

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



ENCUAD

23
296

DETERMINACION DE METRONIDAZOL EN
PLASMA POR CROMATOGRAFIA DE GASES

JUAN MANUEL RODRIGUEZ

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1 9 7 9



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.

...A. TESIS 1999
ADG MT. 296
FECHA 297
PROG
?



PRESIDENTE: QFB. María Luisa García Padilla.
VOCAL: Dra. Ofelia Espejo de Ochoa.
SECRETARIO: Dr. Juan José Mandoki W.
1er. Suplente: Q . Arturo Pérez Alonso.
2do. Suplente: MenC. Santiago Capella Vizcaino.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Departamento de Química Farmacéutica y
Productos Naturales; División de Estudios
Superiores; Facultad de Química,-
U.N.A.M.

SUSTENTANTE: Juan Manuel Rodriguez.

ASESOR DEL TEMA: Dra. Ofelia Espejo de Ochoa. /
M. en C. Santiago Capella

Al recuerdo de mis abuelos, a quienes
no tuve la oportunidad de conocer en vida.

A MI MADRE

Por ser ésta obra la culminación de su esfuerzo para conmigo, con respeto y cariño.

A MIS HERMANOS

Porque sin su apoyo no hubiera sido posible el estar escribiendo estas líneas.

A la Dra. Ofelia Espejo por la oportunidad que me brindó para la realización de esta tesis.

Muy especialmente al M. en C. Santiago Capella, por su inapreciable ayuda y consistente apoyo en el desarrollo del tema.

A mis compañeros y amigos.
En especial a Xavier por el gran apoyo que me **brindó** al finalizar mis estudios.

A Angélica y Helgi por su valiosa ayuda en la escritura final de este trabajo.

A todos los que de alguna manera contribuyeron a la culminación de este trabajo.

INDICE

- I.- INTRODUCCION
- II.- PARTE TEORICA
- III.- PARTE PRACTICA
- IV.- RESULTADOS
- V.- DISCUSION
- VI.- CONCLUSIONES
- VII.- BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

Desde el descubrimiento del metronidazol como un eficaz tricomonocida (1) y posteriormente como amebicida tanto sistémico como de contacto, ha habido un marcado interés en desarrollar métodos para el análisis de éste fármaco. Habiéndose elaborado métodos de diferentes tipos: polarográficos (2, 3, 5), colorimétricos (4, 5), espectrofotométricos (5), microbiológicos(6, 11) y de cromatografía gas-líquido (5, 7, 8).

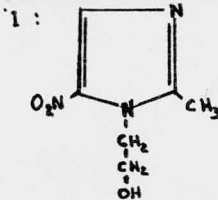
Aún cuando éstos métodos, principalmente el polarográfico, se han utilizado frecuentemente para la cuantificación de metronidazol en fluidos biológicos, se ha observado que el método de cromatografía gas-líquido es uno de los mejores, debido principalmente a su confiabilidad, a su alta sensibilidad y especificidad y a su relativa facilidad de operación.

Una amplia investigación bibliográfica (2, 9, 10), demostró el hecho de que existen diferencias notables en la respuesta clínica de individuos tratados con metronidazol, lo cual hace necesaria una revisión de la farmacocinética, de la bioequivalencia del fármaco y por lo tanto de los métodos que existen para valorarlo en fluidos biológicos.

El objetivo de este trabajo de tesis es implementar un método para la medida de los niveles de metronidazol, en plasma y otros fluidos biológicos, por cromatografía gas-líquido. Intentándose, además, la diferenciación y cuantificación de los metabolitos del metronidazol.

PARTE TEORICA

El metronidazol: 1-(2-hidroxietyl)-2-metil-5-nitroimidazol



es un eficiente tricomonocida, siendo también muy usado contra la amibiasis. De éste último hecho, sin quitar - importancia a la tricomoniasis, se desprende la enorme importancia que representa, ya que la amibiasis es un problema sanitario difícil de erradicar en nuestro país, alcanzando cifras apreciables de mortandad y una cifra altísima de morbilidad (10).

En 1962 Cosar y col. (11), publicaron un artículo en donde comparan los métodos en que en ese tiempo se encontraban en uso para medir metronidazol en suero y en orina:

_____ Un método biológico basado en la determinación de la actividad del metronidazol in vitro en contra de *Tricomonas vaginalis*.

_____ Un método polarográfico para medir la corriente de - difusión hacia el potencial de semicelda.

_____ Un método colorimétrico, después de reducir, diazoar y copular.

De su estudio coligieron que el método polarográfico tenía sobre el microbiológico la ventaja de la rapidez y simplicidad, pero la desventaja de que conduce a resultados aberrantes; en tanto que el método microbiológico daba la medida más correcta de la actividad parasiticida. En lo que atañe al método colorimétrico, éste estudio sólo le da un valor cualitativo.

Sin embargo, desde ese tiempo hasta la fecha, se han mejorado las técnicas y se han desarrollado nuevos métodos. De esta manera es como De Silva⁽¹⁾ en 1970 (5), agrega un paso de cromatografía en capa delgada, después de la extracción para su posterior análisis por cualquiera de los métodos establecidos, así como para su análisis por otro método que presentan: cromatografía gas-líquido usando un detector de captura de electrones.

Con éste paso, se logra más especificidad en todos los métodos; sin embargo, es dificultoso y consume un tiempo apreciable.

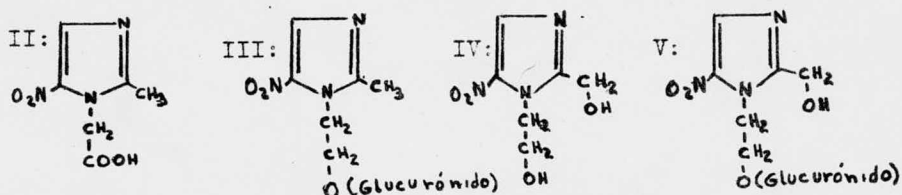
El porcentaje de recuperación de los compuestos en el proceso de extracción previo a la valoración variaba desde el 60 hasta el 85% aproximadamente. Esto es importante pues nos indica si la extracción utilizada es adecuada o no lo es. Este estudio de De Silva y col., no está orientado hacia una comparación de métodos sino a lograr una ampliación de la sensibilidad del análisis de los compuestos en estudio. Así, el método colorimétrico lo emplean para detectar desde 0.5 a 10 $\mu\text{g/ml}$, polarográfico para detectar 0.2 hasta 0.3 $\mu\text{g/ml}$ y el de cromatografía gas-líquido para detectar de 10 a 20 nanogramos/ml; de ésta manera el intervalo de sensibilidad se amplía desde 0.01 hasta 10 $\mu\text{g/ml}$.

Ralph y Clarke (6) (1974), para estudiar la farmacocinética del metronidazol, utilizan un método microbiológico que emplea especies de clostridios. Tal método se diferencia del utilizado por Cosar y col., en que utiliza como microorganismo de prueba una bacteria anaerobia, en tanto que aquel emplea un protozooario: *T. vaginalis*.

Sin embargo, en 1975, Speck y col., (12), presentan hallazgos que sugieren que tal método microbiológico podría estar limitado en su utilidad. Estos hallazgos, en orina, -

(1): De Silva trabajó con compuestos nitroimidazólicos y no precisamente con metronidazol; de aquí que utilice un detector de captura de electrones, ya que éstos compuestos dan más respuesta o son más sensibles a éste tipo de detector por su naturaleza química.

hacen dudar del hecho de que el metronidazol sea el compuesto activo, en virtud de que al realizar un análisis cromatográfico encontraron actividad anticlostridia no únicamente en el metronidazol inalterado, sino en otras diferentes sustancias que se diferencian en sus velocidades de migración. Además, en éste estudio hacen notar que posiblemente los metabolitos del metronidazol posean actividad antibacteriana, pero quizás no tengan actividad antiprotozoica.



Posibles metabolitos del metronidazol.

De lo expuesto, se puede concluir que éste método está limitado, pues no está midiendo únicamente la actividad del metronidazol.

Particularmente trataremos dos métodos que han sido publicados recientemente por diferentes autores y de manera independiente: uno publicado por Midha y col., (7), otro por Wood (8), ambos por cromatografía gas-líquido. En orden cronológico el estudio de Midha antecede al de Wood. Estos métodos tienen en común el tipo de detector que utilizan y la manera de tratar (aunque con diferentes reactivos) el compuesto a identificar y cuantificar: un detector de ionización de flama y la formación de un derivado siliado del compuesto (metronidazol, metabolito, patrón interno.).

Difieren en la manera de extraer el metronidazol, en el patrón interno y en la fase líquida usada en la columna

cromatográfica.

De acuerdo con Wood, una ventaja que muestra su método sobre el de Midha y col., es que el patrón interno usado por él, es comercialmente obtenible, mientras que el utilizado por Midha y col., no lo es.

En ambos métodos se obtiene un 100% de recuperación en la extracción del metronidazol del plasma. Sin embargo Wood no presenta los resultados de tal recuperación de una manera clara, mientras que Midha y col. dan muchos datos que ayudan a conocer la manera en la cual obtienen dicho 100% de recuperación. Esto es, hacen comparaciones entre dos - conteniendo la misma cantidad conocida de metronidazol, utilizando el mismo procedimiento de extracción y análisis; visto de ésta manera, lo que ellos están midiendo es reproducibilidad y no recuperación. Se llegó a esta conclusión - después de muchas pruebas hechas en este trabajo de tesis, en las cuales no se logró un 100% de recuperación.

Un inconveniente del método de Wood, es la gran cantidad de disolvente utilizado en la extracción y la necesidad de una alta pureza del mismo. El inconveniente del método de Midha y col. , es el hecho de utilizar dos disolventes en la extracción y una mezcla de fases líquidas en la columna cromatográfica.

Como puede observarse de ésta discusión, el método más prometedor en la actualidad, para el análisis de metronidazol en fluidos biológicos es el de cromatografía de gases; ya que es específico, sensible y reproducible, además de - sencillo y relativamente poco costoso.

Debido a ello se emprendió el presente trabajo, con objeto de poner a punto un método con las variantes necesarias para ser utilizado en nuestro medio.

PARTE PRACTICA

1.- Material

1.1 Reactivos

a) Para llevar a cabo los diferentes métodos se utilizó metronidazol (I) de los Laboratorios Silanes correspondiente al lote 51, el cual se purificó mediante recristalizaciones sucesivas de acetato de etilo hasta obtener un punto de fusión de 159°-160°C.

b) El metabolito utilizado fué sintetizado en el Departamento de Química Farmacéutica y Productos Naturales de la División de Estudios Superiores de la Facultad de Química de la U.N.A.M. (ver fórmula II)

- c) Cloroformo R.A. Merck y Técnica Química.
- d) Acetato de etilo R.A. Productos Químicos Monterrey
- e) Acido bórico R.A. Baker.
- f) Lentejas de NaOH. Baker.
- g) Acido tricloroacético. R.A. Baker.
- h) Metanol absoluto. R.A. Técnica Química.
- i) Cluro de potasio. R.A. Baker.
- j) Bicarbonato de sodio. R.A. Baker.
- k) Carbonato de sodio. R.A. Baker.
- l) Sulfato de sodio anhidro. R.A. Técnica Química.
- m) Bis-trimetilsililtrifluoroacetamida. Aldrich Chemical Company, Inc.
- n) 1-Tetradecanol. Aldrich Chemical Company, Inc.
- o) Octadecanol.
- p) Mentol.
- q) Decanol.
- r) El plasma fué obtenido de:
Servicio de Hematología, Banco de Sangre, Servicio -
de Transfusiones, Colonia Roma, México, D.F.

El anticoagulante utilizado fué ACD (ácido cítrico--dextrosa). Plasma de sangre tipo A Rh positivo.

1.2 Vidrio

- a) Matraces volumétricos de 250 ml.
- b) Matraces volumétricos de 25 ml.
- c) Matraces volumétricos de 10 ml.
- d) Tubos de ensaye con tapón de rosca de capacidad de 50 ml.
- e) Pipetas volumétricas de 1 ml.
- f) Pipetas volumétricas de 5 ml.
- g) Pipetas graduadas de 10 ml.
- h) Pipetas de 1 ml graduadas en décimas.
- i) Pipetas de 1 ml graduadas en centésimas.
- j) Vasos de precipitados de 50 ml.
- k) Vasos de precipitados de 100 ml.
- l) Frascos viales de 5 ml con base cónica.
- m) Frascos viales de 5 ml.
- n) Jeringa de 100 microlitros. Hamilton.

1.3 Aparato

Las determinaciones se hicieron utilizando un cromatógrafo de gases Varian Aerograph modelo 2100, equipado con un detector de ionización de flama, una columna de vidrio de 122 x 0.32 cm empacada con OV-17 al 3 % -- sobre cromosorb W doblada en forma de U.

1.4 Gases

Los tanques de gas fueron obtenidos de Infra de México. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 25 ml/min.

Los gases para el detector fueron aire e hidrógeno, cuyo flujo se llevó hasta lograr un máximo de sensibilidad en cada uno de los experimentos.

2.- Métodos

2.1 Determinación de metronidazol libre.

- a) Búsqueda del patrón interno.

Se hicieron experimentos para determinar metronidazol libre, sin necesidad de la formación de derivados. Para ello, se buscó un compuesto que sirviera como pa-

trón interno. De los compuestos que se encontraban en - el laboratorio se probó Mentol, Decanol y Octadecanol; siendo éste último el que mejores resultados ofreció, como puede observarse en el cromatograma de la figura número 1. Las características que hacen adecuado a éste compuesto son:

1) Tiempo de retención lo suficientemente diferente, cómo para no confundirlo con éste.

2) El detector es sensible a éste alcohol, dando una respuesta aproximadamente 5 veces más grande que - para el metronidazol mismo.

Una de las principales desventajas del octadeca-- nol es que no se encuentra en una forma pura comercialmente, sino que se encuentra formando una mezcla; siendo detectados pequeños picos en el cromatograma correspondiente. Sin embargo, los picos son pequeños aún a - la sensibilidad a que se opera el cromatógrafo, además de que no interfieren con ninguna de las señales de interés. De ésta manera fué que se seleccionó el al--cohol octadecílico como patrón interno.

b) Búsqueda de las condiciones de operación.

En ésta búsqueda se tomó en cuenta la información dada en la literatura (8). Es decir, se operó en un -- principio a 160°C, pero como los tiempos de retención eran grandes (8 y 10 minutos para el metronidazol y - el patrón interno, respectivamente), se optó por in--crementar la temperatura de la columna a 190°C, dando como resultado el cromatograma de la figura 1, en el cual los tiempos de retención disminuyeron apreciablemente. Asimismo la rapidez de la carta se varió hasta obtener la resolución dada en la figura 1 (0.5 pulgadas/minuto).

Al incrementar la temperatura de la columna, - como consecuencia debe aumentarse la temperatura del detector e inyector. Así, de 210°C reportada en (8), se incrementó a 240°C.

Con respecto a los gases, las condiciones son las dadas en 1.4.

En resumen, se obtuvieron las siguientes condiciones de operación:

Temperatura de la columna:	190°C
" del detector:	240°C
" " inyector:	240°C

Rapidez de la carta: 0.5 pulgadas/minuto

c) Linealidad

Se elaboraron curvas de calibración mediante los siguientes pasos:

1) Pesar 5 miligramos de metronidazol y diluir hasta la marca en un matraz volumétrico de 100 ml, con cloroformo. Esta es la solución A, con una concentración de 50 microgramos/mililitro.

2) Se toma un mililitro de la solución A y se coloca en un frasco vial de 5 mililitros, se evapora el cloroformo y se agrega un mililitro de la solución del patrón interno. Corresponderá a la solución B, que contiene 50 microgramos/mililitro de metronidazol.

3) Se toman dos mililitros de la solución A, se colocan en un frasco vial de 5 mililitros, se evapora el cloroformo, se le agrega un mililitro de la solución de patrón interno y se tiene la solución C, con una concentración de 100 microgramos/mililitro de metronidazol.

4) Se toman tres mililitros de la solución A, se colocan en un frasco vial, se evapora el cloroformo, se le agrega un mililitro de la solución de patrón interno y se tiene una solución D, que contiene 150 microgramos/mililitro de metronidazol.

5) Se toman cuatro mililitros de la solución A se colocan en un frasco vial de 5 mililitros, se evapora el cloroformo, se agrega un mililitro de la solución de patrón interno y se tiene la solución E, que contiene 200 microgramos/mililitro de metronidazol.

6) Se toman 5 mililitros de la solución A, se colocan en un frasco vial de 5 mililitros, se evapora el cloroformo, se agrega un mililitro de la solución de patrón interno y se tiene la solución F, que contiene 250 microgramos/mililitro de metronidazol.

Para la preparación de la solución de patrón interno, se pesan 10 miligramos de alcohol octadecílico y se diluyen hasta la marca en un matraz aforado de 100 mililitros, con cloroformo.

Una vez realizado lo anterior, se procedió a inyectar cada una de las muestras al cromatógrafo, bajo las condiciones descritas anteriormente. Se obtuvo la gráfica que se muestra en la figura 2, con los datos que se muestran en la tabla 1.

Se elaboró además una curva de calibración con un intervalo de concentraciones desde 5 microgramos/mililitro hasta 200 microgramos/mililitro; para la elaboración de ésta curva se procedió de la manera siguiente:

- 1) Se hizo una solución de metronidazol con una concentración de 200 microgramos/mililitro, en cloroformo y se hicieron diluciones para la obtención de soluciones de 150, 100, 50, 25, 10 y 5 microgramos/mililitro.

- 2) Se coloca un mililitro de cada una de las soluciones en sendos frascos viales con capacidad de 5 mililitros con base cónica. (Estos frascos se hicieron fabricar en el taller de vidrio de la Facultad de Química de la U.N.A.M.).

- 3) Se evapora el cloroformo, ya sea mediante un evaporador de nitrógeno o mediante el artefacto representado en la figura 3.

- 4) Se redisuelve con 0.1 mililitros de metanol y 0.1 mililitros de la solución de patrón interno.

Las muestras se inyectan al cromatógrafo, obteniéndose los resultados mostrados en la gráfica de la figura 4, con los datos de la tabla 2.

Se observa que el coeficiente de correlación disminuye al ampliar el intervalo de concentraciones. De todo lo anterior se observa que existe linealidad en un intervalo amplio de concentraciones (de 5 a 200 microgramos/mililitro).

d) Búsqueda del pH de mejor extracción.

Se prepararon soluciones reguladoras de pH 2, 6 y 7 para observar el rendimiento de extracción, de la siguiente manera:

Solución reguladora de pH 2

Se colocan 62.5 mililitros de solución de cloruro de potasio 0.2 M en un matraz volumétrico de 250 ml, se adicionan 16.25 mililitros de solución 0.2 M de ácido clorhídrico y se lleva hasta la marca con agua destilada.

Solución reguladora de pH 6

Se colocan 62.5 ml de solución de fosfato monopotásico 0.2 M en un matraz volumétrico de 250 ml, se agregan 7 ml de solución de NaOH 0.2 M y se lleva hasta la marca con agua destilada.

Solución reguladora de pH 7

Se colocan 62.5 ml de solución de fosfato monopotásico 0.2 M en un matraz volumétrico de 250 ml, se agregan 36.37 ml de solución de NaOH 0.2 M y se lleva hasta la marca con agua destilada.

Se preparan además soluciones de metronidazol a diferentes concentraciones (10, 50 y 100 microgramos/ml), con cada una de estas soluciones, de la siguiente manera:

i) Se pesan 10 mg de metronidazol y se diluye hasta la marca en un matraz volumétrico de 100 ml con cada una de las soluciones reguladoras. Se tienen las soluciones C, con una concentración de 100 microgramos/mililitro.

ii) Se toman 5 ml de la solución C y se diluyen hasta la marca en un matraz volumétrico de 10 ml, con solución de cada uno de los pH. Se tienen soluciones B, que contienen 50 microgramos/ml.

iii) Se toma un mililitro de la solución C y se diluye hasta la marca en un matraz volumétrico de 10 mililitros con soluciones de cada uno de los pH. Se tienen soluciones A, que contienen 10 microgramos/ml.

La extracción del metronidazol se lleva a cabo mediante el método que se describirá en la siguiente sec-

ción. La única modificación que tiene éste, es el paso 1 ya que no se lleva a un pH 8, sino que directamente se extrae al pH de la solución correspondiente (2, 6 y 7).

En términos generales se logró observar que medida que aumenta el pH, se incrementa el rendimiento de la extracción. No se hicieron más experimentos acerca de este tópico debido a que en la literatura (Midha y col., y de Silva y col.,) reportan esto mismo, es decir, que el rendimiento de extracción aumenta al aumentar el pH.

e) Método

De todo lo anteriormente expuesto y tomando en cuenta la técnica descrita por Wood (8), se desprende el siguiente método para cuantificar metronidazol libre:

- 1) Tomar un mililitro de la solución de metronidazol y llevarla a pH 8.
- 2) Extraer con cloroformo. 1 x 20, 1 x 10 y — 1 x 5.
- 3) Juntar las fases clorofórmicas y evaporar el cloroformo (usar rotavapor para mayor rapidez).
- 4) Pasar el metronidazol del matraz a un frasco vial de base cónica con capacidad de 5 ml, con dos ml de metanol.
- 5) Evaporar el metanol (con evaporador de nitrógeno o bien con el artefacto presentado en la figura 3).
- 6) Colocar en el frasco vial 0.1 ml de metanol y 0.1 de patrón interno.
- 7) Se inyectan al cromatógrafo 1.5-1.7 microlitros de la muestra.

Las condiciones del cromatógrafo son las descritas en 2.1.b. La sensibilidad era de 10^{-11} amperes/segundo; con atenuaciones electrométricas variables de acuerdo a la concentración de la muestra. Haciendo posteriormente correcciones por atenuación.

Finalmente, se observa que al llevar a cabo las extracciones correspondientes a diferentes concentraciones de metronidazol, la cantidad mínima detectable es del or

den de 2.0 microgramos/ml., además de presentarse el fenómeno de "coleo" (ampliación en la base de la señal).

2.2 Determinación de metronidazol silitado (en solución reguladora):

a) Patrón interno y condiciones de operación

Para esta determinación se utilizó el patrón interno y las condiciones reportadas por Wood (8):

Patrón interno: tetradecanol
Temperatura de la columna : 160°C
Temperatura del detector : 210°C
Temperatura del inyector : 210°C

La rapidez de la carta fué de 0.25 pulgadas/min.

Con respecto a los gases, las condiciones son las -- mismas contenidas en la sección 1.4.

b) Método

Ya que en la literatura (8) se reporta un pH de trabajo de 8 unidades, encontrándose además que a medida de que aumenta el pH aumenta el rendimiento de extracción (hasta pH 9.0 después del cual el rendimiento decrece, de acuerdo a lo reportado por Midha y col., y De Silva y col., (7) y (5) respectivamente), se adoptó este pH para la técnica de extracción a realizar. Esta técnica resultó en los siguientes pasos:

- 1) Un mililitro de la solución reguladora. Se lleva a pH 8 si no lo está.
- 2) Se extrae el metronidazol con cloroformo: 1 x 20, 1 x 10 y 1 x 5.
- 3) Se juntan los extractos clorofórmicos y se les agrega sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua.
- 4) Se decanta el cloroformo en un matraz pera, se adicionan 0.1 ml de una solución de tetradecanol que contiene 50 microgramos/ml en cloroformo y se evapora a sequedad (en rotavapor).
- 5) Se pasa el residuo del matraz a un frasco vial de 5 ml. con base cónica utilizando para ello 0.5 ml. de metanol absoluto.

6) Se evapora el metanol con evaporador de nitrógeno o mediante el artefacto mostrado en la figura 3.

7) Se agregan 50 microlitros del bis-trimetil-sililtrifluoroacetamida (agente sililante) y se tapa el frasco con un tapón recubierto con teflón.

8) Se mantiene la reacción a temperatura ambiente y en la oscuridad por un mínimo de cuatro horas.

9) Se inyecta un microlitro al cromatógrafo.

Las condiciones del cromatógrafo son las descritas en 2.2.a. La sensibilidad en amperes/segundo se mantuvo en 10^{-11} , variando las atenuaciones electrométricas en cada una de las pruebas. Resultados de estas extracciones se observan en la gráfica de la figura 5, elaborada con los datos de la tabla 3.

2.3 Determinación de metronidazol en plasma.

a) Búsqueda del disolvente para la extracción del metronidazol.

Se probaron disolventes tales como acetato de etilo, una mezcla de cloruro de metileno-éter etílico y cloroformo. Se observó que al mezclar un mililitro de plasma con los dos primeros disolventes, las proteínas se emulsificaban impidiendo de esta manera proseguir con el método descrito en 2.2b, mientras que con cloroformo el problema que se presentaba era que las proteínas hacían difícil el extraer la fase clorofórmica, puesto que precipitan y permanecen en la capa superior. Es por lo anterior que se optó por desproteínizar las muestras plasmáticas y seguir la técnica descrita en 2.2.b.

b) Desproteínización de la muestra plasmática

Existen una gran variedad de métodos para desproteínizar, tales como precipitación por adición de disolventes miscibles, mediante precipitación dependiente de la formación de sales insolubles, mediante precipitantes aniónicos (ácido tricloroacético, ácido tungstíco, ácido perclórico, etc.), precipitantes catiónicos (zinc, zinc más bario, cobre), ultrafiltración, etc. (12).

De entre todos éstos métodos se seleccionó el de precipitantes aniónicos, por ser el más común en la rutina de análisis clínicos. El precipitante seleccionado fué ácido tricloroacético por ser el más fácil de conseguir en el laboratorio rutinario.

Las técnicas normales de desproteinización diluyen la muestra plasmática aproximadamente de 1 a 10, lo cual no conviene a nuestros fines, pues disminuiría la cantidad mínima detectable. Se realizaron varias pruebas con diferentes volúmenes de ácido tricloroacético al 5 % hasta que se llegó al volumen preciso para precipitar todas las proteínas plasmáticas en la muestra. Este volumen resultó ser de un mililitro.

c) Extracción del metronidazol

Al seguir la técnica descrita en 2.2.b. se tiene que es necesario llevar a pH 8 la muestra libre de proteínas. Se decidió probar si era mejor con una solución reguladora de pH 8 o con una solución de NaOH.

Se probaron diferentes concentraciones de NaOH de tal manera que el volumen utilizado fuera mínimo para llevar a pH 8 la muestra. De esta manera se llegó al volumen de 0.35 ml de NaOH 0.4 M. La solución reguladora utilizada en este experimento fué de carbonatos, preparada en la siguiente forma:

1) Pesar 28.62 gramos de carbonato de sodio y en un matraz volumétrico de 1 litro llevar hasta la marca con agua destilada. Esta solución tiene una concentración 0.1 M.

2) Pesar 8.4 gramos de bicarbonato de sodio y en un matraz volumétrico de 1 litro llevar hasta la marca con agua destilada. Esta solución también es 0.1 M.

Mezclar un volumen de carbonato de sodio 0.1 M por 9 volúmenes de bicarbonato de sodio 0.1 M.

Los resultados de este experimento se reportan en la tabla 4. En ella se puede observar que llevando a pH 8 -- con NaOH 0.4 M, se aumenta el rendimiento de extracción.

d) Método

De los experimentos expuestos anteriormente se obtuvo el siguiente método de cuantificación:

1) Un mililitro de plasma conteniendo metronidazol se desproteíniza con un mililitro de ácido tricloroacético al 5 %.

2) A un mililitro del filtrado libre de proteínas, se le agregan 0.35 ml de NaOH 0.4 M para tener un pH aproximado de 8.0.

3) Se extrae el metronidazol con cloroformo. 1 x 20, 1 x 10 y 1 x 5.

4) Se juntan los extractos clorofórmicos y se les agrega sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua.

5) Se decanta el cloroformo en un matraz pera, se adicionan 0.1 ml de una solución de tetradecanol que contiene 50 microgramos/ml en cloroformo y se evapora a sequedad en rotavapor.

6) Se pasa el residuo del matraz a un frasco vial con base cónica, utilizando para ello 0.5 ml de metanol absoluto.

7) Se evapora el metanol (en un evaporador de nitrógeno o en el artefacto representado en la figura 3).

8) Se agregan 50 microlitros del reactivo sililante, bis-trimetilsililtrifluoroacetamida, se tapa el frasco con un tapón recubierto con teflón.

9) Se mantiene la reacción a temperatura ambiente y en la oscuridad por un mínimo de cuatro horas.

10) Se inyecta un microlitro al cromatógrafo.

Las condiciones son las dadas en 2.2.a.

e) Linealidad

Se hicieron curvas de calibración de muestras plasmáticas cuyo intervalo de concentraciones era de 1.0 a 10 microgramos/ml. Los resultados de estos experimentos se pueden observar en la figura 6, obtenida de los datos de la tabla 5. En ellos se puede observar que la linealidad es aceptable puesto que su coeficiente de correla-

ción es cercano a uno.

f) Reproducibilidad

Para cuantificar metronidazol en muestras que se des conoce su concentración, es necesario hacer una curva de calibración e interpolar el resultado obtenido en la muestra problema. En este punto se presentó un problema muy importante: la curva de calibración debe ser hecha de soluciones patrón de metronidazol en cloroformo, de soluciones patrón de metronidazol en solución reguladora tratada exactamente igual que la muestra plasmática problema, o bien de soluciones patrón de metronidazol en plasma tratadas exactamente igual que la muestra plasmática problema.

Comparativamente, el rendimiento de extracción es menor en plasma que en solución reguladora tratadas de igual manera. Es por esto que se prefiere hacer la curva de calibración de soluciones patrón de metronidazol en plasma tratadas exactamente igual que la muestra plasmática problema.

Como se mencionó en la parte teórica, lo que se mide es reproducibilidad y no recuperación. Es por esto que hicieron pruebas de reproducibilidad para obtener el coeficiente de variación y la desviación estándar del método presentado en 2.3.d. y de ésta manera darse cuenta cómo está funcionando el método. Se prepararon soluciones de 10 microgramos/ml de metronidazol en plasma y se obtuvieron varias muestras. Estas muestras fueron tratadas como se describe en 2.3.d.

Los resultados de estos experimentos se presentan en las tablas 6 y 7. Se deduce de ellos que el método presenta algunos problemas en cuanto a reproducibilidad, los cuales son discutidos posteriormente.

2.4 Identificación de metabolitos de metronidazol

La identificación de uno de los metabolitos del metronidazol es posible mediante el método descrito en la sección 2.3.d. El metabolito identificado es el ácido 2-

-metil-5-nitroimidazolil-1-acético. De una solución plasmática del metabolito, de concentración de 25 microgramos/ml, se obtuvo una muestra de un mililitro que fue tratada como en 2.3.d., obteniéndose el cromatograma presentado en la figura 7. Como se puede observar, el tiempo de retención es lo suficientemente grande (7.6 minutos) como para diferenciarlo del tiempo de retención del metronidazol (4 minutos). De aquí que este método sea recomendable para la identificación y cuantificación (si así se desea) de metabolitos del metronidazol.

RESULTADOS

En la figura 4 se eliminó el punto correspondiente a 200 microgramos/ml por considerarlo un valor aberrante.

Las muestras de los resultados presentados en la figura 6, figura 8 y tabla 5 fueron obtenidas de soluciones plasmáticas de metronidazol.

Las explicaciones de cada una de las figuras y ta-~~blas~~blas, se encuentran en la parte práctica.

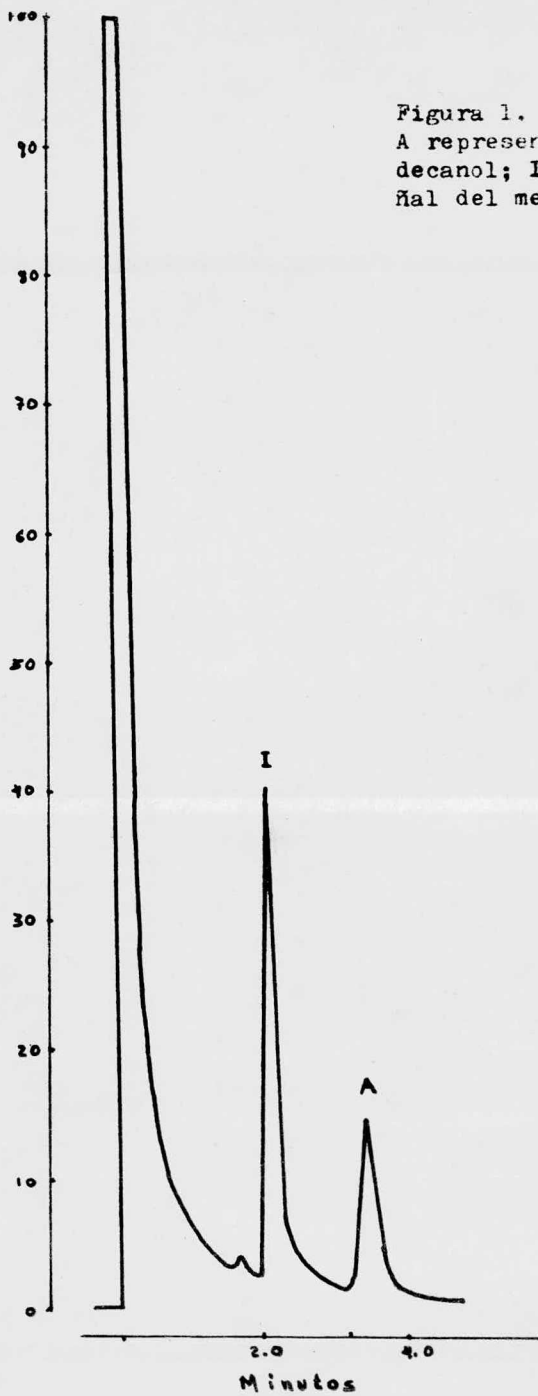
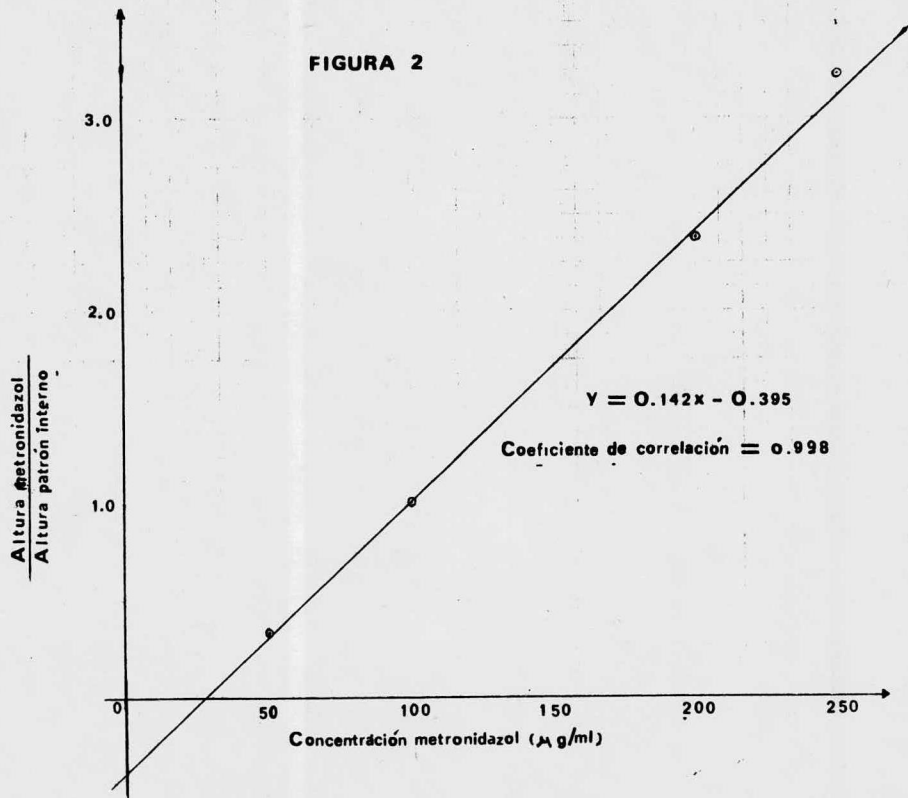


Figura 1.
A representa el octadecanol; I es la señal del metronidazol.



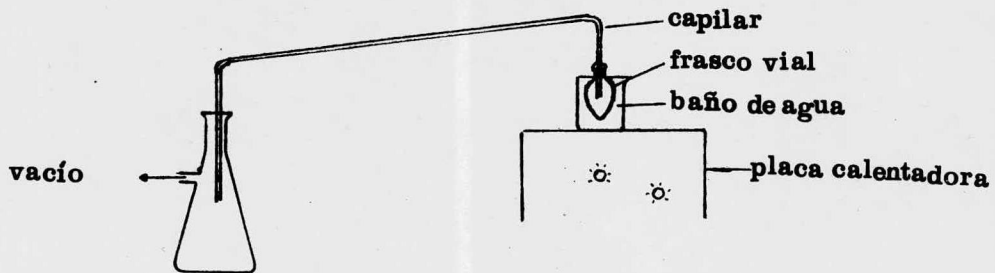
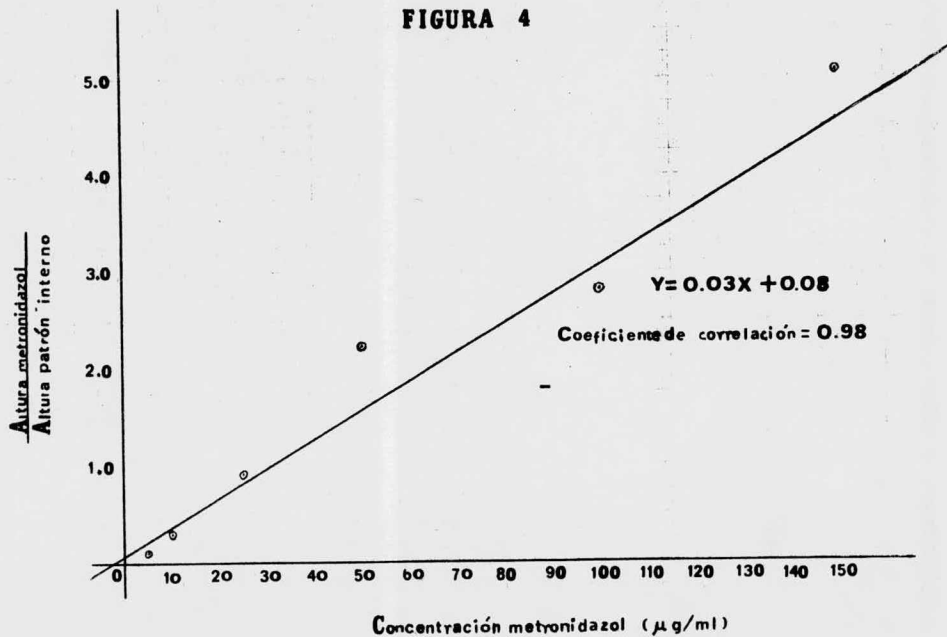


FIGURA 3

FIGURA 4



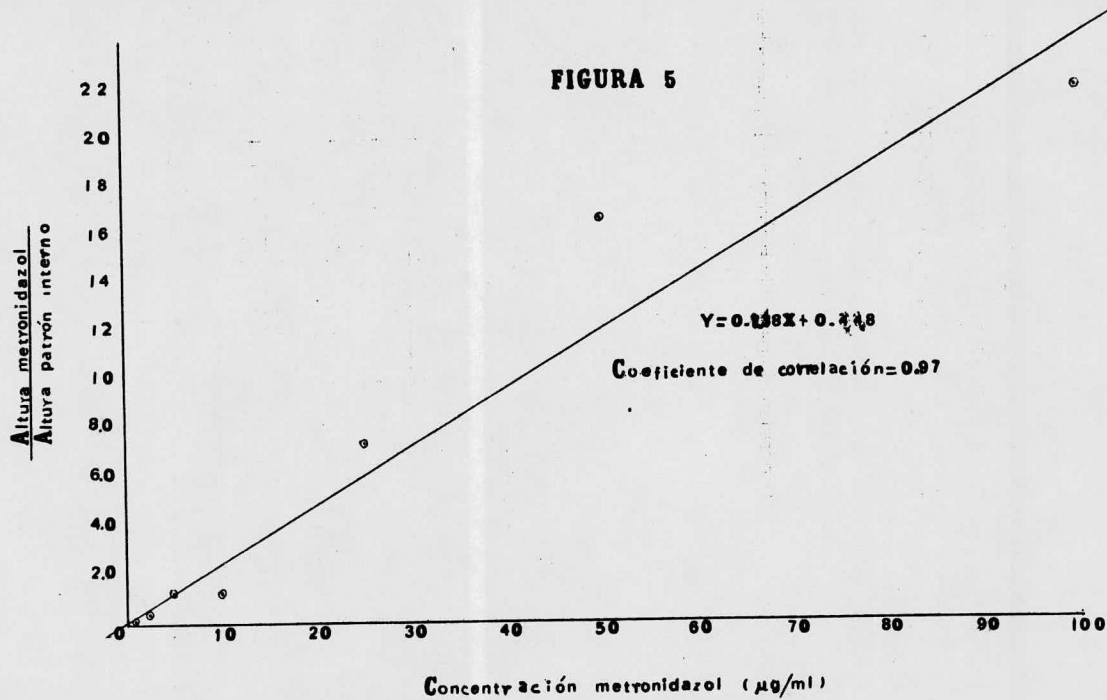
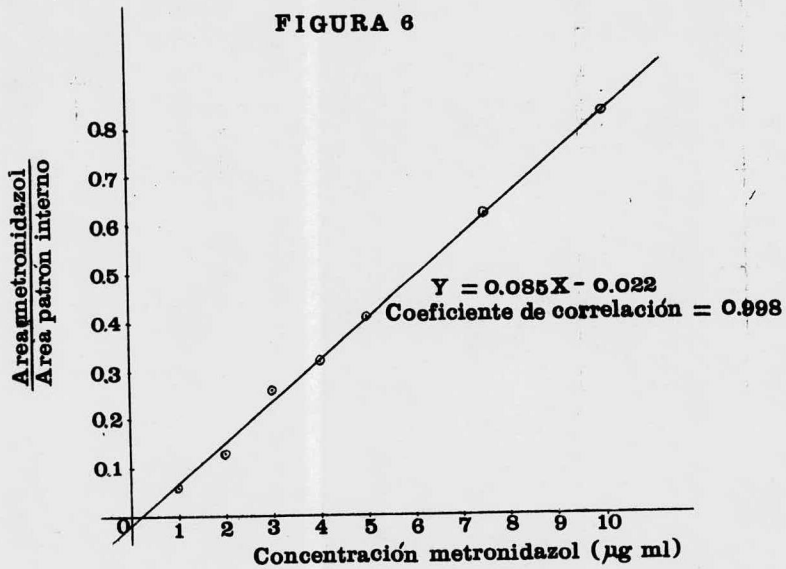


FIGURA 6



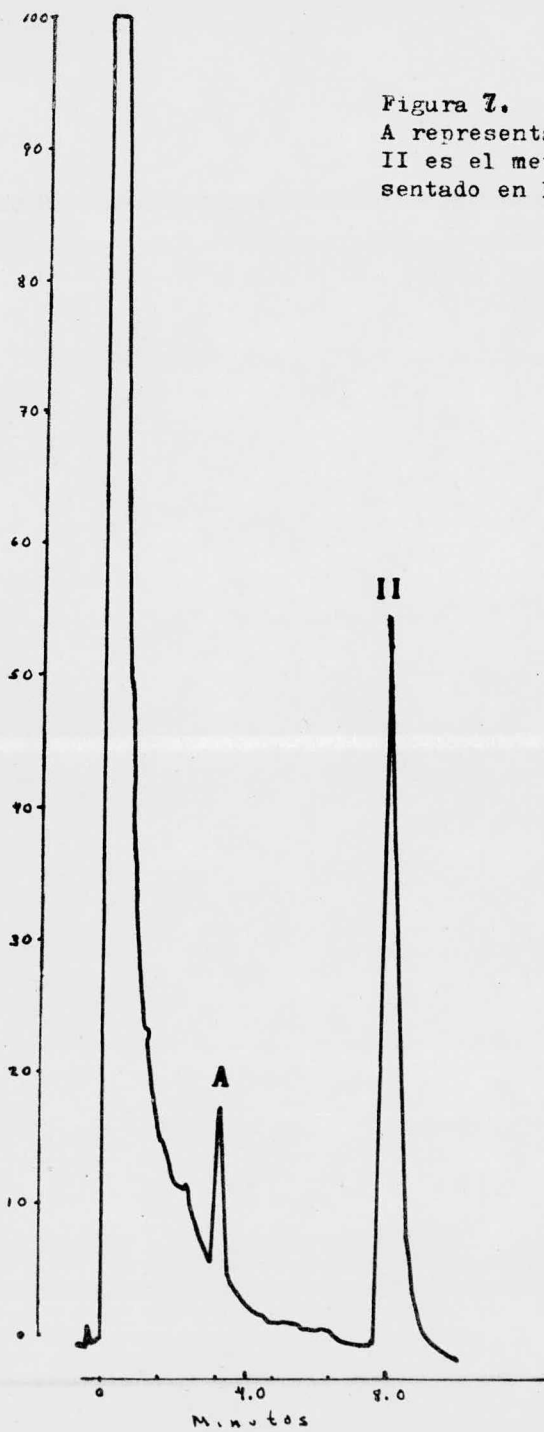


Figura 7.
A representa tetradecanol;
II es el metabolito repre-
sentado en la fórmula II.

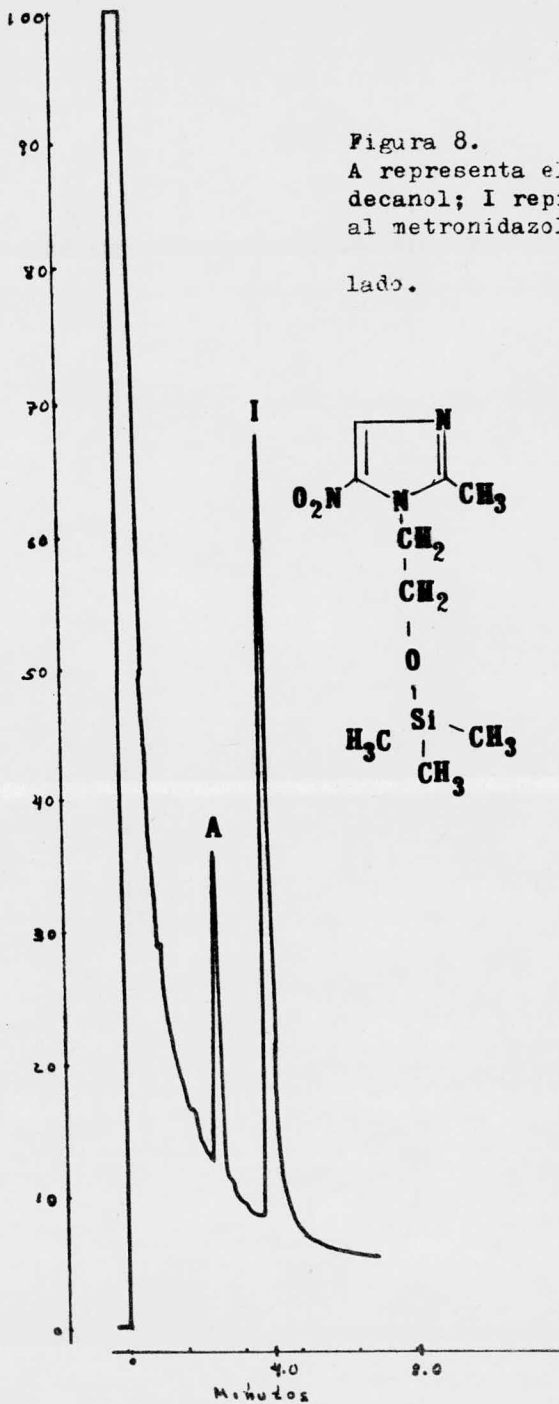


Figura 8.
 A representa el tetra-
 decanol; I representa-
 al metronidazol, sili-
 lado.

TABLA I

Alturas (mm.)		Concentración.mcg/ml.		Altura Me- tronidazol
Metronida- zol	Patrón interno. Octadecanol	Metronida- zol.	Octadecanol	Altura Patrón interno
15.0	43.5	50	100	0.344
51.0	50.0	100	„	1.020
97.5	41.0	200	„	2.378
169.5	52.5	250	„	3.228

TABLA 2

Alturas.cm.		Concentraciones.mcg/ml		Altura Metronid.
Metroni- dazol	Octadecanol	Metroni- dazol	Octadecanol	Altura Octad.
0.2	1.7	5.0	100.0	0.1176
1.2	4.0	10.0	»	0.3000
1.9	2.0	25.0	»	0.9268
6.0	2.7	50.0	»	2.2222
3.8	1.3	100.0	»	2.8148
15.7	3.1	150.0	»	5.0806

TABLA 3

Areas ² .		Concentración.mcg/ml		Area Metronida- zol.
Metronida- zol	Tetrade- canol	Metronida- zol.	Tetrade- canol	Area Tetradec.
1.80	4.20	1.0	50.0	0.07
0.58	8.16	2.5	"	0.43
6.15	4.56	5.0	"	1.35
17.48	14.00	10.0	"	1.25
107.16	14.40	25.0	"	7.44
59.84	3.60	50.0	"	16.62
169.60	7.68	100.0	"	22.08

TABLA 4

	Base Metro- nidazol. cm.	Altura Metro- nidazol. cm.	Altura Tetra- decanol. cm.	Base Tetra- decanol. cm.	Area Metro- nidazol. cm ²	Area Tetra- decanol. cm ² .	Area Metron. Area Tetra- decanol.	Promedio	Desvia- cion. Estandar
Estandar 10 mcg/ml	7.40	1.20	1.40	0.5	5.73	0.54	10.61	10.54	1.03
	9.55	1.20	1.80	0.6	4.44	0.38	11.53		
	6.50	1.05	1.20	0.6	3.41	0.36	9.47		
Extracción con buffer pH 8 (a 10 mcg/ ml)	5.20	1.25	1.85	0.85	3.27	0.78	4.15	3.80	0.49
	4.70	0.90	1.75	0.70	2.11	0.61	3.45		
Extracción a pH 8 con NaOH 0.4 M (a 10 mcg/ml)	4.70	0.95	1.45	0.60	2.23	0.43	5.13	5.84	1.01
	8.20	1.60	2.50	0.80	6.56	1.00	6.56		

TABLA 5

Concentraci ^o n Metronidazol mcg/ml	Concentraci ^o n Tetradecanol mcg/ml	$\frac{\text{Area metronidazol}}{\text{Area Tetradecanol}}$
10.0	25.0	0.83
7.5	"	0.62
5.0	"	0.41
4.0	"	0.32
3.0	"	0.26
2.0	"	0.13
1.0	"	0.06

TABLA 6

Conc. Metron. mcg/ml	Conc. Tetradecanol mcg/ml	Area Metron. / Area Tetradec.	Promedio	Desviación Estandar	Coficiente de Variación
10.0	50.0	0.37			
10.0	50.0	0.36	0.34	0.037	10.8 %
10.0	50.0	0.30			

TABLA 7

Conc. Metron. mcg/ml	Conc. Tetradec. mcg/ml	Area Metron. / Area tetradec.	Promedio	Desviación Estandar	Coficiente de Variación
10	50	.34			
10	"	.40			
10	"	.40	.39	.037	9.5 %
10	"	.43			

DISCUSION

Los autores que han realizado trabajos similares al descrito en este estudio son Midha y col., (7) y Wood -- (8).

Los resultados presentados por Midha y col., son si milares a los encontrados en este trabajo de tesis en los siguientes puntos:

1) En cuanto al pH de mejor rendimiento de extracción, ellos encontraron que al incrementar el pH de la misma, se incrementaba el rendimiento. Esto era verdad - hasta pH 9, después del cual el rendimiento comienza a - disminuir apreciablemente. En nuestro trabajo también se confirmó este hecho, hasta un pH de 7. Esto puede observarse en la parte práctica sección 2.1.d.

2) La cantidad mínima detectable sin la formación de un derivado del metronidazol (metronidazol libre) reportada por estos autores es de aproximadamente 2 microgramos/ml. Mencionan, además, que se presenta el fenómeno - de "coleo" (la señal en su parte basal se extiende). En nuestro estudio, este fenómeno puede observarse en la fi gura 1.

3) El coeficiente de variación reportado para bajas concentraciones es similar al encontrado en este trabajo. Estos resultados se pueden observar en las tablas 6 y 7.

No se encontraron resultados como los reportados por Wood, aún cuando la mayor parte del método desarrollado en esta tesis estaba orientado por el trabajo de ése autor, el cual no reporta datos de metronidazol libre, ni la razón por la cual seleccionó el pH de extracción.

Debido al método de cuantificación, existen algunas diferencias entre los resultados obtenidos en este traba jo de tesis y los reportados en la literatura (7 y 8):

a) El coeficiente de variación, dado por manipula--

ciones del método de extracción fundamentalmente, es alto si pensamos determinar cantidades pequeñas de metronidazol.

b) El rendimiento en la extracción es bajo con respecto al trabajo de Wood (8). Sin embargo este autor no reporta claramente como hace los cálculos de las muestras analizadas.

c) Con respecto al método de Wood, las señales correspondientes al metronidazol y patrón interno, se invierten, como se puede observar en la figura 8.

El método de cuantificación (extracción y condiciones de operación del cromatógrafo) aún cuando orientado por el trabajo de los autores antes mencionados, contiene algunas diferencias:

1) Extracción

1) Para llevar a cabo esta parte, en este trabajo se desproteinizó la muestra antes de comenzar. En tanto que en la literatura (7, 8), desproteinizan con el mismo disolvente de extracción.

2) Midha y col., emplean una mezcla de disolventes (cloruro de metileno-éter etílico) para la extracción. En este punto cabe señalar que Wood no reporta que tipo de cloroformo utiliza en la extracción, mientras que Midha y col., mencionan que deben ser grado espectro. Para el presente estudio se utilizó cloroformo R.A. destilado tres veces por fraccionamiento. Esto se hizo debido a que el cloroformo R.A. presenta muchos picos en el cromatograma; esto debido, a su vez, a una alta concentración de impurezas al manejar grandes volúmenes de cloroformo que deben evaporarse para inyectar en el cromatógrafo aumentando así la cantidad detectada de impurezas no-volátiles.

3) Midha y col., difieren en el reactivo para formar el derivado del metronidazol, así como el patrón interno utilizado.

ii) Condiciones de operación

1) La columna cromatográfica es diferente. Midha y col., utilizan una mezcla de fases líquidas (Apiezon L al 1 %, ultrafase SE-30 al 0.5 % y OV-7 al 5 %); - Wood emplea OV-1 al 3 % y en el presente estudio se utilizó OV-17 al 3 %.

2) Midha y col., operan la columna cromatográfica a una temperatura menor que la de Wood y el presente trabajo.

CONCLUSIONES

Del análisis de lo expuesto en el presente estudio, se deduce que el método desarrollado presenta las siguientes ventajas:

a) El empleo de una muestra libre de proteínas. Logrando con esto una mejor manipulación de la muestra.

b) El uso de una fase líquida y un solo disolvente para la extracción. Con respecto al método de Midha y col., quienes hacen uso de una mezcla de fases líquidas y una combinación de disolventes para la extracción.

c) El uso de frascos viales con base cónica para concentrar la muestra y obtener una mayor sensibilidad del método.

d) La inversión del orden de detección de las señales para el metronidazol sililado y la referencia interna. De esta manera el compuesto cuya señal se encuentra al finalizar la señal del agente sililante, es el patrón interno y no el metronidazol (como en el método de Wood). Esto repercute en una minimización del error debido a la selección de la línea base, al cuantificar.

Tiene como desventajas:

a) El uso de grandes volúmenes de cloroformo, el cual debe ser tridestilado o ser grado espectro. Esto último sería otra desventaja, ya que el reactivo de este grado es costoso.

b) Con respecto a Midha y col., y Wood; la sensibilidad del método es menor, ya que Midha y col., reportan concentraciones detectadas de 0.5 microgramos/ml de metronidazol. En tanto que Wood reporta concentraciones de 0.25 microgramos/ml. (tómese en consideración que Wood emplea 2 - mililitros de plasma para su análisis, mientras que en el caso del método desarrollado por Midha y col., y el presente trabajo se emplea un mililitro de plasma). En el presente estudio se logró detectar concentraciones de 1.0 microgramos/ml de metronidazol en plasma.

Por lo anteriormente expuesto, se piensa que el método que se presenta en este trabajo, es adecuado para la — cuantificación de metronidazol en plasma por cromatografía gas-líquido y es susceptible de mejorarse en caso de que — así se requiera.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Cosar C., and L. Julou
Ann. Inst. Pasteur Paris
96: 238-241 (1959)
- 2) Kane P. O. Mc. Fadzen J. A., Squires S.
British J. Vener. Dis.
37: 276 (1959)
- 3) Taylor J. A., Migliardi J.R, Schach von
Wittenau in G. L. Hobby (editor)
"Antimicrobial Agents and Chemotherapy;
American Society for Microbiology
Bethesda, Md. 1969, P. 267
- 4) Lau E., Yao C., M. Lewis and B. Senkowski
J. Pharm. Sci.
58: 55 (1969)
- 5) De Silva J. A. F., N. Munno and N. Strojny
J. Pharm. Sci.
59: 201 (1971)
- 6) Ralph E. D., Clarke J.
Antimi. Ag. Chem.
6 (6): 691 (1974)
- 7) Midha K. K., J. McGilveray and J. K. Cooper
J. Chromatogr.
87: 491 (1973)
- 8) Wood N. F.
J. Pharm. Sci.
64 (6); 1048 (1975)



- 9) Stambaugh J. E.; L.G. Feo and R. W. Manthei.
J. Pharmacol. Exp. Ther.
161: 373 (1968)
- 10) Mayorga P. E.
Tesis Profesional Q.F.B.
Fac. Química UNAM
Monografía del Metronidazol
1978
- 11) Cosar, C.; Dubost M.; Devoize P. and Palliere M.
Ann. Pharm. Fr.
20: 872 (1962)
- 12) Cannon D. C.; J. H. Richard; J. W. Winkelman.
Clinical Chemistry.
Editorial Harper and Row.
Segunda edición.
1974.



TESIS



Tesis por computadora

Medicina 25 Local 2
Tel. 550-87-98

Frente a la Facultad de Medicina
Ciudad Universitaria

