



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“CUAUTITLAN”

**ESTABLECIMIENTO Y VALIDACION DE UN METODO
ESPECTROFOTOMETRICO ULTRAVIOLETA PARA
DETERMINAR TOLBUTAMIDA EN PLASMA.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
JOSE ANTONIO GARDUÑO ROSAS

DIRECTORA DE TESIS:
Q. F. B. RAQUEL LOPEZ ARELLANO

Cuautitlán Izcalli, México.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

CONTENIDO

INTRODUCCION

OBJETIVOS

GENERALIDADES

PARTE EXPERIMENTAL

RESULTADOS

DISCUSION DE LOS
RESULTADOS

CONCLUSIONES

RESUMEN

APENDICES

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

En la actualidad el análisis farmacéutico se haya extendido a una gran cantidad de materiales, formas de dosificación y muestras biológicas y fundamenta la obtención de resultados de estudios farmacocinéticos y biofarmacéuticos que permiten establecer los criterios necesarios para desarrollar productos farmacéuticos y regímenes de dosificación con bases más racionales.

Por otra parte, muchos de los problemas que limitaban al análisis han ido desapareciendo con ayuda de las técnicas analíticas modernas; sin embargo está claramente establecido que el comportamiento del método analítico depende de varios factores como son la pureza de los reactivos utilizados, el funcionamiento de los instrumentos y aparatos así como su tipo y marca entre algunos otros. Este último aspecto nos lleva a la necesidad de establecer criterios que determinen la confiabilidad de los resultados obtenidos por cualquier método analítico, lo cual es posible mediante la utilización de métodos estadísticos que ayudan a validar los métodos.

Los estudios e investigaciones biofarmacéuticos y farmacocinéticos que se efectúan, aménudo son costosos por lo que es indispensable rodearse de precauciones que permitan obtener resultados confiables que aseguren el rigor de la interpretación². Entre tales precauciones está el contar con un método analítico que sea sensible, para realizar valoraciones todo el tiempo que sea necesario, y específico, para diferenciar al fármaco de sus metabolitos.

La necesidad de tales estudios, más específicamente de bio

disponibilidad y bioequivalencia, nació de la observación que la eficacia terapéutica cambiaba si la especialidad farmacéutica que estaba siendo administrada era cambiada por otra o bien no era de la misma marca comercial²¹.

Esto ha sido también observado en pacientes diabéticos que al estar controlados con tolbutamida, salen de control cuando por alguna causa llegan a cambiar de marca utilizando otra aparentemente equivalente.

Por eso la tolbutamida fue considerada para este estudio de tesis tomando en cuenta además que es usada ampliamente en la población diabética, que su toxicidad es relativamente baja por lo que es el fármaco de elección en muchos casos y también porque se encuentra incluida en los cuadros básicos de la S.S.A., I.S. S.S.T.E. y del I.M.S.S.

OBJETIVOS

- Establecer un método espectrofotométrico para determinar tolbutamida en plasma humano.

- Efectuar la validación del método mediante la determinación de parámetros estadísticos adecuados.

- Decidir las condiciones bajo las cuales el método pueda ser utilizado.

- Concluir sobre la posible utilidad del método en estudios de farmacocinética, biodisponibilidad y bicequivalencia.

GENERALIDADES

Razones, propósitos y necesidad de realizar estudios de validación de técnicas analíticas.⁴

Para comprender qué tanta información debemos obtener al efectuar un estudio de validación, es necesario descubrir la utilidad que tiene así como las razones que impulsan a su realización y los propósitos que se persiguen.

En todo estudio de investigación que sea realizado los métodos tendientes a cuantificar la respuesta medible hoy en día tienen una gran importancia. En muchos estudios es necesario determinar alguna sustancia en el material de estudio, por lo que se debe contar con alguna técnica analítica para hacerlo. Sin embargo, ¿cómo asegurar que los resultados obtenidos son realmente fidedignos? Ante esta pregunta los investigadores han hecho uso de métodos estadísticos modernos para poder conocer y asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos para que valga la pena invertir en la investigación. Asimismo, la confiabilidad de los resultados hace que las interpretaciones que de ellos se deriven tengan mayor grado de validez a la vez que se acercan más a la realidad. De ahí podemos deducir que las razones que llevan a una validación pueden ser de tipo ético y económico.

En el caso que se muestra, validar un método por el cual se determina un fármaco en plasma, las razones éticas pueden ser las siguientes: asegurar la verdad de las interpretaciones sin tratar de engañar, recordando además que mucha de la información que se obtenga será aplicada en beneficio del hombre mismo. El investigador, antes de lanzarse a la realización de un estudio

debe prever la trascendencia que pudiesen tener los resultados que obtenga, por lo tanto no debe aventurarse usando un método del cual no esté seguro de la confianza que pueda depositar en ellos².

Por otro lado, como se dijo anteriormente, las investigaciones se requieren de una inversión, una inversión que necesita ser protegida para no malgastar lo poco o mucho que se tenga. Además, en el caso que se utilicen animales nada justifica el que se les haga sufrir inutilmente y cuando el hombre sea el sujeto experimental esto es más obvio².

Los propósitos que se persiguen han quedado implícitos en cada una de las razones dadas anteriormente por lo que toca lugar el establecimiento de la forma en que se valida.

Punto de vista estadístico de la validación^{29,19}.

Los resultados que pueden obtenerse por medio de una técnica analítica cuantitativa son producto de una medición que, como estimación que es, está sujeta a un error. A ese error lo podemos dividir en dos: el error controlable o error determinado, el cual se debe a una falta de control de calidad y puede ser eliminado; y el error incontrolable o indeterminado, el cual es producido por causas ajenas al investigador por lo cual no puede ser eliminado aunque se esforzase en ello y que además depende del azar. Dado que el error indeterminado es un producto del azar, y es al que propiamente se debe la variación de la medición, es la característica que debe ser validada. Esto es " la validación de un método analítico se refiere a la evaluación cuantitativa del error indeterminado que le es inherente".

La validación de los métodos se especifica por medio de conceptos tales como exactitud, precisión, linealidad, especificidad, reproducibilidad y repetibilidad los cuales quedan descritos por medio de parámetros estadísticos y pruebas estadísticas que los definen. En lo que sigue se dará una breve definición de los conceptos mencionados así como los parámetros estadísticos que los definen.

Exactitud. Es el grado de concordancia entre un valor determinado y un valor de referencia. Su estimación se asocia con la suma del error determinado y el error indeterminado, o sea, con el error total. La exactitud queda definida con la medida de las observaciones que se realicen y el intervalo de confianza al 95% de probabilidad. Debido a que los métodos analíticos se ven limitados por los aparatos e instrumentos que se usen y por las características propias que le rodeen, la exactitud se ve afectada por la concentración del compuesto por evaluar, por lo que se recomienda efectuar la evaluación con al menos tres diferentes concentraciones. La necesidad de tener un valor de referencia hace que en la práctica el compuesto por evaluar sea añadido en cantidades conocidas al material donde va a ser determinado.

Precisión. Es una medida del grado de concordancia entre mediciones repetidas de una misma propiedad. Este término es un poco ambiguo por lo que los autores tienden a darle diferentes interpretaciones. Algunos le llaman precisión pero otros lo expresan como repetición o repetibilidad y como reproducibilidad. Como quiera que sea, el parámetro estadístico que lo define es el coeficiente de variación o desviación estándar relativa.

Sin embargo, la muestra de datos sobre la que se hace la in

ferencia en cada caso es diferente; en el primer caso se trabaja con una sola muestra de datos obtenida por un analista.

La repetición se relaciona con la dispersión de las observaciones al reducir a un mínimo el error determinado, o sea que es la concordancia obtenida entre determinaciones independientes desarrolladas por un mismo analista usando la misma técnica, equipo, reactivos, etc... Los parámetros que la definen son la desviación estándar, el intervalo de confianza y el coeficiente de variación. Este último nos permite comparar diferentes muestras aunque tengan diferente valor medio.

Reproducibilidad. Es el grado de concordancia entre observaciones repetidas cuando se han introducido variaciones en la operación. En este caso el análisis se efectúa con alguna condición diferente para cada muestra de datos obtenida, lo cual permite la distinción de reproducibilidad entre analistas, entre equipo, o entre laboratorios. Los estadísticos que la definen son los mismos que para la repetición.

Especificidad. Es el caso en que la medición es debida únicamente a la sustancia que se quiere determinar y no a otras sustancias, similares o no, que estén presentes en el material que se desea analizar. Si se conoce la sustancia o sustancias que puedan causar interferencias, en la práctica, se añaden junto con la sustancia de interés en cantidades conocidas para observar su efecto. Este aspecto de la validación cobra una importancia radical en los estudios de estabilidad y en el análisis en fluidos biológicos para estudios farmacocinéticos o de biodisponibilidad. En este caso la especificidad se establece comparando las muestras y tratando de ver si la diferencia que pueda e-

xistir entre ellas es significativa. Tal comparación se hace mediante una prueba de hipótesis, suponiendo que la diferencia presenta una distribución de t-Student y asumiendo que las muestras provienen de la misma población.

Linealidad. Es la medición del grado en que una curva de calibración se aproxima a una línea recta o bien, el grado en que la susceptividad es constante. La susceptividad del método se define como la relación entre la pendiente de una curva de calibración y la variabilidad de los puntos experimentales. Dicho en palabras más simples, la linealidad es la medida en que los puntos experimentales se aproximan a una línea recta cuando las variables que se manejan son la concentración o cantidad añadida a la materia que se analiza y la concentración o cantidad medida mediante el análisis.

Los parámetros estadísticos por los cuales se establece la linealidad son la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación, el error estándar de la regresión y la sensibilidad.

Límite de detección. También es llamado sensibilidad y se refiere a la menor cantidad del compuesto que puede ser determinada al analizar el material de interés.

El límite de detección se determina con los límites de confianza de la recta de regresión al graficar la cantidad adicionada contra la respuesta medida. Se traza una paralela de la recta a una distancia de $-1.96 S_{y/x}$ (límite inferior de confianza) y el intercepto con la señal dada por el ruido nos señalará la sensibilidad del método.

Estabilidad de la muestra. En el caso de métodos para fluidos biológicos se debe mostrar si los cambios físicos o químicos

de la muestra alteran la determinación de la sustancia de interés. Si hay alteración, se deben establecer las condiciones de almacenamiento adecuadas para las muestras.

La forma exacta por la que se puede efectuar la validación de una técnica analítica varía dependiendo de la naturaleza y el uso que se le vaya a dar. Asimismo los parámetros mínimos que se requieren pueden no ser los mismos para cada caso en particular. En el caso presente los parámetros mínimos son los siguientes: linealidad, límite de detección, precisión y exactitud, reproducibilidad, especificidad y estabilidad de la muestra.

MONOGRAFIA DE LA TOLBUTAMIDA.

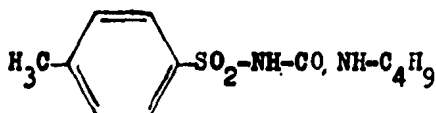
Nombres químicos y sinónimos^{6,22,30,36.}

1-Butil-3-(p-tolilsulfonil) urea, N-(butilamino)-4-metilbencensulfonamida, N-(4-metil-bencensulfonil)-N'-n-butil urea, tolilsulfonilbutilurea, N-(p-tolil-4-sulfonil)-1-butilurea, N-(sulfonil-p-metilbencen)-N'-n-butilurea, 1-butil-3-tosilurea; "butamid", tolbutilurea, D-860, HIS-831, U-2043, "arcosal", "artotin", "diabetol", "diabaton", "dolipol", "glicotron", "glycotrón", "hipoglicone", "mobenol", "orabet", "oralin", "orinase", "promidex", "rastinon", tolbet, "tolvino", "neo-norboral", "tolbugen", "tolbumid", "yosulan" y tolglitbutamida.

Fórmula condensada^{36.}



Fórmula desarrollada^{6.}



Peso molecular^{36.}

270.35

Descripción.^{6,36}

Polvo cristalino blanco o prácticamente blanco que tiene un ligero sabor amargo y es prácticamente inodoro.

Propiedades físicas^{17,28}.

Solubilidad. Prácticamente insoluble en agua pero forma sales solubles en soluciones alcalinas. Soluble en alcohol y en cloroformo. Es soluble 7.8 a 1 en tolueno 4.4 a 1 en una mezcla acetato de etilo:heptano en proporción de 1:3.

Rango de fusión^{6,17}.

126-130°, 126-132° ó 128.5-129.5 .

Propiedades cristalinas¹⁷.

Morfología cristalina: ortorrombica y piramidal rómbica.
Cociente axial: 0.454:1:0:0.3864 .

Propiedades ópticas: índices de refracción 1.544, 1.556 y 1.604; media geométrica de 1.562; refracción molecular 69.4 (observada) y 70.4 (calculada); ángulo axial óptico de 38°.

Espectro ultravioleta^{5,17}.

El espectro obtenido con una celda de 1 cm usando como solvente metanol y a una concentración de 10 mcg/ml exhibe un máximo a 228 nm²¹. En etanol a las mismas condiciones se tiene un máximo a 228 nm ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$, lcm 500), a 257 nm ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$, lcm 22) a 262 nm ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$, l cm 26), a 267 nm ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$, lcm 25) y a 274 nm ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$, lcm 22).

Ensayos de identidad³⁶.

A. El espectro de absorción al infrarrojo de una dispersión de tolbutamida en aceite mineral exhibe un máximo a la misma longitud de onda que una preparación con tolbutamida USP estándar.

B. Añada 200 mg de tolbutamida a 16 ml de ácido sulfúrico

18 N y ponga a reflujo durante 30 minutos. Alcalinice la solución con hidróxido de sodio 1:5 y destile en baño de vapor por 30 minutos recibiendo el destilado en 20 ml de ácido clorhídrico 0.1 N. A un ml de la mezcla del destilado añada 100 mg de acetato de sodio y 10 ml de solución amortiguadora de boratos alcalinos de pH 9.4. Enfríe la solución en baño de hielo por 10 minutos y añada un ml de p/nitroanilina, deje reposar durante 20 minutos y agregue a gotas 2 ml de hidróxido de sodio; se debe producir una coloración naranja.

Pérdida al secado³⁶.

Secada por 3 horas a 105°, la tolbutamida no pierde más del 0.5% de su peso.

Ensayo³⁶.

La tolbutamida no contiene menos del 96% y no más del 101% de $C_{12}H_{18}N_2O_3S$ calculado sobre base seca.

Se disuelven 500 mg de tolbutamida en 30 ml de alcohol neutralizado; se añaden 20 ml de agua y unas gotas de fenoltaleína TS. Se titula con hidróxido de sodio 0.1 N S.V. Cada ml de hidróxido de sodio 0.1 N equivale a 27.04 mg de $C_{12}H_{18}N_2O_3S$.

Empaque y almacenamiento.

La tolbutamida se debe conservar en recipientes bien cerrados.

Estándar de referencia³⁶.

Como estándar de referencia se usa tolbutamida USP estándar -

dar secada a 105°C durante 3 horas.

Categoría⁵.

Hipoglicemiante oral.

Acciones y efectos farmacológicos²⁵.

El efecto principal de la tolbutamida es el hipoglicemiante, el cual se acompaña de un incremento del nivel de insulina plasmática y disminución del contenido insulínico del páncreas. A dosis grandes parece que hay efectos sobre la producción de glucosa.

Los efectos periféricos metabólicos son semejantes pero no exactamente iguales a los que produce la insulina administrada parenteralmente; esto se debe a que la insulina endógena es liberada por acción de la tolbutamida en pequeñas cantidades pasando primero por el hígado antes de alcanzar la circulación general. Entre esos efectos tenemos los aumentos de la secreción de insulina⁷, captación de glucosa por tejidos periféricos, del glucógeno hepático, fosforilación oxidativa y la disminución de la gluconeogénesis en el hígado y de la gluconeogénesis¹⁵. La insulina parenteralmente administrada no induce la liberación de insulina endógena²⁵.

El efecto de la tolbutamida puede variar en el transcurso del día¹⁶. Se ha observado que en la mañana el efecto es más agudo pero menos duradero y por la tarde es más moderado pero prolongado. Esto se debe tal vez a cambios en la sensibilidad de las células beta, además de la presencia de respuestas compensatorias de la hipoglicemia²².

Otro efecto de la tolbutamida es la inhibición de la lipólisis en las células de tejido graso y otros tejidos y la disminución de los ácidos grasos libres⁸.

La tolbutamida mejora la tolerancia a la glucosa y muchos estudios muestran que su acción se debe a que produce la liberación de insulina pancreática al provocar la degranulación de las células beta¹⁵. Tal liberación se efectúa con o sin producción normal de insulina y mediante un mecanismo diferente al que es producido por la glucosa³⁷.

Intervalo de concentraciones terapéuticas³⁰.

De 50 a 100 mcg/ml.

Efectos adversos^{6, 14, 25}.

La mayoría de los efectos adversos se relacionan con la sensibilización de la piel (erupción cutánea por ejemplo) y disturbios gastrointestinales como pirosis y dolor abdominal. También, aunque más raramente, se presentan efectos sobre la sangre (leucopenia) y acciones antitiroideas, así como en el S.N.C., confusión, ataxia, debilidad e ictericia obstructiva.

Farmacocinética.

Absorción. La absorción de la tolbutamida desde el intestino es buena y virtualmente llega a ser completa⁴⁰, sin embargo, se encuentra limitada por su velocidad de disolución en el fluido gastrointestinal por lo que los factores de formulación farmacéutica pueden modificar la velocidad de este proceso.²¹

La lenta absorción de la tolbutamida explica el hecho que

las respuestas clínicas a dosis diarias sean mejores que las que se esperarían de un fármaco con vida media tan corta³⁸.

La velocidad de absorción de la tolbutamida influye sobre la velocidad de declinación de los niveles de la glucosa en la sangre²⁷.

Distribución y unión a proteínas. Los resultados de diversos estudios apoyan la observación que la tolbutamida se distribuye en el líquido extracelular²⁵, con un volumen de distribución aparente de aproximadamente 8 a 10 litros. Los niveles de tolbutamida en líquidos extracelulares, como edema, líquido ascítico y pleura son más bajos que los del plasma³⁸.

La unión a proteínas plasmáticas de este fármaco es extensa y es afectada por la concentración de albúmina, lo cual hace variar la distribución aparente y su cinética de eliminación. Asimismo, la edad no afecta la unión a proteínas¹.

Eliminación. Su forma más importante de eliminación es el metabolismo³⁰. Los metabolitos producidos, la hidroxitolbutamida y la carboxitolbutamida, son inactivos^{14, 20}. El metabolito principal es el derivado carboxílico e incluso algunos autores indican que es el único⁹ y es excretado cuantitativamente por el riñón 12 veces más rápido de lo que es producido²⁷.

Algunos de los tiempos de vida media biológica reportados son: 5.6 h¹⁴, 4 a 6 h²⁵, 4.7 h¹⁸, 4.7 +/- 0.6 en sujetos sanos y en diabéticos³⁵, 7.8 a 11.2 h en pacientes cirróticos³⁵, 5.7 h tras una administración oral; y unos autores determinaron 6.3 y 7.6 h en una distribución aparentemente bicompartamental³¹.

Usos.

Generalmente es el fármaco de elección para el tratamiento de la diabetes que se inicia en la madurez, en pacientes cuyo páncreas aún tiene cantidades sustanciales de insulina^{1, 12}. Es el más benigno y el menos potente pero el más seguro para su administración, sobre todo si el paciente tiene daño renal^{14, 39, 40}.

Es útil, en forma de sal sódica, en pruebas de diagnóstico exploratorio. Su uso solo se recomienda para pacientes que no pueden ser controlados con una dieta adecuada y/o que no aceptan la insulina. También es utilizada para escudriñar pacientes con normalidades fronterizas de la prueba de la glucosa.

Presentaciones²⁵.

La tolbutamida se encuentra en el mercado en tabletas de 0.5 y 1.0 g, y en cápsulas de 0.25 y 0.5 g.

Dosis Terapéuticas^{22, 25}.

Para iniciar la terapia se pueden dar 4 g. al día repartidos en partes de 1g. Las dosis de mantenimiento son 0.5-3.0 g. Para las pruebas de diagnóstico usualmente se usa 1 g. de tolbutamida sódica.

Dosis efectivas^{15, 38, 40}.

La dosis efectiva está entre 20 y 30 mg/Kg, i.v.

Toxicología.

La DL50 en ratas es de 2,344 mg/Kg y de 1,234 mg/Kg en ratones, oral e intraperitoneal respectivamente. Dosis tan altas co-

mo 1000 mg/Kg en ratas produce hígado graso sin causar degeneración celular¹⁷. Igual dosis en el perro no produce daños en los órganos internos aún al administrarla durante 9 meses. Tal dosis en ratas, administrada por 12 semanas ni destruye las células beta ni produce estado exhausto de las mismas.

Los efectos tóxicos en humanos pueden incluir sensibilización de la piel, disturbios gastrointestinales, debilidad, parestesias, dolor de cabeza, intolerancia al alcohol e ictericia obstructiva. Algunas veces se han reportado discrasias sanguíneas incluyendo agranulocitosis, leucopenia, trombocitopenia, eosinofilia y pancitopenia^{6, 12, 25}.

Interacciones^{13, 33}.

Algunos fármacos sinergizan la acción de la tolbutamida incrementando el riesgo de un choque hipoglucémico. Entre tales fármacos tenemos a la insulina, sulfonamidas, tanderil, salicilatos, benemid, inhibidores de la monoamino oxidasa, butazolidina, dicumarol y analexina. El dicumarol potencia la acción de la tolbutamida interfiriendo en su metabolismo; de igual modo actúa la analexina, mientras que la butazolidina actúa desplazandola de los sitios de enlace en las proteínas. La bishidroxycumarina también potencia la acción de éste fármaco inhibiendo su metabolismo.

La tolbutamida interfiere con el alcohol de la misma manera que el disulfiram y produce una prolongación de los efectos de los barbituratos.

Algunos fármacos que antagonizan los efectos de la tolbutamida son los agentes bloqueadores beta adrenérgicos y la rifampina.

cina. Esta última reduce el efecto en un 30-49% al producir una reducción de la vida media biológica en un 43%.

Métodos de determinación analítica^{10, 17, 23, 30, 31, 34}.

Métodos colorimétricos. Mc Donald y Sawinski desarrollaron un método basado en la reacción de la tolbutamida con beta naf-tol y nitrito de sodio en ácido sulfúrico concentrado, para formar un compuesto rojo. El método es aplicable en un intervalo de concentraciones de 10 a 50 mcg/ml.

Otro método, reportado por Chulski, para determinar tolbutamida en suero, previa extracción del suero acidificado, con cloroformo y eliminación con cloroformo a sequedad, se basa en la reacción con p-N-dimetilaminobenzamida y leyendo la absorban-cia a 350 nm. El porcentaje de recuperación reportado fue de 100 +/- 5 por ciento.

El método de Matin y Rowland se basa en la extracción de la tolbutamida en 0.5 ml de suero acidificado con solución amorti-guadora de fosfatos. Utilizaron para la extracción hexano con al-cohol isoamílico al 0.5%, reextrajeron con solución de hidróxido de sodio y posteriormente reextrajeron con acetato de pentilo tras previa acidificación para producir una reacción con dinitro fluorobenceno. El compuesto producido es leído a 420 nm. Estos autores reportaron una sensibilidad hasta 10 mcg/ml. Los coefi-cientes de variación a 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 40 y 50 mcg/ml son respectivamente 19, 36, 16, 14, 6, 6, 9 y 7%.

Métodos espectrofotométricos ultravioleta. Spingler y Kai-ser utilizaron suero liofilizado para determinar tolbutamida. Acidificaron el liofilizado y reextrajeron con acetato de etilo

al cual eliminaron reduciendo a sequedad, restituyeron con etanol y determinaron la absorción a 228 y 280 nm. Determinaron un factor de corrección para obtener la concentración correcta.

Forist et. al. usando ácido fosfórico M/15 para acidificar el plasma, extrajeron la tolbutamida con cloroformo; evaporaron a sequedad, restituyeron con alcohol y después de un tratamiento con carbón activado leyeron a 228 nm. Demostraron que a esa longitud de onda la p-toluensulfonamida y el ácido p-toluen-sulfónico no interfieren en la determinación. Asimismo encontraron que se obedecía la ley de Beer en un intervalo de concentraciones de 0-24 mcg/ml y que usando un factor de corrección debería encontrarse la concentración real. La acidificación del plasma con ácido fosfórico permitió efectuar una buena extracción (95-100%) sin incrementar la absorbancia del blanco.

El método de Toolan y Wagner, modificado, permite la determinación de tolbutamida. En este método se acidifica el plasma con ácido fosfórico 0.067 M, se extrae con cloroformo, se reextrae con carbonato de sodio y se le acidifica para tomar la lectura de absorbancia a 228 nm.

Métodos cromatográficos. Sued et. al. usaron una columna con detector U.V. para determinar tolbutamida por CIAP. Usaron plasma acidificado, extrajeron con éter y realizaron la lectura de absorbancia a 254 nm. Determinaron una sensibilidad del método de 5 mcg/ml.

Nation et. al. precipitaron las proteínas del plasma con acetato de nitrilo y realizaron un análisis directo por CIAP, determinando simultáneamente tolbutamida y carboxitolbutamida leyendo a 230 y 200 nm. Su método mostró un límite de detección de 0.5 mcg/ml usando 0.1 ml de plasma.

Matin y Rowland determinaron tolbutamida por cromatografía de gases. Ellos acidificaron con fosfato diácido de sodio 0.255 M el plasma, extrajeron con hexano y alcohol isoamílico. Separaron una muestra de la fase orgánica y reextrajeron con hidróxido de sodio 1 N. Luego acidificaron una alícuota de la fase acuosa con ácido clorhídrico 2N y reextrajeron con acetato de pentilo para pasarlo por la columna. Determinaron que los coeficientes de variación, para las concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 30 mcg/ml fueron respectivamente 0.7, 0.7, 1.2, 2.9 y 6.4 . El límite de detección fue de 1 mcg/ml.

Propiedades de la carboxitolbutamida^{14, 18, 26}.

Peso molecular: 149.1

pKa: 3.54

pKa': 5.2 en etanol al 45% y 6.2 en etanol al 43%.

Solubilidad: es altamente soluble en el intervalo de pH urinario. Su solubilidad aumenta con el pH: es de 2.8 mg/ml a pH 5, de 20 mg/ml a pH 5.5 y 300 mg/ml a pH 6. A 37°C su solubilidad se relaciona con la de la tolbutamida de la siguiente manera: 13 a 1 a pH 5, 60 a 1 a pH 5.5 y 350 a 1 a pH 6.

PARTE EXPERIMENTAL

El fármaco utilizado en este estudio es la tolbutamida. El trabajo experimental consistió en el establecimiento y la validación del método analítico espectrofotométrico U.V. para determinar la concentración de la tolbutamida en plasma humano.

El método fue establecido a partir de la información obtenida en la bibliografía y por medio de ensayos para determinar el porcentaje de recuperación del método.

Para todo el estudio se consideró la concentración de 75 mcg/ml, que es la concentración media del intervalo terapéutico, como la concentración correspondiente al 100% y a partir de ella se establecieron las demás concentraciones porcentuales.

METODO ANALITICO.

Aparatos: Espectrofotómetro Bausch & Lomb Spectronic 850, agitador Vortex-Genie, balanza analítica y celdas de cuarzo.

Material: Tubos de ensayo de 20 ml; pipetas volumétricas de 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 y 25 ml; gradillas; matraces aforados de 200, 100, 50 y 25 ml; vasos de precipitado de 50 y 100 ml y una micropipeta de 10 microlitros.

Reactivos: Solución stock de tolbutamida de concentración 12 mg/ml; solución stock de tolbutamida en plasma de concentración 375 mcg/ml; mezcla de hexano con alcohol isoamílico el 2%; hidróxido de sodio 0.5 N, ácido clorhídrico 2.0 N y solución de fosfato diácido de sodio al 15% p/v.

Procedimiento:

1. Se coloca 1 ml de plasma en un tubo de ensayo que contenga 2 ml de la solución de fosfatos y se agita.
2. Al plasma acidificado se añaden 10 ml de hexano-alcohol isoamílico al 2% y se agita en el Vortex durante 2 minutos.
3. Se deja reposar hasta la separación de las fases.
4. Se transfiere una alícuota de 5 ml de la fase orgánica a otro tubo de ensayo que contenga 4 ml de NaOH 0.5 N y se agita por 2 minutos en Vortex.
5. Se deja reposar hasta que se separen las fases y se centrifuga de ser necesario.
6. Se transfiere una alícuota de 3 ml de la fase acuosa a otro tubo de ensayo.
7. Se agrega 1 ml de ácido clorhídrico 2.0 N y se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 228 nm.
8. Se determina la concentración de tolbutamida en el plasma aplicando la siguiente fórmula:

$$C_p = \frac{C_{est.}}{M} \times \frac{160}{15}$$

donde: $C_{est.}$: es la concentración estimada en la curva estándar según la lectura dada por el problema. Esta lectura es la diferencia contra un blanco.

M : número de mililitros utilizados para el análisis. En este caso siempre fue de 1.

160/15 : es el factor de dilución.

CURVA ESTANDAR.

Para establecer la curva estándar se preparó una solución stock de tolbutamida de concentración 12 mg/ml, disolviendo 600 mg de tolbutamida con suficiente solución de hidróxido de sodio 0.1 N y llevando a un volumen final de 50 ml en un matras volumétrico disponible. De esta solución se hicieron diluciones tomando 1, 2, 4, 5, 8 y 10 ml respectivamente y llevandolos a un volumen final de 25 ml con agua destilada.

Por otra parte se efectuaron extracciones en plasma libre de tolbutamida y después de agregar el ácido clorhídrico al final del procedimiento, se agregaron 10 microlitros a cada extracto de c/u de las diluciones anteriores. Con esto se lograron concentraciones de 1.2, 2.4, 4.8, 6.0, 9.6 y 12 mcg/ml respectivamente y se leyó en el espectro a 228 nm.

La curva fue hecha tres veces, una vez en tres días distintos con tres repeticiones para cada concentración.

VALIDACION.

Exactitud, linealidad y repetibilidad. Estos parámetros de la validación se determinaron mediante el análisis de muestras de plasma que contenían el 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60 y 50 por ciento de la concentración media terapéutica. Se efectuaron 10 determinaciones para cada concentración.

Reproducibilidad. Este aspecto de la validación se estableció usando las concentraciones del 50 y el 100 por ciento. Dos analistas efectuaron 10 determinaciones para cada concentración en un mismo día para evitar introducir más variabilidad en los ensayos.

Sensibilidad. El límite de detección del método fue determinado mediante el análisis de muestras de plasma conteniendo tolbutamida en concentraciones de 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 y 25% de 75 mcg/ml. Al igual que antes, se hicieron 10 determinaciones por concentración.

Aparte de los anteriores parámetros también se determinó la estabilidad de la muestra preparando plasma a una concentración del 100 por ciento y almacenándolo a 0°C. Durante una semana. Cada día se efectuaron 10 determinaciones de la concentración de tolbutamida y luego 10 determinaciones a los 15 días.

Asimismo, la variabilidad entre días fue establecida efectuando 10 determinaciones a una concentración del 100% por cinco días consecutivos.

La especificidad no fue establecida experimentalmente debido a la imposibilidad de obtener carboxitolbutamida e hidroxitolbutamida, que son las sustancias que posiblemente podrían interferir en el análisis. Esto se discute más adelante.

PREPARACION DE MUESTRAS.

Se preparó una solución stock de plasma con tolbutamida di solviendo en un matras volumétrico de 200 ml, 75 mg de tolbutamida estándar con la cantidad mínima posible de hidróxido de so dio 0.1 N y llevando al volumen con plasma.

De la solución anterior se prepararon diluciones para las concentraciones del 50 al 150 por ciento de la siguiente manera: se tomaron 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 ml de la solución stock, se colocaron en respectivos matraces volumétricos de

50 ml y se llevó a la marca con plasma.

Las muestras para las concentraciones porcentuales de 1, 2, 4, 6, 8, 12, 15, 20 y 25 por ciento se prepararon como sigue: Se preparó una primera dilución poniendo 5 ml de la solución stock en un matraz volumétrico de 100 ml, se aforó con plasma y así se obtuvo la solución del 25% de concentración; las demás se obtuvieron tomando de esta última solución volúmenes de 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 y 20 ml poniéndolas en matraces volumétricos de 25 ml y llevando a la marca con plasma.

RESULTADOS.

Los resultados puntuales obtenidos para las curvas estándares se muestran en el apéndice. En las tablas I, II y III de abajo se encuentran reportados los estadísticos para cada concentración y día, y en la gráfica 1, la curva utilizada para el estudio, la cual fue efectuada con los promedios totales.

TABLA I.

Datos de la primera curva de calibración (día 1).

C (mcg/ml)	\bar{A}	S X 10 ³	C.V.	
1.2	0.05933	4.16	7.010	r = 0.99948
2.4	0.10933	2.30	2.110	r ² = 0.99895
4.8	0.23533	5.77	0.245	m = 0.04997
6.0	0.28800	1.00	0.347	y ₀ = 3.2 X 10 ⁻³
9.6	0.48466	4.04	0.834	Sy/x = 6.725 X 10 ⁻³
12.0	0.58900	1.73	0.294	

TABLA II.

Datos de la segunda curva de calibración (día 2)

C (mcg/ml)	\bar{A}	S X 10 ³	C.V.	
1.2	0.06066	2.51	4.148	r = 0.99952
2.4	0.10767	7.02	6.520	r ² = 0.99904
4.8	0.23767	9.29	3.910	m = 0.05007
6.0	0.28800	2.00	0.694	y ₀ = -0.00561
9.6	0.40267	4.04	0.837	Sy/x = 6.46 X 10 ⁻³
12.0	0.59200	4.58	0.774	

TABLA III.

Datos de la tercera curva de calibración (día 3)

C (mcg/ml)	\bar{A}	S X 10 ³	C.V.	
1.2	0.06266	4.73	7.54	r = 0.99947
2.4	0.10933	1.53	1.40	r ² = 0.99890
4.8	0.23666	2.51	1.06	m = 0.049935
6.0	0.28533	4.51	1.58	y ₀ = -2.915 X 10 ⁻³
9.6	0.48466	4.51	0.93	Sy/x = 7.66 X 10 ⁻³
12.0	0.59133	3.21	0.54	

Se efectuó una prueba de t-Student para ver si había diferencia significativa entre las rectas. Los resultados de las pruebas se muestran en la tabla IV.

TABLA IV.

Resultados de la prueba de t-Student.

Curvas	t calculada	t crítica (0.05; g.l.=8)
1 y 2	0.0128 ^{NS}	2.31
2 y 3	0.0196 ^{NS}	2.31
1 y 3	0.0184 ^{NS}	2.31

Los datos obtenidos en cada prueba para las 10 determinaciones de cada concentración en el intervalo de 50 al 150 por ciento, se encuentran en el apéndice. Como se notará, tales resultados han sido anotados como porcentaje de recobro y como microgramos por mililitro determinados; de esta manera, es posible trabajar con ambos grupos de datos para establecer la exactitud, precisión (repetibilidad) y linealidad del método.

En la tabla V. se muestran los estadísticos de los porcentajes de recobro y en la gráfica 2, la curva de regresión a partir de los datos de microgramos determinados.

TABLA V.

C (mcg/ml)	%	Prom. (\bar{x})	S	C.V.	$S\bar{x}$	I.C. $\bar{x} \pm$	$t_{cal.}$
112.5	150	100.020	1.719	1.712	0.544	1.228	0.040 ^{NS}
105.0	140	99.580	1.610	1.616	0.815	1.841	0.510 ^{NS}
97.5	130	99.550	1.320	1.325	0.417	0.943	1.067 ^{NS}
90.0	120	99.100	1.115	1.126	0.352	0.797	2.539 ^{S+}
82.5	110	99.435	1.085	1.092	0.343	0.775	1.646 ^{NS}
75.0	100	99.367	1.119	1.127	0.354	0.800	1.789 ^{NS}
67.5	90	99.622	1.910	1.920	0.664	1.501	0.569 ^{NS}
60.0	80	98.043	1.994	2.034	0.631	1.425	3.106 ^{S+}
52.5	70	98.555	1.397	1.412	0.442	0.998	3.200 ^{S+}
45.0	60	98.853	1.960	1.983	0.620	1.401	1.850 ^{NS}
37.5	50	98.508	1.990	2.020	0.629	1.422	2.170 ^{NS}

% : concentración porcentual.

Prom : media de los porcentajes de recobro.

S : desviación estándar.

C.V. : desviación estándar relativa ó coeficiente de variación.

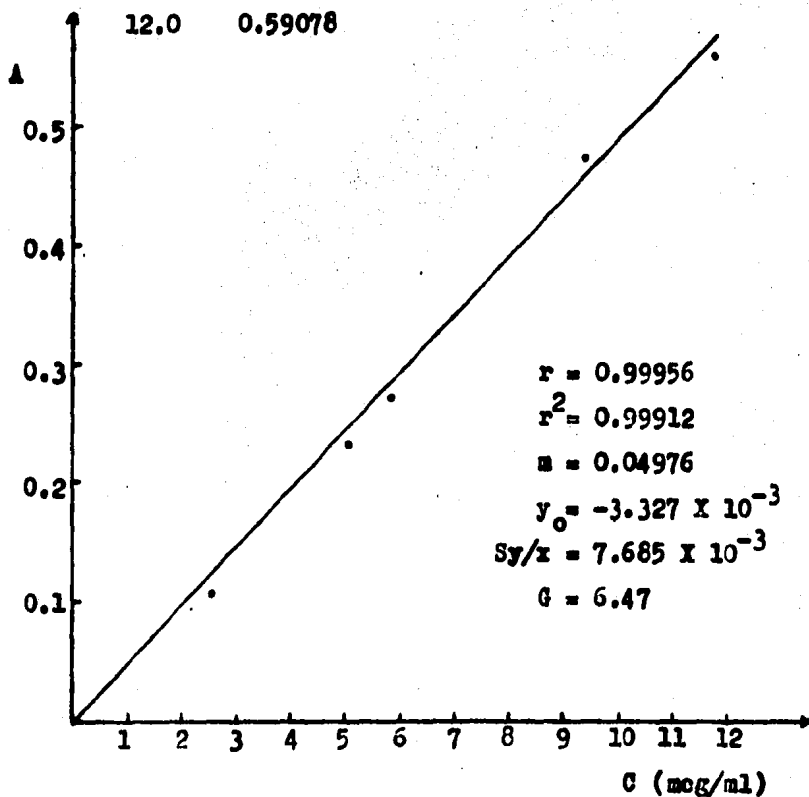
$S\bar{x}$: desviación estándar de las medias muestrales.

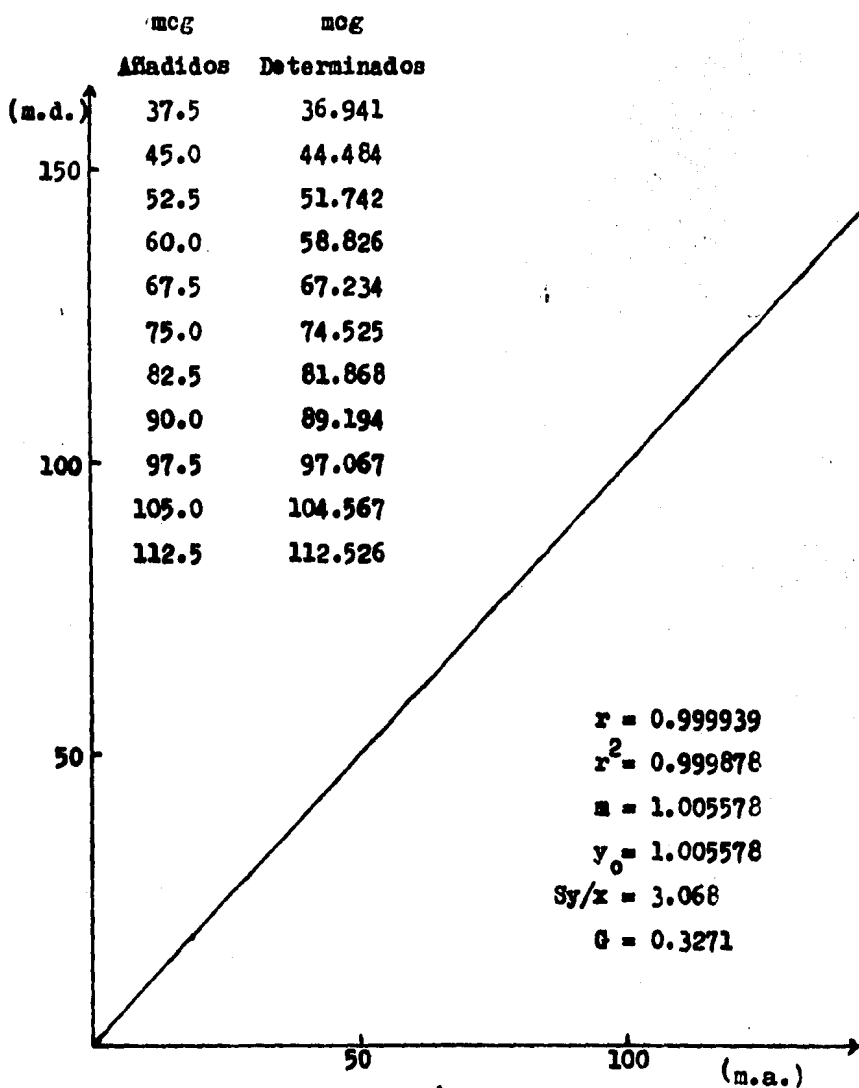
I.C. : intervalo de confianza al 95%.

$t_{cal.}$: valor de t calculado tomando al 100% como la media poblacional. $t_{0.05; g.l.=9} = 2.26$; $t_{0.01; g.l.=9} = 3.25$

GRAFICA 1. Curva de calibración. Concentración (abcisas) contra absorbancia (ordenadas).

C (mcg/ml)	\bar{A}
1.2	0.06089
2.4	0.10878
4.8	0.23655
6.0	0.28711
9.6	0.48400
12.0	0.59078





GRAFICA 2. Linealidad del método para determinar tolbutamida en plasma. Se encuentran graficados los mcg determinados (m.d.) en función de los mcg añadidos por ml (m.a.).

En la tabla VI. se muestran los datos de la prueba del análisis de la varianza hecha a partir de los datos de porcentajes de recuperación de la tabla B del apéndice, o sea, con los resultados del porcentaje de recuperación de todas las muestras analizadas para determinar la linealidad, exactitud y precisión.

TABLA VI.

Tabla del análisis de la varianza considerando un modelo lineal con un criterio de clasificación. El criterio de clasificación es la concentración. Se hicieron 10 repeticiones con 11 niveles del factor.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F _{exp}
CONCENTRACION	10	35.4573	3.5457	1.3745 ^{NS}
ERROR EXPERIMENTAL	99	255.3340	2.5791	
TOTAL	109	290.7913	2.6678	

El valor crítico de F para una probabilidad del 95%, es decir, con un nivel de significancia de 0.05 y con (10,99) grados de libertad es de 1.93¹⁹.

Los resultados obtenidos por dos analistas, que trabajaron las mismas muestras con dos concentraciones diferentes y obteniendo 10 repeticiones, se encuentran en la tabla VII. Con estos datos se puede evaluar la reproducibilidad del método.

TABLA VII.

Resultados obtenidos por dos analistas organizados en una matriz de tratamientos de un diseño factorial de 2X2. Se tienen 10 repeticiones para cada tratamiento.

CONCENTRACION PORCENTUAL	ANALISTA			
	A		B	
50%	97.57	96.99	95.70	97.57
	101.66	98.74	98.74	101.66
	94.65	99.91	95.70	96.99
	96.99	99.91	94.65	94.65
	99.33	99.33	101.66	99.91
	<hr/>		<hr/>	
	Totales:	985.08	991.57	
	98.49	99.95	95.30	100.83
	100.83	99.66	101.12	99.66
	101.12	97.32	101.12	99.66
97.65	98.78	102.80	98.40	
98.40	99.37	99.37	97.32	
<hr/>		<hr/>		
	977.23	992.58		

A los datos de la tabla VII se les hizo el análisis de la varianza considerando un modelo estadístico lineal. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

TABLA VIII.

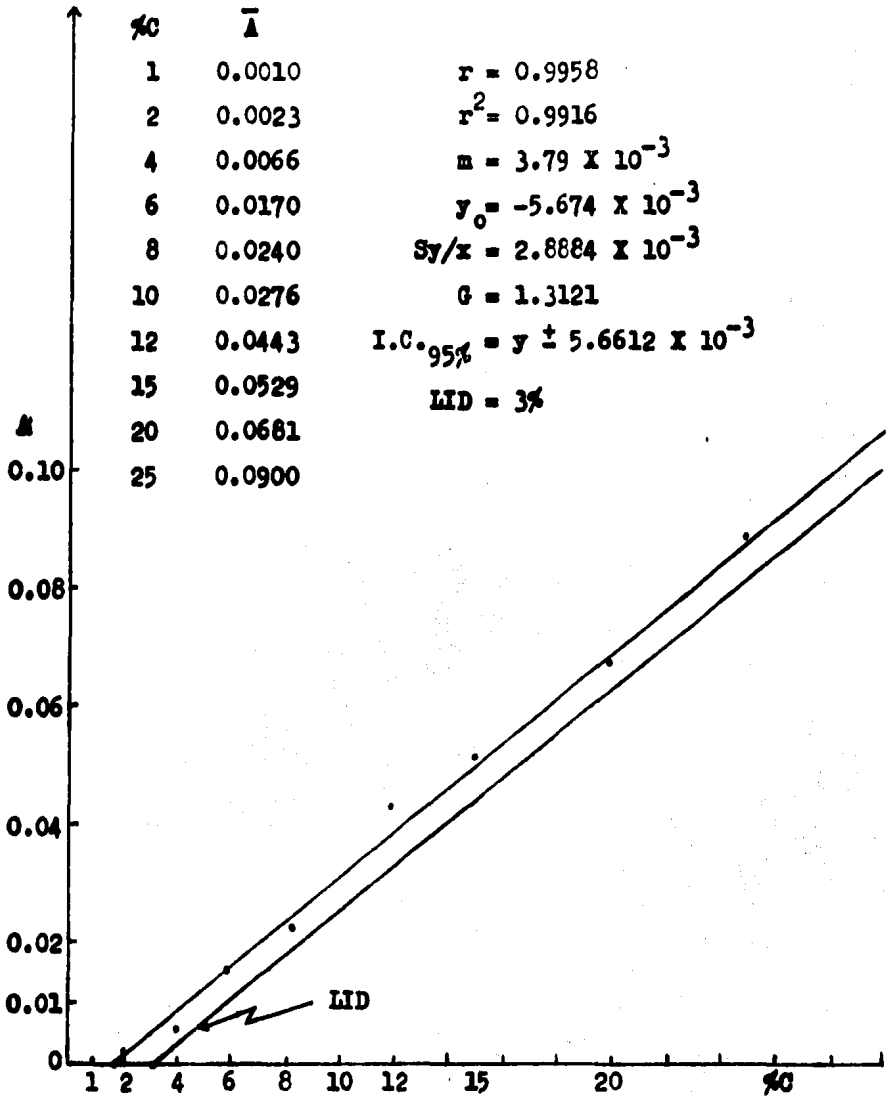
Tabla del análisis de la varianza de los datos de la tabla VII. Se consideran dos factores fijos: analista y concentración porcentual; así como dos niveles para cada factor. La variable de respuesta está dada en porcentaje de recuperación.

Fuente de variación	G.L.	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F _{cal.}	F _{0.95;1,36.}
ANALISTA	1	1.16963	1.16953	0.222 ^{NS}	4.11
CONCENTRACION	1	11.92466	11.92466	2.263 ^{IS}	4.11
INTERACCION	1	1.96247	1.96247	0.373 ^{NS}	4.11
E. EXP.	36	189.67160	5.26860		

Para la determinación del límite inferior de detección se analizaron muestras con concentraciones porcentuales del 1 al 25 por ciento. Los resultados individuales obtenidos se encuentran reportados en la tabla C del apéndice.

El tratamiento que se les dió a los datos es el siguiente: se determinó la media de las absorbancias para cada concentración; se trazó una recta de regresión graficando en el eje de las abcisas la concentración conocida y en el eje de las ordenadas la media de las absorbancias. Se encuentran los límites de confianza de la recta obtenida y se traza otra recta paralela a la anterior a una distancia de $-1.96 S_y/x$ (que corresponde al límite inferior de confianza). El intercepto de esta última recta con el eje de las abcisas nos indica el límite inferior de detección³⁸.

En la gráfica 3 se encuentran los resultados promedio y la recta de regresión para determinar el límite de detección.



GRAFICA 3. Límite de detección del método (LID).

Los resultados individuales obtenidos para la muestra en estabilidad, se encuentran en la tabla D del apéndice. En la tabla siguiente se encuentran los estadísticos que se obtuvieron para cada muestra.

TABLA IX.

Estadísticos de la muestra en estabilidad.

	DIA 1.	DIA 2.	DIA 3.	DIA 4.	DIA 5.	DIA 6.	DIA 7.
\bar{x}	99.161	99.347	98.338	96.920	96.423	97.110	96.554
S	1.948	1.682	3.264	5.175	5.230	1.592	4.543
C.V.	1.960	1.693	3.319	5.339	5.424	1.640	4.700

Para determinar el efecto del paso de los días sobre la variable de respuesta, se realizó el análisis de la varianza a los datos. Los resultados son los siguientes.

TABLA X.

Tabla del análisis de la varianza de los datos de la tabla D del apéndice.

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F _{cal.}	F _{0.95;6,70}
DIAS	6	91.46051	15.2434	1.120 ^{HS}	2.23
E. EXP.	63	851.33399	13.5130		
VARIABILIDAD TOTAL: S = 3.69 C.V.=3.78					
VARIABILIDAD DENTRO DE DIAS : S = 1.415 C.V. 1.424					

Los resultados individuales de las pruebas de la variabilidad entre días se encuentran en la tabla XI, en la cual se incluyen los estadísticos de cada muestra.

TABLA XI. Porcentajes de recuperación desde las muestras plasmáticas a una concentración del 100% preparadas en cinco días diferentes.

	DIA 1.	DIA 2.	DIA 3.	DIA 4.	DIA 5.
	98.53	98.49	99.67	102.10	96.18
	98.42	98.78	100.96	98.04	103.78
	99.39	99.37	102.96	101.64	99.60
	99.64	99.95	100.58	101.64	97.49
	100.09	99.66	102.71	100.94	103.78
	102.08	100.83	99.77	101.33	98.34
	97.28	97.32	101.67	98.77	96.11
	101.03	101.12	101.67	97.95	99.52
	97.28	98.78	97.67	101.33	99.60
	99.97	99.37	100.96	102.10	99.60
\bar{x}	99.37	99.31	100.87	100.58	99.40
S	1.54	1.10	1.56	1.66	2.67
C.V.	1.55	1.11	1.55	1.65	2.69
\bar{Sx}	0.49	0.35	0.49	0.53	0.85

TABLA XII. Análisis de la varianza de los datos de la tabla XI, para evaluar la variabilidad entre días.

Fuente de variación	G.L.	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F _{cal.}	F _{0.95;4,50}
DIAS	4	22.0582	5.51455	1.72 ^{NS}	2.56
E. EXP.	45	143.9411	3.19869		
TOTAL	49	165.9993	3.38764		

DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

En las tablas I, II y III se puede observar que hay una buena correlación entre las concentraciones de tolbutamida y sus respectivas absorbancias. Esto indica que se cumple la Ley de Beer dentro de este intervalo de concentraciones e incluso hasta 24 mcg/ml como lo especificó Forist¹⁰. Asimismo, con respecto a las curvas de calibración, según los resultados de la prueba de t-Student de la tabla IV, no existe diferencia significativa entre ellas por lo que es confiable el haber trabajado con los resultados promedios totales para determinar las concentraciones de las muestras plasmáticas en el resto del estudio. En las mismas tablas I, II y III se ve que, como era de esperarse, las concentraciones más bajas tienen los coeficientes de variación más altos, pero todos son menores del 10% lo cual es aceptable para estudios en los que se van a analizar muestras biológicas.

Con un solo grupo de resultados obtenidos con las concentraciones del 50 al 150 por ciento, se validó estadísticamente el método para conocer la confiabilidad que le represente en algún estudio biológico. El análisis de los datos conjuntó las evaluaciones de la exactitud, la precisión en términos de repetición y la linearidad.

La exactitud y precisión se evaluaron considerando los siguientes estadísticos: la media (\bar{x}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (C.V.) y el intervalo de confianza al 95% de probabilidad (I.C.). Asimismo se efectuó la prueba de t-Student considerando al 100% de recuperación como la media poblacional.

En la tabla V se puede ver que los coeficientes de variación van de 1.092 a 2.034. Algunos criterios respecto a la precisión y exactitud establecen que este coeficiente no debe ser mayor de 2²⁹, sin embargo eso es válido para métodos que no incluyen el análisis de muestras biológicas. Para tales casos no existen criterios oficiales ni unificados que estén reportados, pero algunos investigadores (División de Estudios de Posgrado-UNAH) indican que es aceptable hasta un 10% de coeficiente de variación. De esto se deriva entonces que el método presente es preciso en el intervalo de concentraciones estudiado.

En la misma tabla V se exponen los valores de las *t* encontradas con los datos experimentales. Como se ve, para las concentraciones porcentuales del 120, 80 y 70 por ciento hay una diferencia significativa. Esto podría indicar que para esas concentraciones se perdió exactitud, o sea, que el método es menos exacto que en las demás concentraciones. Para ver si en realidad existían diferencias entre las muestras de las diferentes concentraciones se efectuó la prueba *F* utilizando los valores de la tabla B del apéndice. Los resultados de esta prueba, de la tabla VI, demuestran que no había diferencias significativas por lo que no hay evidencia experimental que indique diferente exactitud entre las muestras. Por esto se puede decir que el método es exacto y preciso.

En la gráfica 2 están reportados los estadísticos utilizados para evaluar la linealidad. Estos son: coeficiente de regresión (pendiente *m*), coeficiente de correlación (*r*), el coeficiente de determinación (*r*²), la raíz cuadrada de la varianza inexplicada o error estándar de regresión (*S_{y/x}*) y la sensibilidad *G*. Co-

mo se ve en la gráfica, r^2 es aproximadamente 1 y la pendiente también por lo que es evidente que el método es lineal en el intervalo de concentraciones estudiadas²⁹.

La reproducibilidad se evaluó mediante una prueba de F considerando al analista y la concentración como los factores que podrían afectar la variable de respuesta (porcentaje de recuperación). Los resultados de dicha prueba expuestos en la tabla VIII indican que no hay diferencia significativa entre los tratamientos (combinación de un analista y una concentración) y que no hay interacción, por lo que el método es reproducible.

En la determinación del límite inferior de detección o sensibilidad del método, aparte de los estadísticos de linealidad, se determinó el intervalo de confianza para la recta de regresión, y como se ve en la gráfica 3, la recta paralela a la de regresión intercepta al eje de las abscisas en 3%. Este intercepto indica la mínima cantidad que puede detectarse con este método la cual traducida a concentración plasmática de tolbutamida, es de 2.25 mcg/ml. En la literatura están reportados los límites de detección de algunos métodos para tolbutamida: 10 mcg/ml,²³ por espectrofotometría visible; 5 mcg/ml³⁰, método CLAP adaptado a un detector U.V.; 0.5 mcg/ml³⁰, por CLAP y detector U.V.; y de 1 mcg/ml²³, por cromatografía de gases. Como se ha de notar, la sensibilidad del presente método es muy buena siendo que se trata de una determinación espectrofotométrica ultravioleta y una extracción con solventes.

Para la evaluación estadística de la estabilidad de las muestras, se analizan los estadísticos de la tabla IX y los resultados de la prueba F de la tabla X. En la primer tabla mencionada vemos que los coeficientes de variación van de 1.64 a 5.424

los cuales son menores del 10%, por lo cual se entiende que no hay pérdida de la exactitud ni de la precisión. Por otro lado, por la prueba de F se encontró que no hubo diferencia significativa entre las determinaciones de los diferentes días, de lo que se deduce que las muestras son estables al menos durante 15 días bajo las condiciones de almacenamiento señaladas.

Otra información que es necesario conocer para saber cuán útil es un método es la variabilidad entre días, es decir, qué tanta variación puede haber entre las observaciones obtenidas en días diferentes. Aquí, simultáneamente, evaluamos la variabilidad que introduce en el método la estabilidad de los aparatos utilizados. Este parámetro no es más que la precisión en términos de reproducibilidad entre días, la cual se evaluó mediante una prueba de F cuyos resultados aparecen en la tabla XII. En esa tabla podemos apreciar que la $F_{cal.}$ es menor que la F_c , por lo que indica que no hay diferencia estadística significativa entre las muestras y que por lo tanto, el método muestra reproducibilidad entre días con una varianza total de 3.39, una varianza entre días de 3.20 y una varianza dentro de un día de 5.51.

La especificidad no fue probada. Esto se debió a la imposibilidad de conseguir el metabolito principal, la carboxitolbutamida, pura, como estándar. Sin embargo existen datos en la literatura que apoyan el suponer que el método presentado aquí sea específico. Como se indicó anteriormente, el pKa de la tolbutamida es de 5.35 y el de la carboxitolbutamida es de 3.54. Por otro lado, el pH medido en las muestras de plasma acidulado con fosfatos es de 4.5+/-0.1. A ese pH aproximadamente el 90% de la tolbutamida se encuentra en su forma no-ionizada, mientras que

aproximadamente el 90% del metabolito se encuentra en su forma ionizada, la cual no pasa a la fase orgánica en un sistema de solventes de extracción. Aunando a lo anterior que la carboxitol butamida, por ser más polar, en su forma no ionizada exhibe mayor solubilidad en agua y menor solubilidad en los solventes orgánicos y que es eliminada del cuerpo 12 veces más rápido de lo que se produce²⁷, se comprende por qué su interferencia podría ser no significativa. Aún así, es recomendable determinar este parámetro si se tiene la posibilidad de hacerlo y se quiere hacer uso de este método.

La especificidad no determinada hace que este método no sea muy confiable en estudios de farmacocinética, ya que en ellos se efectúa el análisis sobre la forma no transformada del fármaco y la posibilidad que el metabolito interfiera no debe omitirse. Aunque, según la información de arriba, la probabilidad que interfiera el metabolito es baja, hasta no ser probada la especificidad no se debe introducir este método en un estudio de estos.

Por otra parte, si el estudio no es muy fino o bien si solo se quiere establecer si los niveles del fármaco se encuentran dentro de los niveles terapéuticos (monitoreo de pacientes), entonces si se puede usar con confianza el método presentado. Asimismo, en estudios de biodisponibilidad y/o de bioequivalencia, en los que toma mayor importancia la cantidad y la velocidad con la que entra un fármaco al organismo, y los niveles de fármaco y metabolito pueden ser determinado aparte o en conjunto, este método puede ser usado con confianza.

CONCLUSIONES.

En este trabajo se presentó y validó un método para determinar tolbutamida en plasma humano.

De acuerdo a los resultados obtenidos se encontró que, en el intervalo de concentraciones de 0 a 12 mcg/ml, la tolbutamida cumple con la Ley de Beer.

Las pruebas estadísticas efectuadas demuestran que el método es exacto y preciso en el intervalo de concentraciones de 112 a 37 mcg/ml.

Así también se demostró que el método es reproducible. La demostración se efectuó a dos niveles de concentración lo cual otorga mayor confiabilidad al método en cuanto a reproducibilidad se refiere.

El límite inferior de detección de éste método es de 2.25 mcg/ml, el cual es bueno tratándose de una determinación espectrofotométrica ultravioleta y extracción con solventes.

Aunque no se demostró experimentalmente que el método es específico, hay evidencias que la probabilidad que la carboxitolbutamida interfiera es muy baja.

De acuerdo a las pruebas estadísticas utilizadas, se estableció que el método es reproducible entre días, lo cual da la ventaja de no tener que efectuar una curva estándar de calibración cada día que se utilice el método.

Las muestras plasmáticas pueden ser almacenadas a 4°C durante al menos 15 días, sin deterioro de la tolbutamida.

Por las características que presenta el método, es posible utilizarlo con confianza en estudios de biodisponibilidad y/o de bioequivalencia.

Para poder aplicar éste método en estudios farmacocinéticos es necesario determinar su especificidad, para tener mayor confianza en los resultados que se obtengan.

Las características que presenta el método se pueden resumir como sigue:

- Es un método sencillo en cuanto a la técnica y el equipo que se utilizan.
- Es rápido relativamente ya que se necesitan aproximadamente 30 minutos para analizar una muestra, siendo de mayor utilidad cuando se analizan varias muestras simultáneamente.
- Es confiable, dadas las características determinadas en la validación: exacto, preciso (en términos de repetición y reproducibilidad entre días y entre analistas), lineal y con un límite de detección de 2.25 mcg/ml.
- Se ve afectado sumamente con el cambio de solventes que se estén utilizando, por lo que se recomienda acopiar todo el solvente que se vaya a utilizar en el estudio y no utilizar alguno cuya pureza sea desconocida. Otra cosa que se puede hacer, es reajustar el método, sobre todo los tiempos de agitación, además de preparar otra curva estándar con los nuevos solventes.
- Es aplicable a estudios de bioequivalencia y/o de biodisponibilidad, pero no de farmacocinética.

RESUMEN

El trabajo presentado consistió en el establecimiento y validación de un método espectrofotométrico ultravioleta para determinar tolbutamida en muestras de plasma humano.

El método establecido se basa en la extracción de tolbutamida con una mezcla de alcohol isoamílico al 2% en hexano, a partir de una muestra plasmática acidificada con una solución de fosfatos, seguida de una reextracción con hidróxido de sodio 0.1 N y leer al espectrofotómetro después de acidificar el extracto con ácido clorhídrico 2.0 N.

Para determinar la exactitud, precisión y linealidad del método, se analizaron muestras con concentraciones de tolbutamida entre 37.5 y 112 mcg/ml, que corresponden a concentraciones porcentuales del 50 al 150 por ciento de la concentración media terapéutica (75 mcg/ml).

La sensibilidad fue establecida tras analizar muestras plasmáticas con concentraciones porcentuales del 1 al 25 por ciento, y también se analizaron muestras del 100% para evaluar la estabilidad de las muestras y la variabilidad entre días.

Los resultados estadísticos mostraron que el método es exacto, preciso, reproducible entre días, entre analistas y entre concentraciones. La sensibilidad demostrada es de 2.25 mcg/ml. El método puede ser utilizado en estudios de bioequivalencia, biodisponibilidad y con ciertas reservas en estudios farmacocinéticos.

También puede ser utilizado en el monitoreo clínico.

Las características resumidas del método son: sencillez, rapidez y confiabilidad.

APENDICE A.

TABLA A. Valores de absorbancia determinadas para cada concentración, para establecer las curvas de calibración. Se hicieron tres replicaciones por concentración.

C (mcg/ml)	DIA 1.			DIA 2.		
	ABSORBANCIA			ABSORBANCIA		
1.2	0.064	0.056	0.058	0.063	0.058	0.061
2.4	0.108	0.112	0.108	0.115	0.107	0.101
4.8	0.235	0.235	0.236	0.230	0.248	0.235
6.0	0.288	0.288	0.289	0.290	0.288	0.286
9.6	0.481	0.489	0.484	0.485	0.478	0.485
12.0	0.590	0.590	0.587	0.591	0.597	0.588

C (mcg/ml)	DIA 3.		
	ABSORBANCIA		
1.2	0.061	0.068	0.059
2.4	0.108	0.111	0.109
4.8	0.234	0.239	0.237
6.0	0.285	0.281	0.290
9.6	0.480	0.289	0.485
12.0	0.589	0.590	0.595

TABLA B. Porcentajes de recuperación y microgramos determinados para cada ml de plasma, y cada concentración.

50%		60%		70%		80%	
m.d.	p.r.	m.d.	p.r.	m.d.	p.r.	m.d.	p.r.
36.59	97.57	43.61	96.90	51.50	98.10	58.96	98.26
38.12	101.66	43.39	96.42	51.94	98.93	55.89	93.15
36.37	94.65	46.02	102.26	51.72	98.51	58.08	96.80
35.49	96.99	45.80	101.77	52.16	99.35	59.61	99.36
37.25	99.33	44.92	99.83	51.72	98.51	58.96	98.26
36.37	96.99	43.83	97.39	51.28	97.68	60.27	100.45
27.03	98.74	44.26	98.37	50.84	96.84	59.61	99.36
37.47	99.91	44.05	98.37	52.82	100.60	59.18	98.63
37.47	99.91	44.70	97.88	50.62	96.43	59.18	98.63
37.25	99.33	44.26	99.34	52.82	100.60	58.52	97.53
90%		100%		110%		120%	
m.d.	p.r.	m.d.	p.r.	m.d.	p.r.	m.d.	p.r.
65.53	97.09	73.87	98.49	81.54	98.84	88.56	98.40
65.10	96.44	74.09	98.78	81.10	98.31	90.97	101.08
68.50	101.63	74.53	99.37	80.88	98.04	90.53	100.59
67.73	100.34	74.96	99.95	83.73	101.49	88.78	98.64
67.51	100.01	74.74	99.66	81.76	99.10	89.00	98.89
68.16	100.98	75.62	100.03	80.66	99.78	89.43	99.37
69.26	102.61	72.99	97.32	81.76	99.10	88.56	98.40
66.85	99.04	75.84	101.12	83.29	100.96	89.43	99.37
66.85	99.04	74.09	98.78	82.20	99.63	89.22	99.13
66.85	99.04	74.52	99.37	81.76	99.10	87.46	97.10

130%		140%		150%	
m.d.	p.r.	m.d.	p.r.	m.d.	p.r.
96.67	98.93	107.19	102.09	112.02	99.57
96.46	102.30	106.53	101.46	114.21	101.52
99.74	101.40	101.71	96.87	115.75	102.89
98.87	98.70	103.73	98.75	111.14	98.79
96.23	99.15	104.78	99.79	108.96	96.85
96.67	99.60	102.38	97.50	111.58	99.18
97.11	97.80	104.78	99.79	112.24	99.77
95.36	99.15	104.13	99.17	111.80	99.38
96.67	99.37	105.44	100.42	113.12	100.55
96.89	99.15	105.00	100.00	114.44	101.72

TABLA B. Continuación.

TABLA C. Absorbancias de las muestras a las concentraciones por centuales del 1 al 25 por ciento de la concentración media terapéutica.

1%	2%	4%	6%	8%	10%	12%
0.000	0.002	0.009	0.017	0.024	0.027	0.049
0.001	0.001	0.004	0.015	0.020	0.029	0.047
0.002	0.000	0.004	0.019	0.024	0.031	0.042
0.001	0.003	0.006	0.014	0.026	0.024	0.040
0.000	0.002	0.006	0.017	0.026	0.029	0.046
0.002	0.003	0.007	0.020	0.024	0.027	0.047
0.001	0.002	0.008	0.017	0.023	0.027	0.045
0.001	0.002	0.008	0.018	0.025	0.026	0.044
0.001	0.004	0.007	0.016	0.025	0.028	0.046
0.001	0.004	0.007	0.017	0.023	0.028	0.046

TABLA C. Continuación.

15%	20%	25%
0.052	0.068	0.090
0.056	0.069	0.086
0.056	0.064	0.090
0.044	0.066	0.093
0.048	0.065	0.091
0.053	0.071	0.085
0.055	0.072	0.093
0.057	0.068	0.092
0.053	0.071	0.095
0.055	0.067	0.085

TABLA D. Porcentajes de recuperación a los 1, 2, 3, 4, 5, 8, y 15 días de una muestra de plasma. Conc. 75 mcg/ml.

DIA 1	DIA 2.	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 8	DIA 15
98.53	102.09	98.79	85.04	96.11	97.21	96.11
98.42	101.46	99.38	97.51	105.79	97.13	104.16
99.39	99.17	101.72	92.19	91.96	96.15	103.71
99.64	99.38	98.75	103.71	97.49	98.18	96.11
100.09	100.55	102.38	101.64	103.71	98.50	89.89
102.08	99.13	96.85	96.71	93.34	95.13	97.16
95.18	97.13	95.86	98.75	96.11	94.16	96.13
101.03	98.63	90.53	97.50	87.81	97.18	91.17
97.28	96.80	98.75	99.17	95.96	98.13	95.14
99.97	99.13	99.38	96.98	95.96	99.38	95.96

ABREVIATURAS USADAS.

A: Absorbancia.

NS: No significativo.

S⁺: Significativo.

G : Sensitividad.

E. EXP: Error experimental.

F_c : Valor crítico de F en el ANADEVIA.

G.L. : Grados de libertad

m.d. : Microgramos determinados por mililitro.

p.r. : Porcentaje de recuperación.

Prom. : Media aritmética del conjunto de valores.

I.C. : Intervalo de confianza.

m.a. : Microgramos añadidos por mililitro de muestra.

APENDICE B.

FORMULARIO.

Medidas descriptivas.

$$1. \text{ Media muestral } (\bar{x}) \quad \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

donde n : tamaño de muestra

$\sum_{i=1}^n x_i$: sumatoria de todos los valores de las observaciones "x"s.

$$2. \text{ Desviación estándar muestral } (S). \quad S = \frac{SSx}{n-1}$$

donde SSx : suma de los cuadrados de las desviaciones.

$$SSx = \sum (x_i - \bar{x})^2$$

$n - 1$: grados de libertad.

$$3. \text{ Error estándar de las medias muestrales } (\bar{Sx}).$$

$$\bar{Sx} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

4. Intervalo de confianza de la media al 95% de probabilidad.

(I.C. 95%).

$$I.C. 95\% = \bar{x} \pm \bar{Sx} \cdot t_{(0.05; G.L.)}$$

5. Coeficiente de variación (C.V.) ó desviación estándar relativa (DER).

$$C.V. = \frac{S}{\bar{x}} (100)$$

Correlación lineal.

6. Ecuación de la recta de regresión y/x .

$y = mx + y_0$ y_0 : intercepto en el eje de las abcisas.

7. Pendiente de la recta de regresión (m).

$$m = \frac{\sum xy - \bar{y} \sum x}{SSx}$$

donde SSx está definida en 2 y

$\sum xy$: suma de los productos de los elementos de los pares ordenados.

8. Coeficiente de correlación (r).

$$r = \frac{Sx}{Sy} (m)$$

9. Sensitividad (G). $G = \frac{m}{S y/x}$

10. Error estándar de regresión ($S y/x$)

$$S y/x = \frac{\sum (y - \hat{y})^2}{n - 2}$$

donde \hat{y} es el valor estimado, y es el valor experimental y n es el número de parejas ordenadas.

11. Intervalo de confianza de la recta de regresión.

$$y = \hat{y} \pm 1.96 S y/x$$

Se trazan líneas paralelas a la recta de regresión a una distancia vertical de $\pm 1.96 S y/x$ partiendo del valor de \hat{y} .

12. Prueba de t-Student.

$$H_0 : \bar{x} = M \quad t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x} - M}{SE}$$

$$H_a : \bar{x} \neq M$$

donde SE está definido en 3 y M es la media poblacional. La prueba establece que si $t_{\text{exp}} > t_c$ a una probabilidad determinada, la muestra difiere significativamente de la media poblacional.

13. Tabla de ANADEV A . Un criterio de clasificación.

Fuente de variación	G.L.	Suma de Cuadrados	Varianzas (Cuadrado medio)
INTERMUESTRAL (e)	K-1	SSe	SSe / K-1
INTRAMUESTRAL (d)	(R-1)K	SSd	SSd / (R-1)K
TOTAL	KR-1	SSt	SSt / KR-1

donde

$$SSt = x^2 - \sum (x)^2 / RK$$

$$SSd = SS_a + SS_b + SS_c + \dots + SS_k$$

$$SSe = SSt - SSd$$

K : número de muestras.

R : número de replicaciones para cada muestra.

SS_a, \dots, SS_k : sumas de las desviaciones al cuadrado, de las muestras a, b, ..., k.

$$14. F_{cal} = \frac{SSe / K - 1}{SSd / (R-1)K} \quad \begin{array}{l} H_0 : SSe = SSd \\ H_a : SSe > SSd \end{array}$$

Si $F_{cal} > F_{1-\alpha}$ con $(K-1)/(KR-K)$ grados de libertad, las muestras difieren significativamente.

BIBLIOGRAFIA.

1. Adir J., Miller K.A. y Vestal R.E. " Effects of total plasma concentration and age on tolbutamide plasma protein binding" *CLIN. PHARMACOL. THER.* 31: 488-493 (1982)
2. Añache J.M., Devissaguet y Guyot-Herman. *Biofarmacia, El Manual Moderno, México* 1983.
3. Bänder Alfred. "Toxicological and histological studies with tolbutamide". *ANN. N. Y. ACAD. SCI.* 71: 152-3 (1957)
4. Bearman J.E. "Design of in vivo studies of bioavailability" *PHARMACOLOGY* 8: 44-54 (1972).
5. Bird E.D. y Schwalbe F.G. "Prolonged hipoglicemia secondary to tolbutamide". *ANN. INTERN. MED.* 62: 110 (1965)
6. Clarke E.G.C. Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. The Pharmaceutical Press. Londres 1969. pp. 576-7
7. Davidoff R.F. "Oral hipoglicemic agents and the mechanism of diabetes mellitus". *NEW ENG. J. MED.* 278: 148-55 (1968)
8. Fain J.N., Rosenthal J.W. y Ward W.F. "Antilipolytic action of tolbutamide on brown fat cells". *ENDOCRINOLOGY* 90: 52-59 (1972)
9. Fajans S. F. Discussion of the paper of Johnson et. al. "Metabolic fate of clorpropamide in man". *ANN. N.Y. ACAD. SCI.* 74: 473-5 (1959)
10. Forist A.A. et. al. "Determination of plasma levels of tolbutamide". *PROC. SOC. EXPTL. BIOL. MED.* 96: 180-3 (1957)
11. Goodnan y Gilman. *Las Bases Farmacologicas de la Terapéutica.* Sexta edición. Ed. Panamericana. Mexico 1982.

12. Goth A. Medical Pharmacology. Principles and Concepts. 5th. ed. The C.V. Mosby Company. EEUU 1970.
13. Grahame-Smith. Drug Interactions. University Park Press. Gran Bretaña 1978.
14. Herfindal Eric T. et. al. Clinical Pharmacy and Therapeutics The William and Wilkins Company. Baltimore 1975.
15. Jones R.G., Alert H.A. y Paul N.D. "Influence of glucose and tolbutamide in the fasted animal". *DIABETES* 8:466-71 (1959)
16. Johnson B.F. y Chura C. "Diurnal variation in the effect of tolbutamide". *J. AM. MED. SCI.* 268: 93-6 (1974)
17. Klaw Florey. Analytical Profiles of Drug Substances. Tolbutamide, por William F.Z. y Erik H. Jensen. Academic Press. EEUU 1974. pp. 513-543
18. Knauff, Fajans, Ramírez y Conn. "Metabolic half-life times, blood levels, potencies and activity patterns of metahexamide and other sulfonylurea compounds". *METABOLISM* 8: 606-13 (1959)
19. Kreyszig Erwin. Introducción a la Estadística Matemática. Principios y Métodos. Ed. Limusa. México 1978.
20. Lawrence H.L. et. al. "The structure of urinary excretion product of 1-butyl-3-p-tolylsulfonylurea (Grinase)". *J. AM. CHEM. SOC.* 78: 5701-2 (1956)
21. Levy G. "Effect of dosage properties on therapeutic efficacy of tolbutamide tablets". *CAN. MED. ASS.J.* 90: 978-9 (1964)
22. Marler E.G.C. Pharmacological and Chemical Synonyms. 6th. ed. Excerpta Medica. Amsterdam-Oxford. Amsterdam 1976. p. 443

23. Matin S.B. y Rowland M. "Determination of Tolbutamide and Clorpropamide in Biological Fluids". J. PHARM. PHARMACOL. 25: 186-8 (1973)
24. Méndez Ramírez Ignacio. Modelos Estadísticos Lineales. Interpretación y Aplicaciones. CONACYT. México 1981.
25. Meyers F.H., Jawetz y Goldfien A. Manual de Farmacología Clínica. Cuarta edición. El Manual Moderno. México 1980.
26. Nelson E., O'Reilly I. y Chulsiky T. "Determination of Carboxitolbutamide in urine". CLIN. CHIM. ACTA. 5: 774-6 (1960)
27. Nelson E., Wagner, et. al. "Influence of the absorption rate of tolbutamide on the rate decline of blood sugar levels in normal humans". J. PHARM. SCI. 51: 509-14 (1962)
28. Niaz Sarfaraz. Textbook of Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics. Appleton-Century-Crofts. N.Y. 1979.
29. Roman Fernando. Validación de Técnicas Analíticas. Curso Teórico. CINVESTAV 1981.
30. Sadeé Wolfgang. Drug Level Monitoring Analytical Techniques, Metabolism and Pharmacokinetics. Geertruida C.M. Beelen. John Wiley and Sons Edtrs. EEUU 1980. p. 11
31. Shaik B. Martin et. al. "Pharmacokinetics of tolbutamide: prediction by concentration in saliva". CLIN. PHARMACOL. THER. 16: 1052-58 (1975)
32. Spingler y Kaiser. " The determination of N-(4-toluenesulfonyl)-N'-butylurea in serum". ARZNEIMITTEL-FORSCH 60:760-2 (1956)
33. Swidler G. Hand Book of Drug Interactions. Wilwy-Interscience. EEUU 1971. p. 209

34. Toolan Thomas J. y Wagner Jr. R.L. " The physical properties of clorpropamide and its determination in human serum". ANN. N. Y. ACAD. SCI. 74: 449-58 (1959)
35. Ueda H. et. al. "Disappearance rate of tolbutamide in normal subjects and diabetes mellitus, liver cirrosis and renal disease". DIABETES 12: 414-19 (1963)
36. U.S.P. XX-N.F. IV . The United States Pharmacopeia. Twentieth revision, 1980.
37. Volk W.D. et. al. "Functional and histological studies concerning the action of sulfonylureas" ANN. N.Y. ACAD. SCI. 71: 141-51 (1957)
38. West K. y Johnson Philip C. "Metabolism and relative hipoglycemic potencies of four sulfonylureas in man". DIABETES 9: 454-58 (1960)
39. West K. y Mc. Cambell S.R. "Relative potencies of clorpropamide and tolbutamide in man". ANN. N.Y. ACAD. SCI. 74: 473-77 (1959)
40. West K. y Johnson P.C. "The comparative pharmacology of tolbutamide, carbutamide, chlorpropamide and metahexamide in man". METABOLISM 8: 596-605 (1959)