución del modafinilo hacia la fase extractante.

La orina contiene compuestos orgánicos como urea, creatinina, ácido úrico, ácido hipúrico; los compuestos inorgánicos mayoritarios son cloruro de sodio, sulfatos, fosfatos y amonio <sup>38</sup>. A pesar de que el modafinilo tiene un pKa elevado (11.15: dato experimental), probablemente a pH=5 la viscosidad del medio aumente la distribución y cinética de extracción.

### c. Tiempo de extracción

El tiempo de extracción se realizó a 30, 60 y 90 min con una disolución a 250 µg/L y pH 5. La figura 17 muestra el perfil de extracción obtenido.



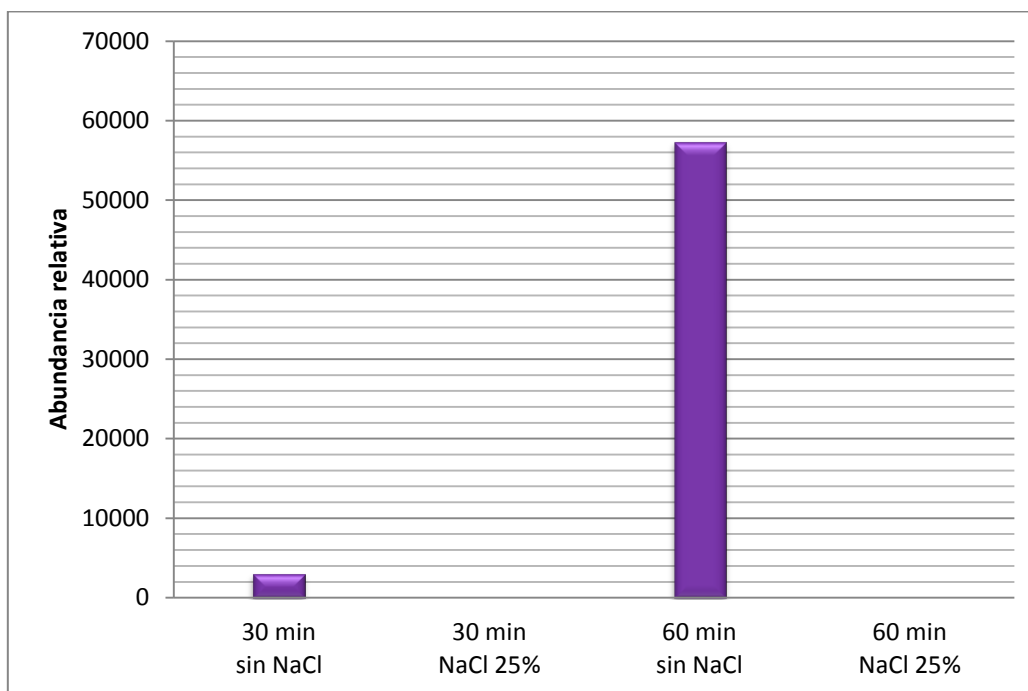
**Figura 17.** Optimización del tiempo de extracción.

En el gráfico se observa la tendencia que presentó la extracción de modafinilo en orina con respecto al tiempo. Al incrementar el tiempo de extracción, la respuesta del analito fue mayor. Se eligió como tiempo de extracción 60 min, debido a la precisión del análisis, aún cuando no se alcanzó una respuesta máxima del analito.



#### d. Adición de sal

Utilizando los parámetros optimizados se estudio la extracción a 30 y 60 minutos, en presencia y ausencia de NaCl al 25%. Como se observa en la figura 18, la extracción no se favoreció con adición de NaCl, no observándose señales en el cromatograma.



**Figura 18.** Optimización con adición de sal para 30 y 60 minutos con adición y sin adición de NaCl.

La adición de sal probablemente no favoreció la extracción de modafinilo debido al aumento de densidad del medio extractante o a la interferencia iónica debido a los iones que rodeen al modafinilo.

#### 3.2.4. Metodología seleccionada para la extracción en orina

Como se mostró en la sección anterior, los parámetros optimizados para una extracción más eficiente fueron: a 60 min de extracción, pH=5 y sin adición de NaCl. Por lo tanto esta metodología se utilizó para la identificación y cuantificación de modafinilo en orina.

### 3.2.5. Validación del método de SBSE en orina

#### a. Linealidad

Con los parámetros optimizados, se evaluó la linealidad del método en orina fortificada, obteniéndose un coeficiente de correlación de  $(r) > 0.997$ . La metodología presenta tendencia lineal para los intervalos de concentración estudiados, Ver anexo II.

#### b. Precisión

La precisión se evaluó a cinco niveles de concentración. Se realizaron extracciones por triplicado para cada concentración estudiada. La tabla 7 muestra los niveles de concentración evaluados, la desviación estándar obtenida y el coeficiente de variación respectivamente.

**Tabla 7.** Precisión ( $n=3$ ).

Concentración (mg/L)	DE (mg/L)	CV (%)
0.25	0.022	6.9
0.5	0.034	6.5
1.0	0.103	11.6
2.0	0.068	3.4
2.5	0.156	6.1

Se obtuvieron coeficientes menores a 12% para todos los puntos de concentración de la curva de calibración estudiados, lo que indica que la metodología en la orina es precisa para el intervalo estudiado.

Los límites de detección y de cuantificación se determinaron con la desviación estándar de las extracciones de 0.25 y 0.5mg/L, los resultados se muestran en la tabla 8. Se observó que el límite de detección calculado a partir de la desviación estándar de 0.25mg/L fue 0.065 mg/L y el límite de cuantificación 0.216 mg/L.

**Tabla 8.** Límite de detección y límite de cuantificación (n=3).

Concentración (mg/L)	DE (mg/L)	CV (%)	LD (mg/L)	LC (mg/L)
<b>0.25</b>	0.022	6.9	0.065	0.216
<b>0.5</b>	0.034	6.5	0.101	0.335

**c. Exactitud**

El recobro relativo se obtuvo con las extracciones para cada concentración (n=3) y se calculó el porcentaje de recobro mediante la ecuación de la curva de calibración en orina (anexo II).

**Tabla 9.** Recobro relativo del método en orina (n=3).

Concentración (mg/L)	% Recobro
<b>0.25</b>	124.6
<b>0.5</b>	102.8
<b>1.0</b>	89.3
<b>2.0</b>	99.4
<b>2.5</b>	101.7

La tabla 9 indica que a menores concentraciones del analito, el porcentaje de recobro es mayor. El incremento de concentración puede promover una cinética de distribución menor, sin embargo, es necesario verificar esta afirmación, ya que a 0.25mg/L nuevamente se observa un mayor recobro. El recobro relativo de modafinilo presentó un intervalo entre 89.3% y 124.6%, mostrando eficiencia para el intervalo de concentraciones utilizadas, con un CV<12.0%.

En la tabla 10 se presentan los porcentajes de recobro calculados mediante la ecuación de la curva de calibración en agua. Con el objetivo de observar la influencia de la matriz en el recobro.

**Tabla 10.** Recobro relativo del método en agua (n=3).

Concentración (mg/L)	% Recobro
0.25	110.2
0.5	83.7
1.0	75.1
2.0	76.8
2.5	76.0

Se observa nuevamente que el porcentaje de recobro es mayor a concentraciones menores. Sin embargo, los recobros calculado con respecto a agua desintonizada son menores a los recobros calculados con orina fortificada. Con lo anterior, se puede afirmar que la composición de la matriz influye positivamente en la distribución del analito hacia la fase extractante.

La tabla 11 muestra la comparación de las rectas de calibración en orina y agua desionizada. El análisis de modafinilo en orina muestra mayor sensibilidad, observándose que la pendiente presenta mayor respuesta con respecto al cambio de concentración, sin embargo, el valor de la pendiente se encuentra en el mismo orden de magnitud que la pendiente de la calibración en agua desionizada.

**Tabla 11.** Ecuaciones de las curvas de calibración.

Curva de calibración	Ecuación de la recta
En orina	167849x-24737
En agua	123312x-16112

Mediante la ecuación de la curva de calibración en acetonitrilo sin SBSE se obtuvo el recobro absoluto del método. Se calculó el porcentaje de recobro para cada concentración como se muestra en la tabla 12.

**Tabla 12.** *Recobro absoluto del método (n=3).*

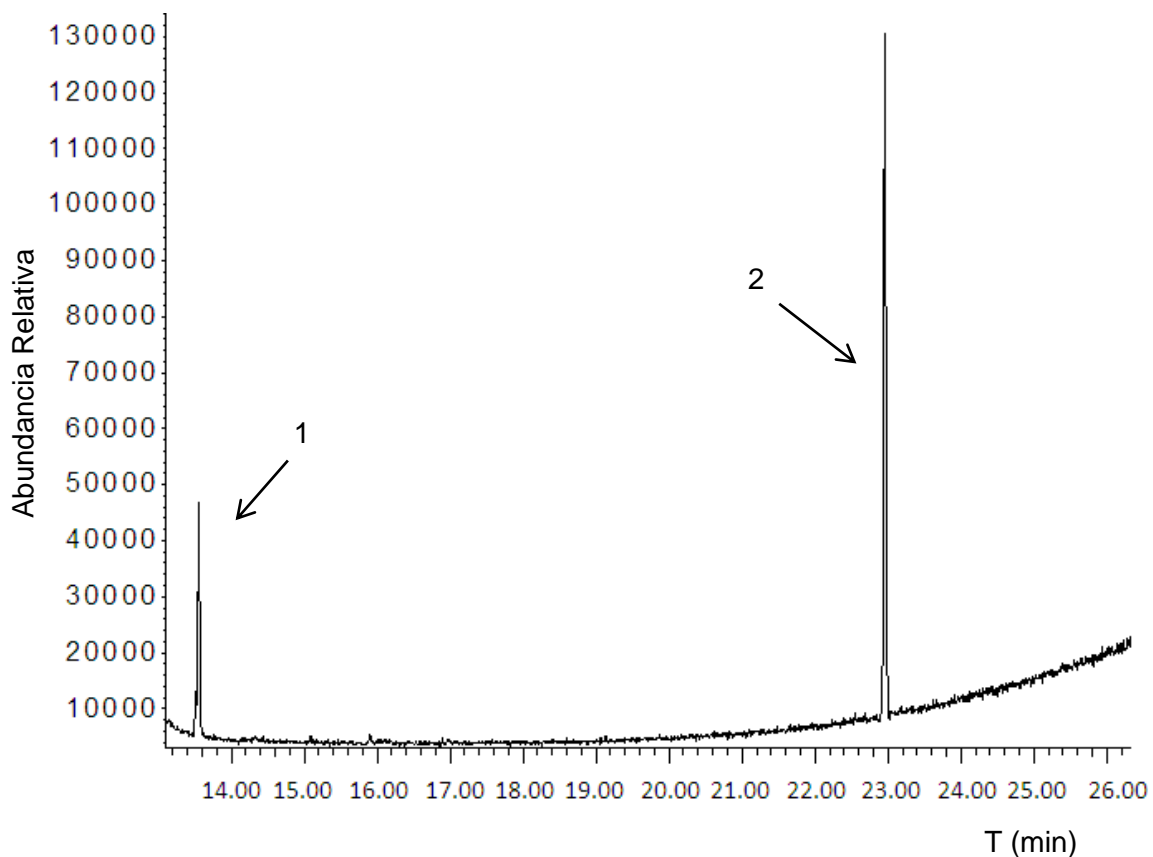
<b>Concentración (mg/L)</b>	<b>% Recobro</b>
<b>0.25</b>	2.1
<b>0.5</b>	13.5
<b>1.0</b>	18.4
<b>2.0</b>	26.1
<b>2.5</b>	27.7

Se obtuvo un porcentaje de recuperación de 2.1% para la concentración más baja (0.25 mg/L) y 27.7% para la concentración más alta (2.5 mg/L). El recobro absoluto del método presentó un intervalo entre 2.1% y 27.7% en las concentraciones estudiadas.

### **3.2.6. Análisis cualitativo de modafinilo en orina del voluntario**

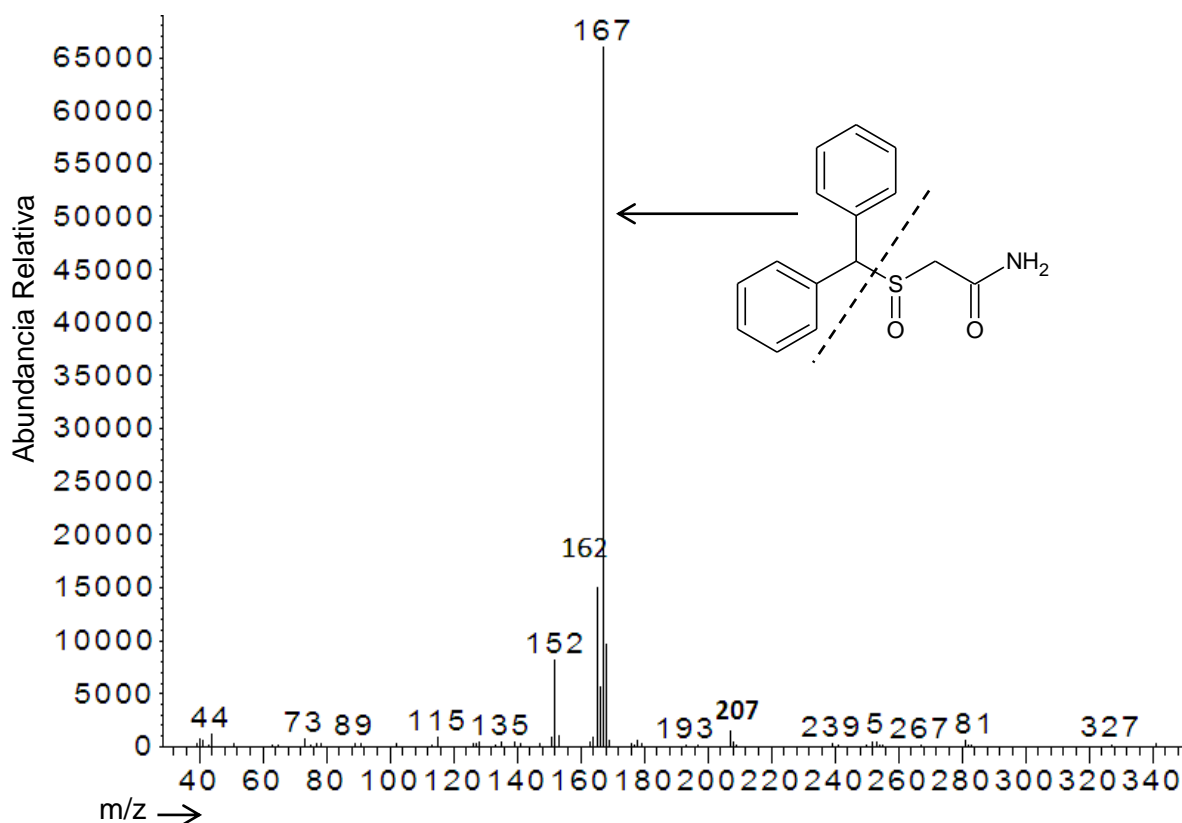
#### **a. Identificación de modafinilo en orina del voluntario**

Se realizó la extracción con la metodología optimizada para la determinación de modafinilo en orina (sección 2.2.5.1.). La Figura 19 muestra el cromatograma iónico total de la extracción realizada en la orina.



**Figura 19.** Cromatograma iónico total de la muestra de orina del voluntario: 1 y 2, corresponden al modafinilo.

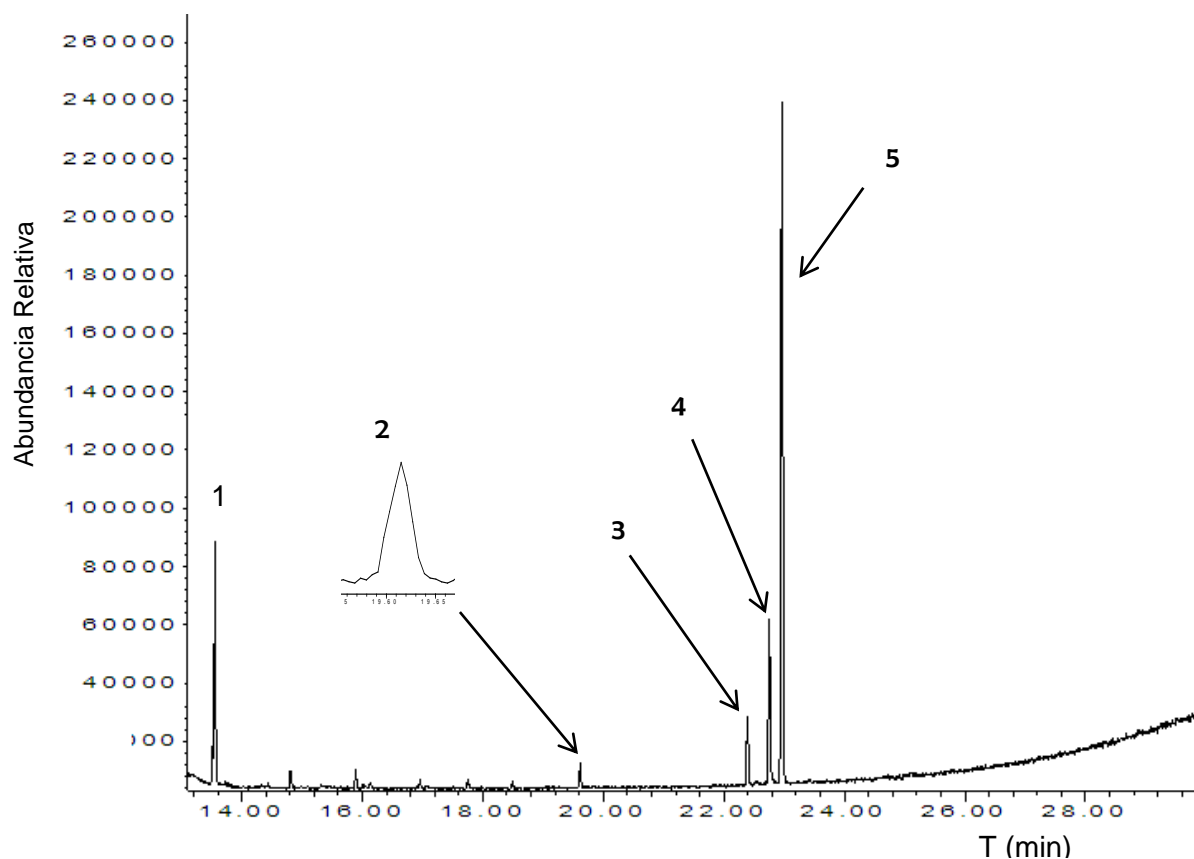
En la figura anterior, se observan dos picos en el cromatograma, éstos corresponden al modafinilo. La figura 20 muestra el espectro de masas del pico 2, donde se observan los iones fragmento característicos del fármaco (152, 165 y 167m/z).



**Figura 20.** Espectro de masas correspondiente al pico 2 de modafinilo.

#### b. Identificación de metabolitos en la orina del voluntario

Se utilizó la metodología descrita en la sección 2.2.5.1, para la hidrólisis de los conjugados proteínicos de modafinilo en orina, observándose el pico correspondiente al modafinilo y algunos otros picos que corresponden a grupos esteroideos derivados de la androsterona. Se utilizó la enzima  $\beta$ -glucorinidasa con la finalidad de observar modafinilo libre. En la figura 21 se muestra el cromatograma iónico total de la muestra de orina hidrolizada.



**Figura 21.** Cromatograma iónico total de la muestra de orina hidrolizada. 1 y 5: son pertenecientes a la fragmentación del modafinilo; 2:  $5\alpha$ -Androst-16-en- $3\beta$ -ol, 3: Etiocolanona y 4: Androsterona.

En el cromatograma iónico total se identifican dos picos característicos de modafinilo, algunos otros picos (2,3 y 4) se identificaron según la Biblioteca de espectros de Masas del NIST como intermediarios o metabolitos de la síntesis de andrógenos, que normalmente se encuentran en la orina. Sin embargo, los picos de menor abundancia presentan fragmentaciones que dan como resultado los grupos benzoicos del modafinilo, aunque no se confirmó si son provenientes de los metabolitos o si sólo son resultado de la hidrólisis de modafinilo libre.



**3.2.7. Análisis cuantitativo de modafinilo en orina del voluntario**

El análisis cuantitativo en la muestra de orina con modafinilo, se realizó con el procedimiento indicado en la sección 2.2.5.1. El análisis se realizó por monitoreo selectivo de iones

En la tabla 13 se señala la concentración de modafinilo en la muestra de orina (n=3).

**Tabla 13.** Concentración de modafinilo en la muestra de orina

Concentración mg/mL (n=3)	DE (mg/mL)	CV (%)
2.35	0.064	2.74

La concentración de modafinilo en la muestra del voluntario, a las 24 horas posteriores al consumo de medicamento.

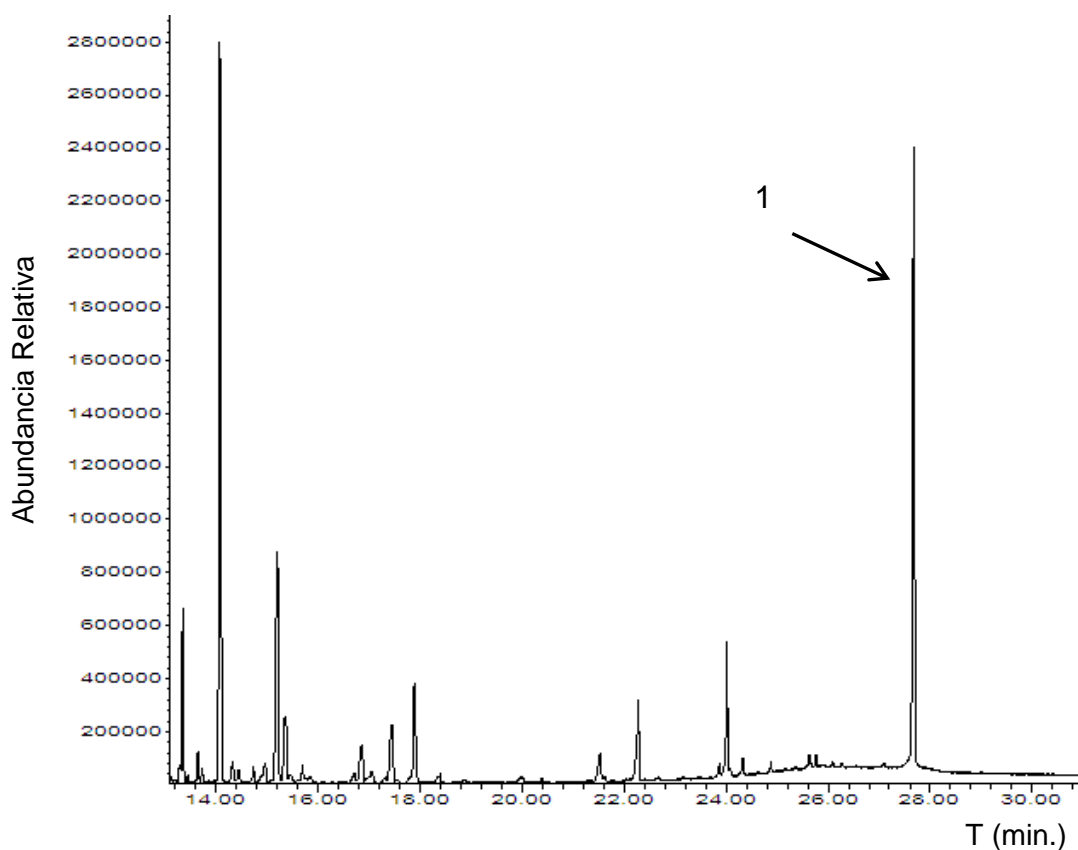
### 3.3. Resultados de la metodología en tabletas

#### 3.3.1. Optimización de la SBSE en tabletas

La optimización de la metodología de modafinilo en tabletas se encuentra descrita en la sección 2.2.3.2. Debido a los compuestos de orina, se realizó una derivatización utilizando MTBSTFA en tabletas donde fueron menores las interferencias para decidir si la derivatización aplicaría ambas metodologías. No se estudió el efecto de adición de sal en la metodología de tabletas.

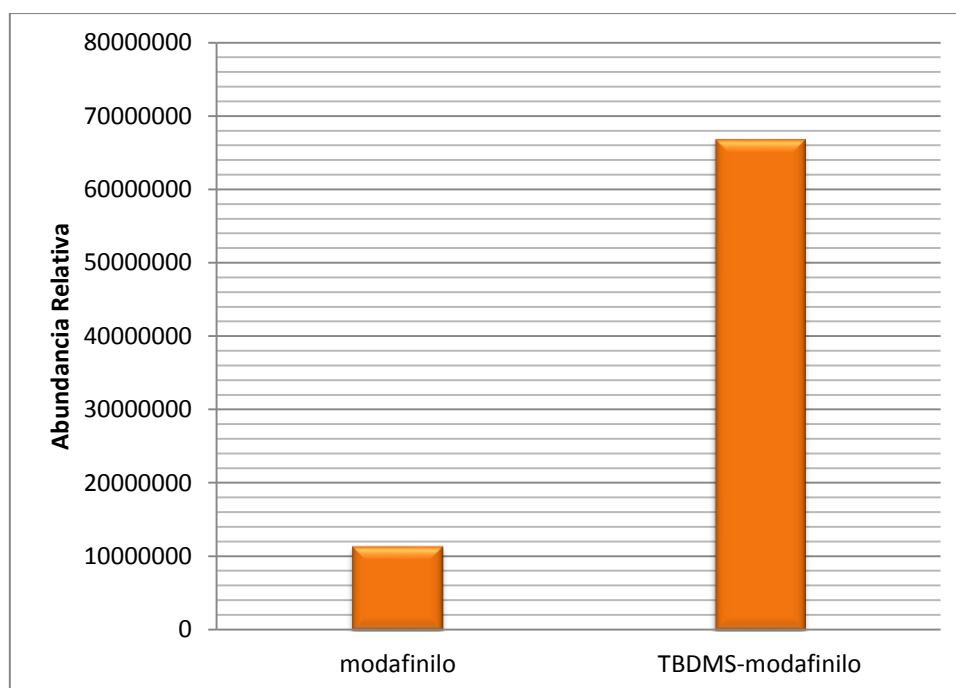
#### a. Derivatización

Se realizó un análisis de modafinilo en tabletas con y sin derivatización utilizando N,N-terbutidimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida. Los cromatogramas obtenidos se compararon y se extendió una alternativa de análisis utilizando un agente derivatizante. La figura 22 muestra el cromatograma iónico total obtenido de la derivatización.



**Figura 22.** Cromatograma iónico total de la muestra derivatizada (TBDMS-modafinilo).  
El pico 1 refiere al derivado con los iones característicos de modafinilo.

El análisis de modafinilo en tabletas utilizando derivatización se muestra en la figura 22. Se observó mayor número de picos cromatográficos utilizando derivatización, por lo tanto, se decidió no utilizar este procedimiento en la metodología. Se propuso la derivatización de modafinilo en tabletas porque se conocía la mezcla de excipientes de la misma. No se realizó derivatización en orina para evitar la obtención de derivados interferentes sobre el analito de interés.

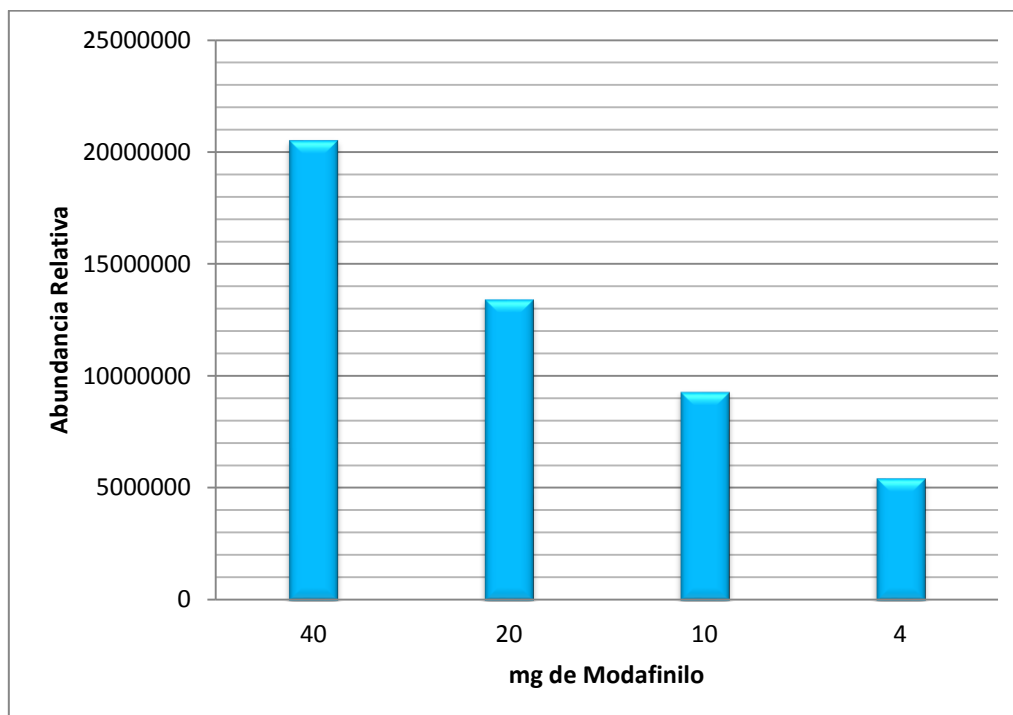


**Figura 23.** Respuesta de una muestra sin derivatizar y una muestra derivatizada.

La figura 22 muestra la comparación de las áreas obtenidas para el análisis de modafinilo en tabletas con y sin derivatización. El derivado TBDMS mostró mayor respuesta, debido a que la derivatización incrementa la sensibilidad del método. Se decidió no utilizar la derivatización porque implica un paso adicional en la metodología y un parámetro con incertidumbre asociada. La derivatización implica optimización de los parámetros de reacción como tiempo, disolvente y temperatura de reacción, cantidad y tipo de agente derivatizante. Se concluyó que la respuesta de modafinilo sin derivatizar es aceptable y reproducible.

**b. Límite de detección experimental**

Se determinó la cantidad mínima detectable para la identificación y cuantificación de modafinilo en tableta, en la figura 24 se compararon las áreas para las diferentes cantidades de muestra.

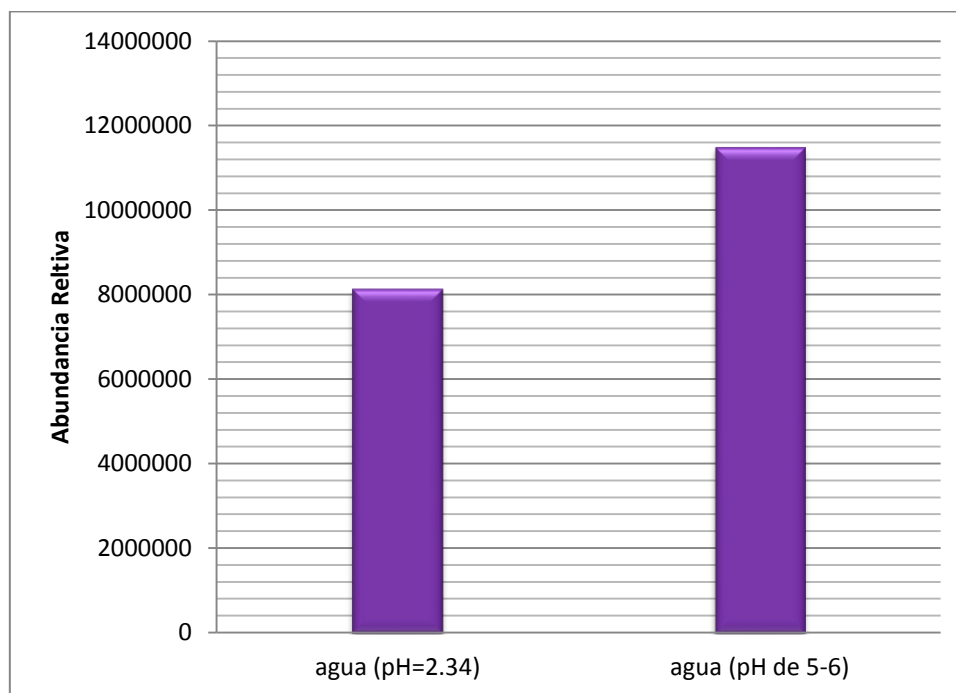


**Figura 24.** Comparación de respuesta para cada concentración.

Se decidió utilizar 10mg de polvo de tabletas (equivalente a 4mg de Modafinilo), ya que corresponde a la cantidad mínima de sólido que se puede pesar analíticamente.

### c. Medio de extracción

La optimización del medio de extracción se realizó con agua pH=2.34 y agua desionizada (pH=5-6). En la figura 25 se muestran los resultados.



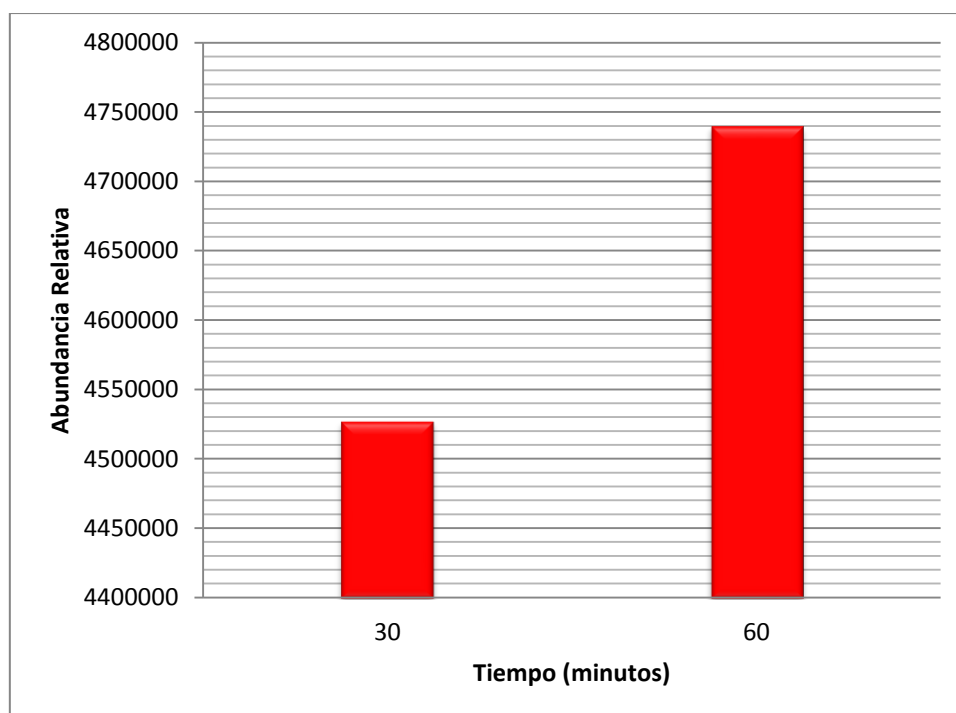
**Figura 25.** Comparación de respuesta para agua acidulada y en agua desionizada.

Se observó mayor extracción de modafinilo en agua desionizada, con respecto a la extracción en agua ácida pH = 2.34. Probablemente, la extracción de modafinilo fue mayor en agua desionizada debido a que la fuerza iónica es menor que en agua ácida. El efecto de los iones hidronio puede impedir la migración del analito hacia la fase extractante.

#### d. Tiempo de extracción

En la figura 26 se muestran los resultados obtenidos para el estudio del tiempo de extracción.

Se observó que la extracción de modafinilo es mayor al aumentar el tiempo de extracción. Sin embargo, se eligió 30 min como tiempo de extracción al obtener una respuesta altamente sensible, reproducible y menor tiempo de análisis.



**Figura 26.** Optimización del tiempo de extracción

No se plantearon mayores tiempos de extracción, porque la concentración de modafinilo en tabletas es muy elevada.

#### 3.3.2. Metodología seleccionada para la extracción en tabletas

La extracción con barra magnética optimizada en tabletas fue: 10mg de polvo de tableta, agua desionizada, sin derivatización, extracción durante 30 min a 500rpm y desorción con 500 $\mu$ L de AcCN durante 30 min a 400rpm.

### 3.3.3. Validación del método de SBSE en tabletas

#### a. Linealidad

Se evaluó la linealidad del método por medio de la curva de calibración de modafinilo en agua; obteniendo un coeficiente de correlación de  $(r) > 0.998$ . Lo cual establece que la metodología presenta linealidad aceptable en el intervalo de concentración estudiado, ver anexo II.

#### b. Precisión

La precisión se evaluó para diferentes concentraciones como se muestra en la tabla 14. El análisis de cada concentración se realizó por triplicado.

**Tabla 14.** Precisión ( $n=3$ ).

Concentración (mg/L)	DE (mg/L)	CV (%)
0.25	0.012	3.9
0.5	0.038	7.6
1.0	0.005	0.6
2.0	0.095	4.9
2.5	0.101	4.0

El coeficiente de variación obtenido en el estudio de precisión es menor al 8%. La metodología es precisa dentro del intervalo de concentración estudiada.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se determinaron con la desviación estándar de la extracción a 0.25 y 0.5mg/L (ver tabla 15).

**Tabla 15.** Límite de detección y límite de cuantificación ( $n=3$ ).

Concentración (mg/L)	DE (mg/L)	CV (%)	LD (mg/L)	LC (mg/L)
0.25	0.012	3.9	0.035	0.118
0.5	0.038	7.6	0.113	0.378

**c. Exactitud**

El recobro relativo se obtuvo con las extracciones para cada concentración (n=3) y se calculó el porcentaje de recobro mediante la ecuación de la curva de calibración en agua (anexo II). La tabla 16 muestra los porcentajes de recobro los niveles de concentración estudiados para la curva de calibración en agua.

**Tabla 16.** Recobro del método en agua (n=3)

<b>Concentración (mg/L)</b>	<b>% Recobro</b>
<b>0.25</b>	120.8
<b>0.5</b>	99.1
<b>1.0</b>	94.5
<b>2.0</b>	97.4
<b>2.5</b>	102.4

Se observó que a menor concentración del analito, el porcentaje de recobro fue mayor. Probablemente el aumento de concentración de modafinilo condiciona la distribución debido a que la SBSE no es una técnica de preparación de muestra exhaustiva. El recobro de modafinilo en agua presentó un intervalo entre 94.5% y 120.8%, para el intervalo de concentración utilizado.

Utilizando la ecuación de la recta en AcCN sin SBSE se obtuvo el recobro absoluto del método. Se calculó el porcentaje de recobro para cada concentración como se muestra en la tabla 17.

**Tabla 17.** Recobro absoluto del método (n=3).

<b>Concentración (mg/L)</b>	<b>% Recobro</b>
<b>0.25</b>	<7.5
<b>0.5</b>	7.5
<b>1.0</b>	13.9
<b>2.0</b>	18.3
<b>2.5</b>	20.2

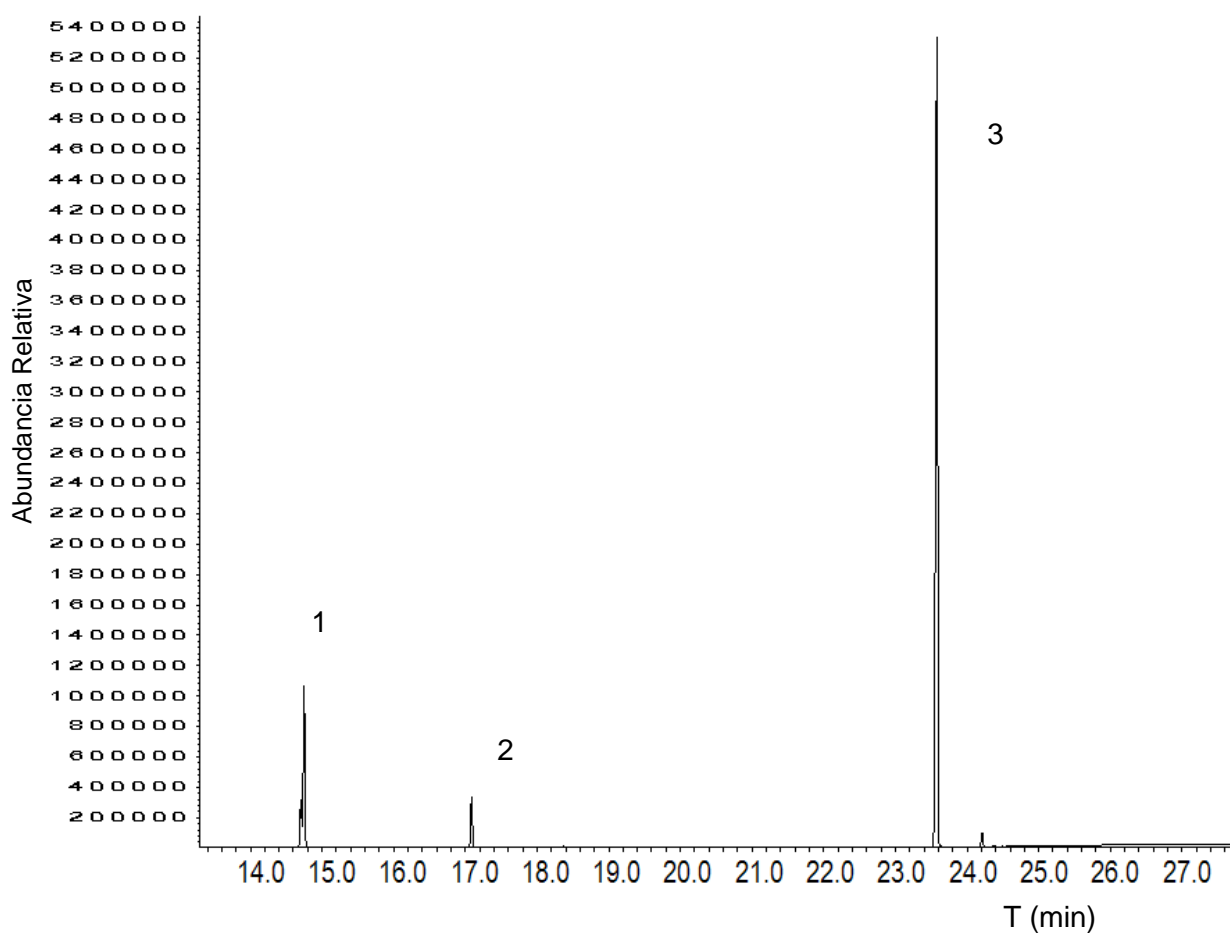


Se observa en los resultados que la extracción con barra magnética tiene recobros absolutos <21%, lo cual muestra que la técnica de SBSE no es exhaustiva.

### 3.3.4. Análisis cualitativo de modafinilo en tabletas

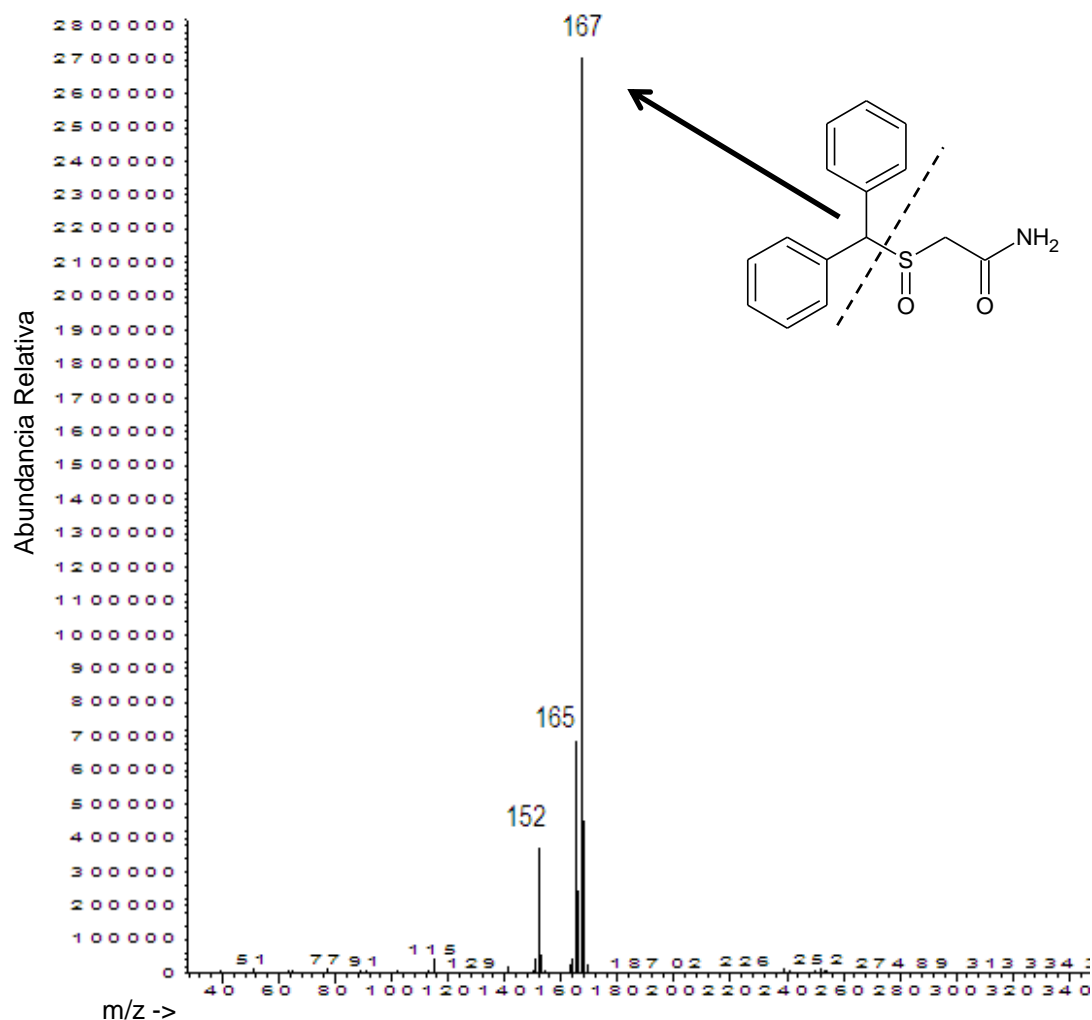
#### a. Identificación de modafinilo en tabletas

La Figura 27 muestra el cromatograma iónico de la extracción realizada en tabletas.



**Figura 27.** Cromatograma iónico total de la extracción en tableta, el pico 3 es el modafinilo. Los picos 1 y 2 son los 2 anillos aromáticos de modafinilo.

La figura 28 muestra el espectro de masas del modafinilo (pico 3) con los iones fragmento característicos (167, 165 y 152m/z). Para descartar la procedencia de los picos 1 y 2 de los excipientes, se realizó una extracción utilizando la mezcla de excipientes libre de modafinilo.

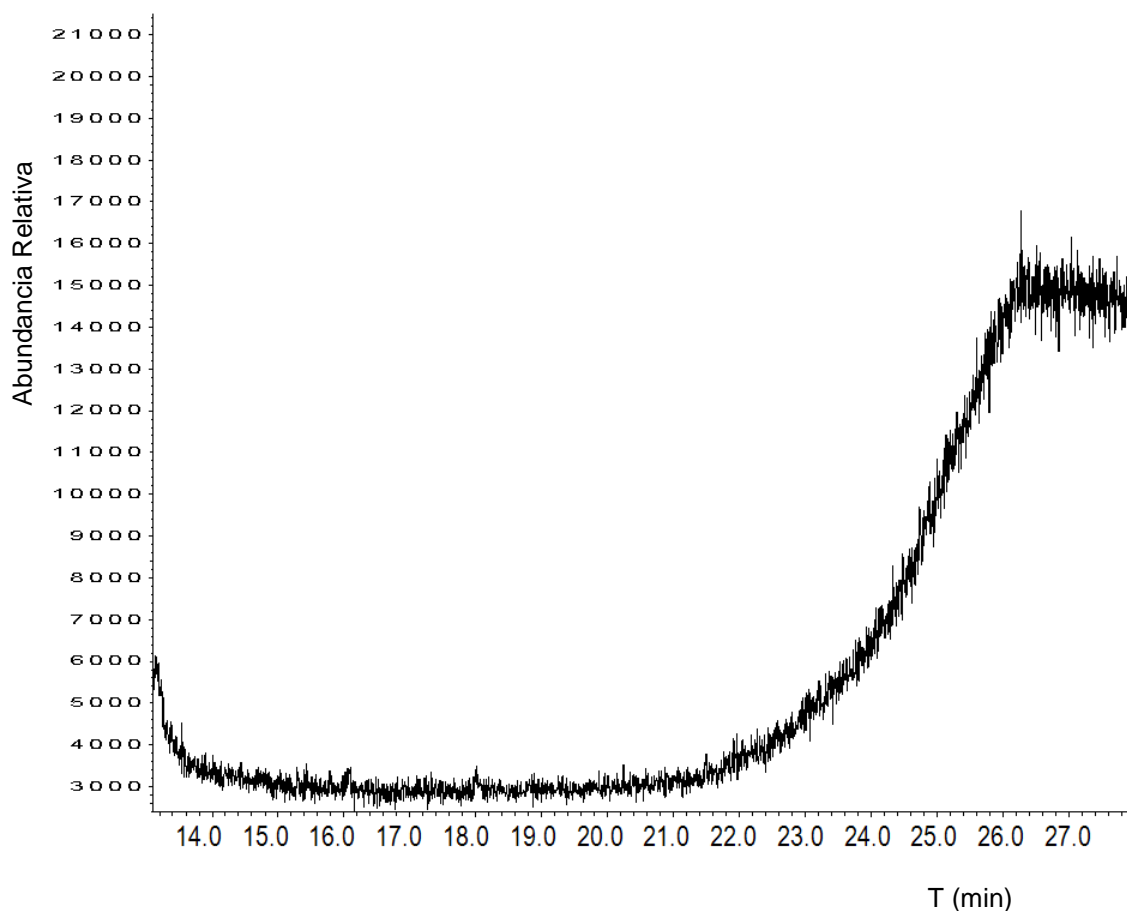


**Figura 28.** Espectro de masas de la SBSE de tabletas. Pico 1: modafinilo.

#### b. Estudio de la posible interacción de excipientes de las tabletas

La mezcla de excipientes fue utilizada para la extracción en los porcentajes presentados anteriormente. En la figura 29 se muestra el cromatograma iónico total de la extracción con excipientes, observándose la ausencia de picos cromatográficos. Esto se debió a que los excipientes son compuestos orgánicos de alta masa molecular. Los excipientes utilizados en la industria farmacéutica son eliminados cuando son sometidos a centrifugación debido a

que la fuerza centrípeta es dependiente de la masa los compuestos de gran tamaño molecular precipitan en el tubo de ensaye.



**Figura 29.** Cromatograma iónico total de la extracción a los excipientes.

La tabla 18 muestra las propiedades físicas de los excipientes utilizados. Se observa que la mayoría de ellos tienen masa molecular elevada; la celulosa microcristalina, almidón, croscarmelosa sódica y povidona. Los excipientes de baja masa molecular como la lactosa monohidratada y el estearato de magnesio, son poco solubles o insolubles en agua. Debido a esto los excipientes no son extraídos por la barra magnética.

**Tabla 18. Propiedades físicas<sup>39</sup> de excipientes.**

<b>Excipiente</b>	<b>Fórmula</b>	<b>MM</b>	<b>Solubilidad</b>
<b>Celulosa microcristalina</b>	$(C_6H_{10}O_5)_n$ Donde $n \approx 220$	$\approx 3600$	Ligeramente soluble en disoluciones de hidróxido de sodio 5% m/v. Prácticamente insoluble en agua, ácidos diluidos y la mayoría de disolventes orgánicos.
<b>Lactosa monohidratada</b>	$C_{12}H_{22}O_{11}$ *H <sub>2</sub> O	360.31	Prácticamente insoluble en cloroformo, etanol y éter. Solubilidad en agua una parte por 5.24
<b>Almidón</b>	$(C_6H_{10}O_5)_n$ Donde $n = 300-1000$	50-500 millones	Prácticamente insoluble en etanol frío (96%) y agua fría. El almidón se hace soluble en agua caliente por arriba de la temperatura de gelatinización. Parcialmente soluble en dimetilsulfóxido y dimetilformamida.
<b>Croscarmelosa sódica</b>	$(C_8H_{16}NaO_8)_n$	263.19 $n=1$	Insoluble en agua, aunque la croscarmelosa sódica se expande rápidamente de 4 a 8 veces su volumen original en contacto con el agua. Prácticamente insoluble en acetona, etanol y tolueno.
<b>Povidona (polivinilpirrolidona)</b>	$(C_6H_9NO)_n$	2500-3000000	Ligeramente soluble en ácidos, cloroformo, etanol (95%), cetonas, metanol y agua. Prácticamente insoluble en éter, hidrocarburos y aceites minerales. En agua la concentración de la disolución está limitada solamente por la viscosidad de la disolución resultante.
<b>Estearato de Magnesio</b>	$C_{36}H_{70}MgO_4$	591.24	Prácticamente insoluble en éter, agua y etanol (95%), sin embargo, es ligeramente soluble en etanol caliente (95%) y benceno
<b>Povidona (polivinilpirrolidona)</b>	$(C_6H_9NO)_n$	2500-3000000	Ligeramente soluble en ácidos, cloroformo, etanol (95%), cetonas, metanol y agua. Prácticamente insoluble en éter, hidrocarburos y aceites minerales. En agua la concentración de la disolución está limitada solamente por la viscosidad de la disolución resultante.
<b>Estearato de Magnesio</b>	$C_{36}H_{70}MgO_4$	591.24	Prácticamente insoluble en éter, agua y etanol (95%), sin embargo, es ligeramente soluble en etanol caliente (95%) y benceno

### **3.3.5. Análisis cuantitativo de modafinilo en tabletas**

La cuantificación de la muestra se realizó con la metodología optimizada (sección 2.2.5.2), utilizando las tabletas de Modiodal de 200mg. El análisis efectuó en modo SIM, obteniéndose la respuesta en área y se calculó la concentración de modafinilo con la recta de calibración en agua desionizada. El análisis de tabletas se realizó por triplicado y se obtuvo un valor promedio de concentración para el modafinilo (147.2 mg/tableta, una desviación estándar de  $\pm 14.7$  mg/tableta y un coeficiente de variación de 10.0%).

La concentración obtenida mediante SBSE-CG.EM representa el 73.6% de modafinilo por tableta con CV=10.0%.

## Capítulo 4

### CONCLUSIONES

1. Se desarrolló y optimizó un método con extracción por sorción en barra magnética seguida de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (SBSE-CG-EM) para la determinación de modafinilo en orina y tabletas.
2. La metodología desarrollada para orina y tabletas es sencilla rápida, sensible, confiable y de bajo consumo de disolventes.
3. El método para la determinación de modafinilo en orina presenta buena linealidad en el intervalo de concentración estudiado  $R > 0.997$  y  $CV < 12\%$ .
4. La metodología para la determinación de modafinilo en tabletas presenta una buena linealidad en el intervalo de concentración analizado  $R > 0.998$  y  $CV < 8\%$ .
4. Con los parámetros optimizados, el método presentó un límite de detección que permite la identificación a nivel trazas en orina, lo que es útil para las pruebas de anti-doping, con las ventajas de ser un método sencillo, rápido y sensible.
5. Con los parámetros optimizados, el método presentó un límite de detección que permite la determinación de modafinilo a nivel trazas en orina, Por lo que cumple con las características de una prueba de antidopaje.

---

---

## REFERENCIAS

1. WADA. (World Anti-Doping Agency). <http://www.wada-ama.org/>.
2. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Thomson, PLM, 2011. [Online].
3. Michael J Minzenberg, Cameron S Carter. *Modafinil: A Review of Neurochemical Actions and Effects on Cognition*. Neuropsychopharmacology (2007) [Online].
4. WADA. Prohibited List Standar 2012 [http://www.wada\\_ama.org](http://www.wada_ama.org)
5. Erik Baltussen, Pat Sandra, Frank David, Carel Cramers. *Stir Bar Extraction (SBSE, a novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and principles)*. Journal of Microcolumn Separations. Volume 11, Issue 10, pages 737-747, 1999.
6. Frank David, Pat Sandra. *Stir bar sorptive extraction for trace analysis*. Journal of Chromatography A, 1152 (2007) 54-59.
7. A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil. *Stir.bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions*, Chromatography A, 1217 (2010) 2642-2666.
8. Organización Mundial de la Salud. *Medicamentos: uso racional de los medicamentos*. Nota descriptiva N° 338, Mayo 2010. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs338/es/index.html>.
9. Benjamín Ruiz Loyola. *Dopaje: la trampa es para la salud*. Revista ¿Cómo Vés. UNAM. <http://www.comoves.unam.mx/articulos/dopaje.shtml>.
10. CONADE. *Medicina Deportiva: Dopaje*. (2011). <http://www.conade.gob.mx/portal/?id=1706>.
11. Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte. (CONADE). <http://www.conade.gob.mx/portal/?id=1959>.
12. Dräger Safety Hispania, S.A. *Abuso de sustancias y técnicas diagnósticas*. [Online].

13. Alfonso R. Gennaro. *Remington: farmacia*. Ed. Médica Panamericana. 2ª Edición. p.p. 1748-17554.
14. Raminder Kumar. *Approved and Investigational Uses of Modafinil. An Evidence-Based Review*. *Drugs* 2008; 68 (13): 1803-1839.
15. Dr. Roberto Cisneros-Corral. *Efectos de la Anestesia Neuroaxial sobre el Sistema Reticular Activador. ¿Deaferentación o Absorción?. Anestesia en México*. Volumen 18 Número 2 Mayo - Agosto 2006.
16. Sonoma State University. History of Modafinil. Healthy Studyding. <http://www.students.sonoma.edu/users/c/charlest/history-modafinil.html>.
17. Ley General de Salud. Nueva Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de febrero de 1984. Últimas reformas publicadas DOF 07-06-2012. Capítulo IV, Medicamentos en el artículo 226. Consulta septiembre 2012 [Online].
18. Dongsoo Kim. *Practical Use and Risk of Modafinil, a Novel Waking Drug*. *Environmental Health and Toxicology*. Volume: 27, Article ID: e2012007: 7 pages. [Online].
19. YN Wong, D Simcoe, LN Hartman. *Single-dose pharmacokinetics of modafinil and methylphenidate given alone or in combination in healthy male volunteers*. *J Clin Pharmacol* March 1, 1998 38: 276-282. [Online].
20. McKinney Andrew R., Suann Craig J. and Stenhouse Allen M. *The detection of modafinil and its major metabolite in equine urine by liquid chromatography/mass spectrometry*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005; 19: 1217–1220.
21. Armenta S., Garrigues S., de la Guardia M. *Green Analytical Chemistry Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 27, No. 6, 2008.
22. Twister / Stir Bar Sorptive Extraction SBSE. Preparación de muestras. <http://www.gerstel.com/en/twister-stir-bar-sorptive-extraction.htm>.
23. Mullet Wayne M., Kwong Elizabeth. *Stir Bar Sorptive Extraction based on Restricted Access Material for the direct extraction of drug and metabolites in biological fluids*. AppNote 5/2006 - Gerstel GmbH & Co.KG. [Online].



- 
24. V.M. León, B. Álvarez, M.A. Cobollo, S. Muñoz, I. Valor. *Analysis of 35 priority semivolatile compounds in water by stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. Method optimisation.* Journal of Chromatography A, 999 (2003) 91–101.
25. M. Barriada-Pereira, P. Serôdio, M. J. González-Castro, J. M. F. Nogueira. *Determination of organochlorine pesticides in vegetable matrices by stir bar sorptive extraction with liquid desorption and large volume injection–gas chromatography–mass spectrometry towards compliance with European Union directives.* Journal of Chromatography A - J CHROMATOGR A , vol. 1217, no. 1, pp. 119-126, 2010.
26. Elisabete Coelho, et. al. *Quantification approach for assessment of sparkling wine volatiles from different soils, ripening stages, and varieties by stir bar sorptive extraction with liquid desorption.* Analytica Chimica Acta Volume 635, Issue 2, 9 March 2009, Pages 214–221.
27. Regina Helena Costa Queiroz. *Quantification of carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, phenytoin and phenobarbital in plasma samples by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Volume 48, Issue 2, 29 September 2008, Pages 428–434.
28. Skoog D. Nieman, T., Principios de análisis instrumental, Mc Graw Hill, 5ª edición. Madrid, 2001.
29. Prichard E., Stuart B. Practical Laboratory Skills Training Guides: Gas Chromatography. Royal Society of Chemistry, 2003.
30. Harris, D. C. Análisis Químico Cuantitativo, 2ª edición. Reverté S.A. Barcelona, 2001.
31. McNair, H. M. & Miller, J. M. Basic Gas Chromatography, ed. John Wiley & sons Inc, New York, 1998.
32. Barker J., Mass Spectrometry. John Wiley & Sons, 2ª edición, Inglaterra, 1999.
33. Tseng. Y.L., Uralets V., Ling C., Kuo F., *Detection of modafinil in human urine by gas chromatography-mass spectrometry.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 39 (2005) 1042-1045. [Online].
-

34. Provigil. Patient Information.  
[www.provigil.com/media/PDFs/patient\\_info.pdf](http://www.provigil.com/media/PDFs/patient_info.pdf).
35. Modafilo {6228}. Index Merck 14<sup>o</sup> Edition. 2006. pp. 1075-1076.
36. Secretaría de Energía.  
<http://www.sener.gob.mx/webSener/portal/Default.aspx?id=1640>.
37. Morris J. A. *Analytical Profile of Modafinil*. Technical Note.  
Departmental of Justice.
38. Strasinger S., Di Lorenzo M. *Análisis de orina y de los líquidos corporales*. 5<sup>o</sup> edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2008. pp. 31-33.
39. Rowe R., Sheskey P., Quinn M., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6<sup>o</sup> edición. Chicago. 2009.

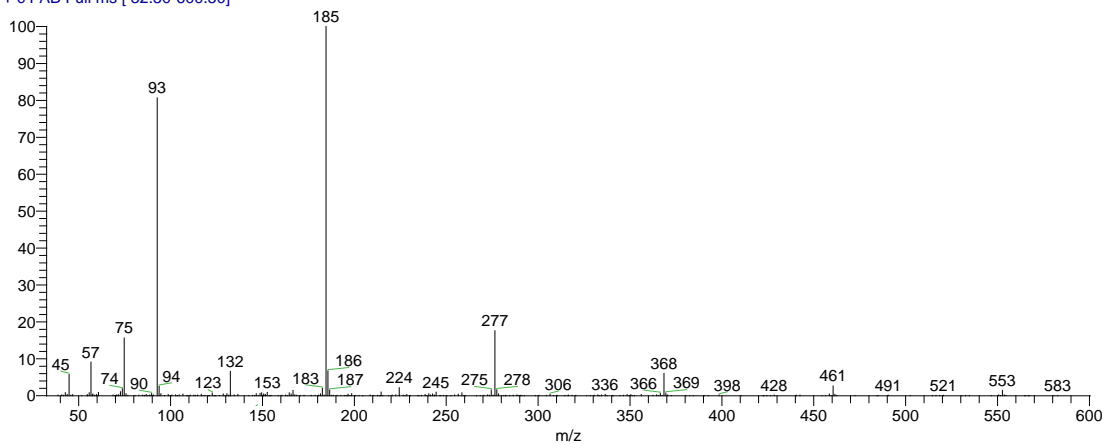
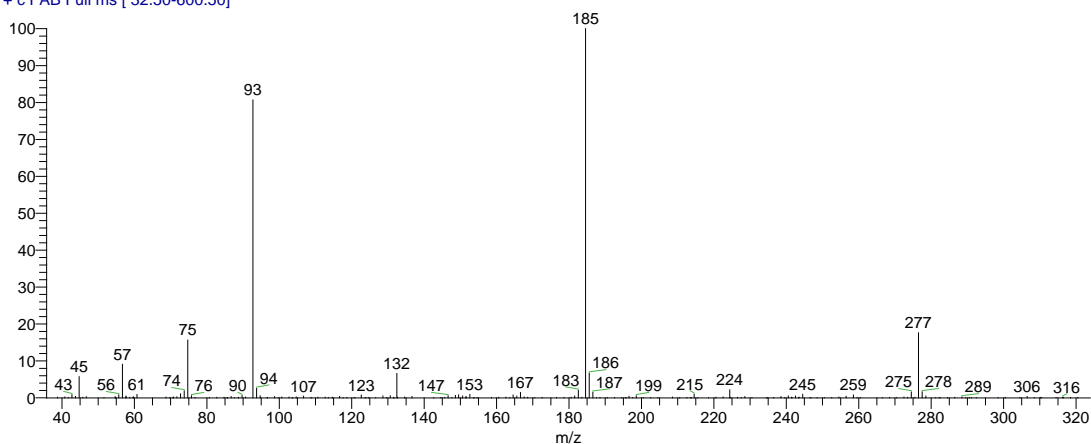
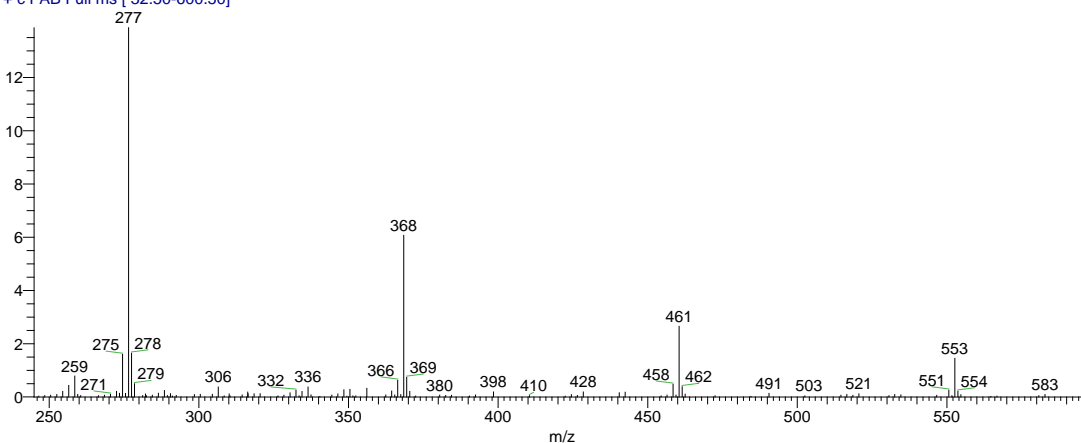
## ANEXO I

## Espectrómetros de masa (FAB). Glicerol.

D:\Xcalibur\data\USA\FAB\glicerol\_3

5/31/2007 3:53:13 PM

GLICEROL

glicerol\_3 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 7.82E6  
T: + c FAB Full ms [ 32.50-600.50]glicerol\_3 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 7.82E6  
T: + c FAB Full ms [ 32.50-600.50]glicerol\_3 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 7.82E6  
T: + c FAB Full ms [ 32.50-600.50]

Espectrómetros de masas (FAB). Modafinilo.

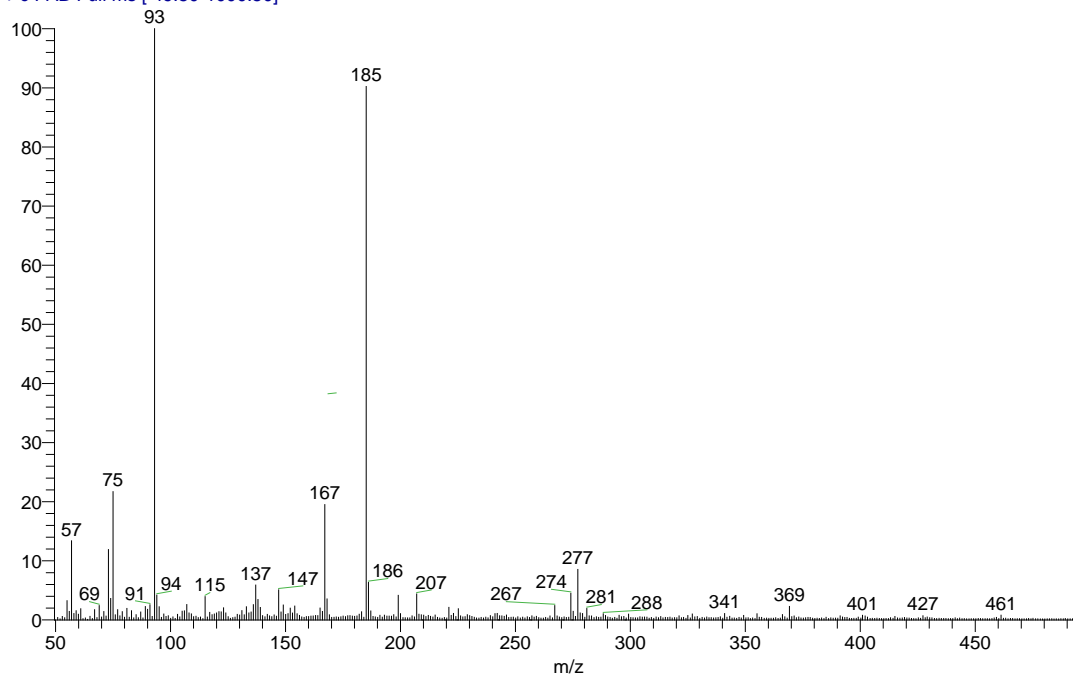
D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT6980\_4

11/11/2011 5:44:08 PM

MODAFINILO

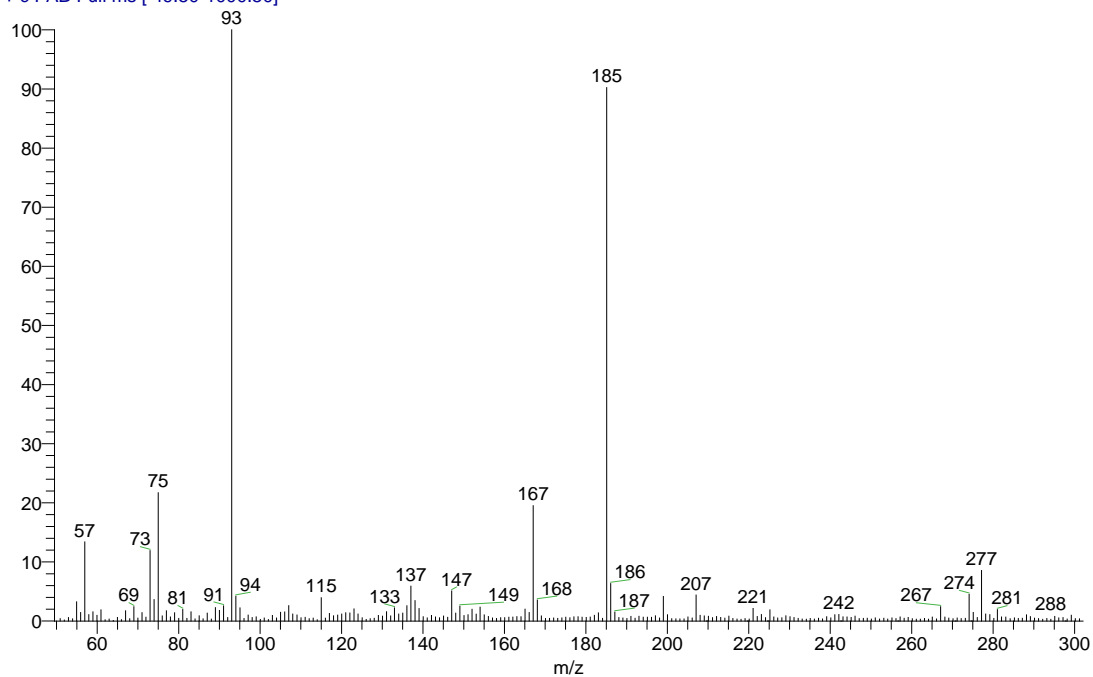
OT6980\_4 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.06E8

T: + c FAB Full ms [ 49.50-1000.50]

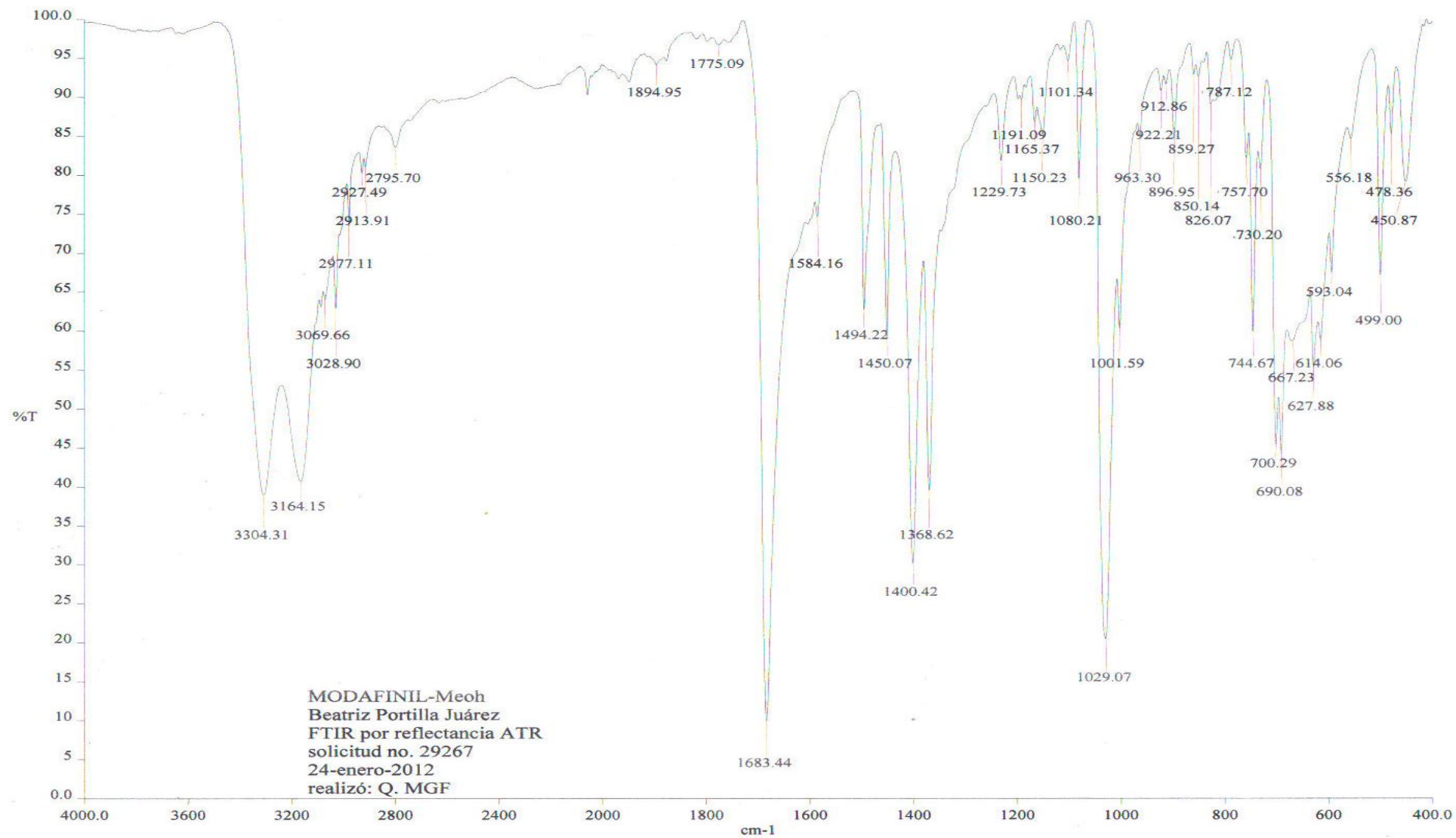


OT6980\_4 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.06E8

T: + c FAB Full ms [ 49.50-1000.50]



Espectro de Infrarrojo de cristales de modafinilo en MeOH:



c:\pel\_data\spectra\analitica\araceli peña\bpj29267.asc

## ANEXO II

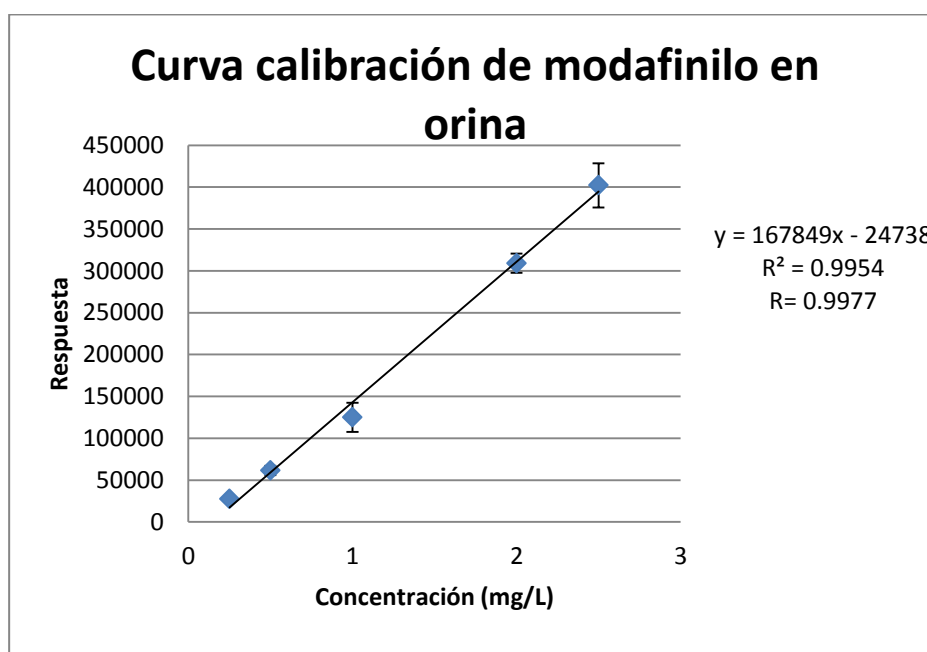
### Linealidad del método

Para evaluar la linealidad de los dos métodos, se realizaron curvas de calibración del modafinilo.

Para realizar la cuantificación se usaron los datos generados del análisis de regresión lineal, las curvas no se ajustaron a cero y la cuantificación se efectuó utilizando la ecuación de cada recta según el método utilizado.

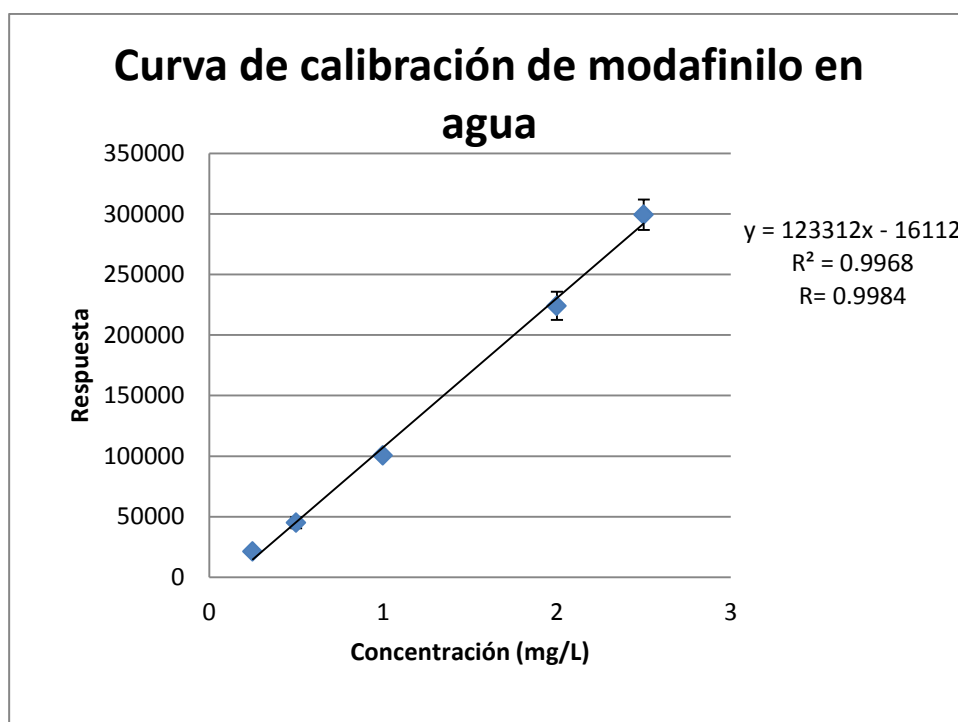
### Curva de calibración en orina

mg/L	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Media
0.25	25385	25528	31737	27550
0.5	57676	67991	58919	61529
1	130329	139263	105801	125131
2	301155	303959	322099	309071
2.5	431718	381828	392717	402088



**Curva de calibración en agua**

mg/L	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Media
0.25	22751	20758	19910	21140
0.5	49391	45503	40120	45005
1	99673	100668	100871	100404
2	211055	227915	233470	224147
2.5	290404	294204	313718	299442



**Curva de calibración en acetonitrilo**

mg/L	Área
0.25	161365
0.5	284495
1	582376
2	1125393
2.5	1376202

