

CROMATOGRAFÍA SOBRE CAPA FINA

Análisis de medicamentos, Doping y drogas de abuso

Q.F. Sergio Salas Ibáñez

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile



MÉTODO DE SCREENING SISTEMA MTTLC

* tarea analítica de barrido para pesquisar la presencia de drogas y/o productos de biotransformación en las diversas matrices biológicas*



ESTRUCTURA GENERAL

screening : primeras informaciones sobre la droga posiblemente presente. Básicamente es la primera etapa en el trabajo de identificación

*identificación : colección de datos analíticos suficientes para concluir que hay una droga presente y no otra sustancia.



Selección de una técnica de Screening

Cobertura de drogas y rapidez de ensayo

Sensibilidad

Adaptabilidad

Versatilidad y expansibilidad

Especificidad

Conveniencia

Costo



Selección de una técnica de Screening

- Cobertura de drogas y rapidez de ensayo
- Sensibilidad
- Adaptabilidad
- Versatilidad y expansibilidad
- Especificidad
- Conveniencia
- Costo

...identificar el mayor número de drogas en el menor tiempo posible.

Selección de una técnica de Screening

- Cobertura de drogas y rapidez de ensayo
- Sensibilidad
- Adaptabilidad
- Versatilidad y expansibilidad
- Especificidad
- Conveniencia
- Costo

...detectar la menor concentración posible de droga.

Selección de una técnica de Screening

- Cobertura de drogas y rapidez de ensayo
- Sensibilidad
- Adaptabilidad
- Versatilidad y expansibilidad
- Especificidad
- Conveniencia
- Costo

...adaptarse al rastreo o barrido de muestras.

Selección de una técnica de Screening

- Cobertura de drogas y rapidez de ensayo
- Sensibilidad
- Adaptabilidad
- Versatilidad y expansibilidad
- Especificidad
- Conveniencia
- Costo

...rastrear una amplia variedad de drogas y aceptar nuevas.

Selección de una técnica de Screening

- Cobertura de drogas y rapidez de ensayo
- Sensibilidad
- Adaptabilidad
- Versatilidad y expansibilidad
- Especificidad
- Conveniencia
- Costo

...detectar el compuesto deseado en presencia de interferentes.

Selección de una técnica de Screening

- Cobertura de drogas y rapidez de ensayo
- Sensibilidad
- Adaptabilidad
- Versatilidad y expansibilidad
- Especificidad
- Conveniencia
- Costo

...fácil aprendizaje e implementación.

Selección de una técnica de Screening

- Cobertura de drogas y rapidez de ensayo
- Sensibilidad
- Adaptabilidad
- Versatilidad y expansibilidad
- Especificidad
- Conveniencia
- Costo

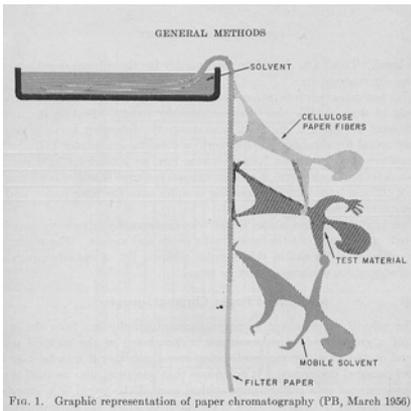
...debe ser de bajo costo.

Cromatografía

Técnica de separación de una mezcla compleja en sus componentes puros.

Sistema cromatográfico

- Muestra : solutos o analitos
- Solvente : fase móvil
- Fase estacionaria : partículas sólidas
- Soporte de la fase estacionaria.



Clasificación

Líquida

CROMATOGRAFÍA

Gaseosa

según la naturaleza
física de la fase móvil

Clasificación

| | | |
|---|--|--|
| | Sólida: | Adsorción (TLC, Papel) Exclusión molecular Intercambio iónico Afinidad |
| Líquida | | |
| CROMATOGRAFÍA | Líquida | Partición (TLC, Papel) |
| | Sólida: | C. Adsorción |
| Gaseosa | Líquida | C. Partición |
| según la naturaleza física de la fase móvil | según la naturaleza física de la fase estacionaria | |

Cromatografía Líquida

- **Fase normal**
"Fase estacionaria **más polar** que fase móvil"
- **Fase Reversa**
"Fase estacionaria **menos polar** que fase móvil"

Cromatografía Líquida

- **Fase normal**
"Fase estacionaria **más polar** que fase móvil"
- **Fase Reversa**
"Fase estacionaria **menos polar** que fase móvil"



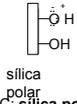
silica

Ej.: TLC: **silica polar**, en los grupos activos silanol se establecen centros de cargas positivas y negativas.

Cromatografía Líquida

- **Fase normal**

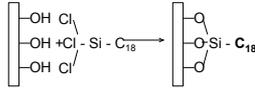
“Fase estacionaria **más polar** que fase móvil”



Ej.: TLC: **sílica polar**, en los grupos activos silanol se establecen centros de cargas positivas y negativas.

- **Fase Reversa**

“Fase estacionaria **menos polar** que fase móvil”



Sílica no polar
(sílica bonded phase)
sílica C18, RP₁₈, ODS

- **Compuestos Polares**

Compuestos que tienen cargas localizadas positivas y negativas (dipolos).

Contienen: **O, N, S, P**, halógenos

- **Compuestos no polares**

Compuestos que no tienen dipolos fuertes.

Contienen principalmente **C e H**.

MTTLC



Regla de oro de la cromatografía

“ *Lo similar atrae lo similar* “

Ej. Crom. Normal (TLC)

Fase móvil apolar (hexano) movilizará rápidamente los solutos apolares. La fase estacionaria polar (sílica) atraerá fuertemente los solutos polares.

Ej. Crom. Reversa

Fase móvil polar (metanol-agua) movilizará rápidamente los solutos polares. La fase estacionaria no polar atraerá fuertemente los solutos no polares.



MTTLC

- 1 Limpieza o extracción
- 2 Separación de las drogas
- 3 Detección de las drogas



Etapas MTTLC

- 1 Limpieza o extracción
- 2 Separación de las drogas
- 3 Detección de las drogas



Limpieza o extracción



* **Selectiva** mínimo de productos no deseados 

* **Limpia** >>>>> Concentrada 



Limpieza o extracción



* **Selectiva** mínimo de productos no deseados 

* **Limpia** >>>>> Concentrada 



- * **Cantidad de muestra (2- 5 mL)**
- * **pH fase acuosa**
- * **Solvente de extracción**

Limpieza o extracción



* **Selectiva** ...

* **Limpia** >>>>

- * **pH 3 fracción ácida**
- * **pH 9,5 fracción básica**
- * **pH 5-6 fracción neutra**
- * **fracción conjugada**
- ...optimizar la recuperación y eliminar la mayor cantidad de interferentes.

- * **Cantidad de muestra (2-5 mL)**
- * **pH fase acuosa**
- * **Solvente de extracción**



Limpeza o extracción

1

Concentración

* evitar pérdida de drogas por: 

- oxidación al aire o luz
- adsorción paredes del vidrio
- volatilización

* $t^{\circ} < 50^{\circ} C^*$, luz difusa*, * corriente de N_2 



Separación de las drogas

2

Concentración

* placas convencionales cortadas a 10cm 

* aplicación de extractos concentrados 



Diagrama de aplicación de muestras y estándares

2

Cromatoplasas 60F254 Merck

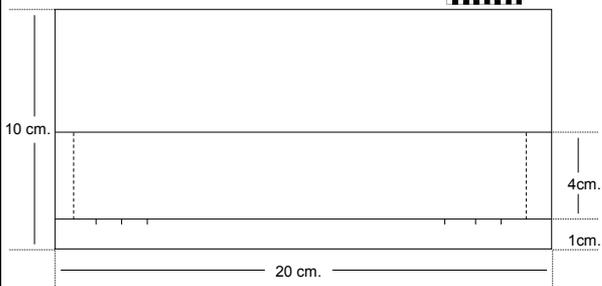


Diagrama de aplicación de muestras y estándares

2

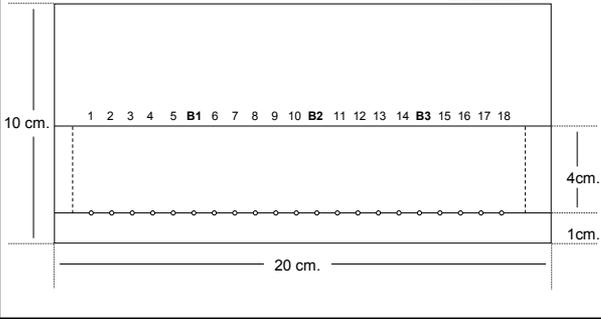


Diagrama de aplicación de muestras y estándares

2

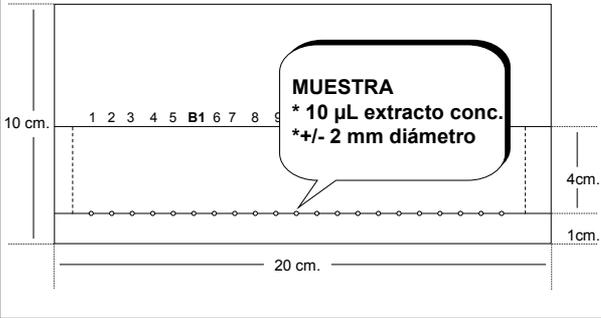


Diagrama de aplicación de muestras y estándares

2

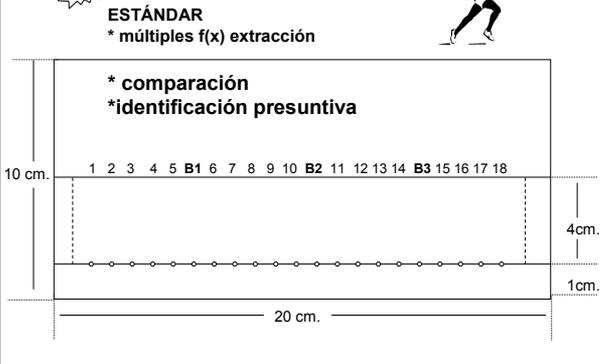
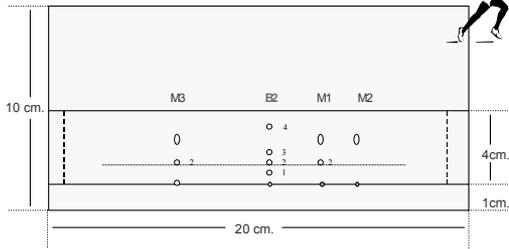


Diagrama de cromatoplaaca con estandar B2

1 morfina, 2 nicotinamida, 3 cafeína, 4 fencanfamina



Desarrollo



* solvente de desarrollo

* distancia



Desarrollo



* solvente de desarrollo

* distancia

...de acuerdo al tipo de extracto que se analiza.



Desarrollo

2

* solvente de desarrollo

* distancia 



Desarrollo

2

* solvente

* distancia 

la velocidad del solvente disminuye en la distancia y la mancha se hace difusa.....



Desarrollo

2

* solvente

* distancias y tiempos cortos 



La velocidad del solvente disminuye en la distancia y la mancha se hace difusa..... preferir distancias y tiempos cortos siempre que se obtengan buenas separaciones.

Selección del solvente de desarrollo

2

- perfil de requisitos 
- material lastre
- residuos



***gran pureza, *estabilidad,
*buena miscibilidad, *baja
toxicidad, *baja viscosidad
y *buena separación**

Selección del solvente de desarrollo

2

- perfil de requisitos
- material lastre 
- residuos



**Drogas deben quedar en la
parte media del cromatograma**

Selección del solvente de desarrollo

2

- perfil de requisitos
- material lastre
- residuos 



**...de acuerdo al tipo
de residuo**

Selección del solvente de desarrollo

2

- perfil de requisitos
- material lastre
- residuo ácido (A) 



*CHCl₃/MeOH/Ac. Acético (9:0.8:0.2)
*CHCl₃/Ciclohexano/Ac. Acético (4:4:2)

Selección del solvente de desarrollo

2

- perfil de requisitos
- material lastre
- residuo básico (B) 



*Davidow modif., Acetato de etilo/MeOH/NH₄OH
(8.5:1:0.6)
*MeOH/NH₄OH (10:0.15)

Selección del solvente de desarrollo

2

- perfil de requisitos
- material lastre
- residuo conjugado básico(AH) 



*benceno/acetona(9.5:0.5)
*ciclohexano/acetona(9:1)

Selección del solvente de desarrollo

2

- perfil de requisitos
- material lastre
- residuo conjugado básico(BH) ←



***Davidow modificado**
***CHCl₃/MeOH/ác. propiónico**
(7.2:1.8:1)

Selección del solvente de desarrollo

2

- perfil de requisitos
- material lastre
- residuo(EP) ←

***Davidow modificado, acetato de etilo/MeOH/NH₄OH**
(8.5:1:0.6)
***CHCl₃/MeOH/Acido Propiónico (7.2:1.8:1)**



Etapas MTTLC

1

Limpieza o extracción

2

Separación de las drogas

3

Detección de las drogas



Detección de las drogas

3

componentes normales
del extracto biológico



DROGAS

Detección de las drogas

3

componentes normales
del extracto biológico



DROGAS

**COMBINACIONES DE REACTIVOS
EN SECUENCIAS PREDETERMINADAS**

Detección de las drogas

3

**COMBINACIONES DE REACTIVOS
EN SECUENCIAS PREDETERMINADAS**



- * UV
- * Ac. Acético 5%
- * Fluorescamina
- * Marquis
- * Mandelin
- * calor
- * diazo

Detección de las drogas

3

COMBINACIONES DE REACTIVOS EN SECUENCIAS PREDETERMINADAS



- * UV
- * Fluorescamina
- * iodo
- * ninhidrina
- * calor
- * Dragendorff
- * CuCl₂

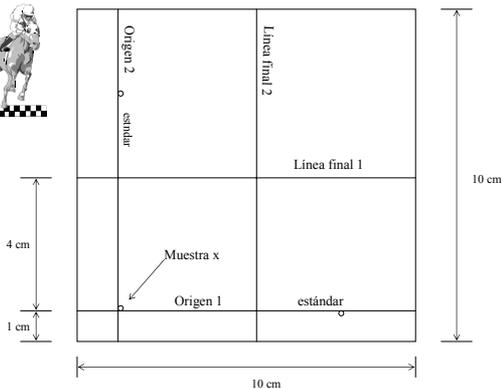
Detección de las drogas

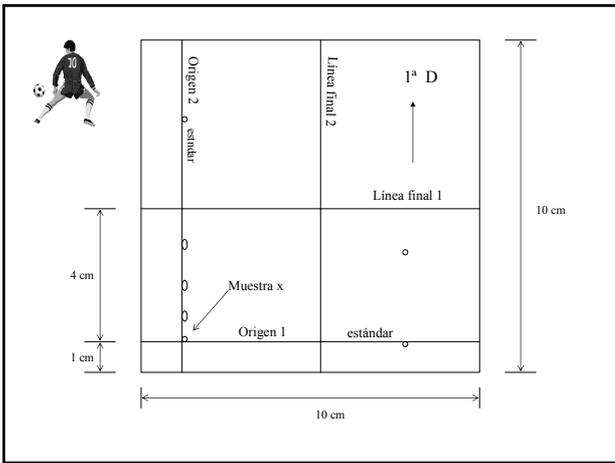
3

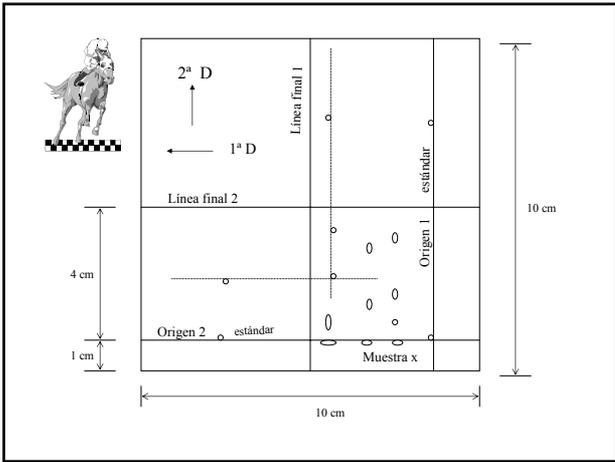
COMPARACIÓN CON ESTÁNDARES



Reacciones de absorción/fluorescencia, manchas coloreadas..... caracterización de la droga o grupos de drogas (fluorescencia luz UV, color, Rf).







CONCLUSIONES MTTLC

La técnica de MTTLC puede separar perfectamente (fluorescencia luz UV, color, Rf) las diferentes drogas.

CONCLUSIONES *MTTLC*

La técnica de *MTTLC* puede separar perfectamente (fluorescencia luz UV, color, Rf) las diferentes drogas.

Las secuencias de revelado entregan una gran cantidad de información (15 a 18 muestras simultáneas).

CONCLUSIONES *MTTLC*

La técnica de *MTTLC* puede separar perfectamente (fluorescencia luz UV, color, Rf) las diferentes drogas.

Las secuencias de revelado entregan una gran cantidad de información (15 a 18 muestras simultáneas).

La correcta interpretación de la información analítica permite discriminar con certeza si una mancha tiene su origen en una droga o en un componente normal de la orina.

Microtécnica en capa fina



lab.análisis antidoping/drogas de abuso. Universidad de Chile
