



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

EVALUACION DE LOS DETECTORES DE IONIZACION DE FLAMA, DE
IONIZACION DE FLAMA ALCALINA Y DE CAPTURA DE ELECTRONES
PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE METRONIDAZOL EN
FLUIDOS BIOLÓGICOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Q U I M I C O

P R E S E N T A :

BERTHA ALICIA PINAL GARCIA

MEXICO, D. F.

1980

M-42477



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado originalmente según el tema:

Presidente: Dr. Armando Manjarrez Moreno

Vocal : Dra. Ofelia Espejo de Ochoa

Secretario: M en C Santiago Capella Vizcaino

1er suplente: Mauro Cruz Morales

2o suplente : Carlos Romo Medrano

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Química Analítica

División de Estudios de Posgrado

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

Sustentante: Bertha Alicia Pinal García _____

Asesor: M en C Santiago Capella Vizcaino _____

A MIS PADRES

A LA MEMORIA DE MIS ABUELOS

A MIS HERMANOS

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS

A GERARDO

Por la ayuda que siempre me ha brindado

Agradezco al M. en C. SANTIAGO CAPELLA VIZCAINO
por su gran ayuda en la realización de este trabajo.

Agradezco también al Dr. ARMANDO MANJARREZ MORENO
por sus valiosos consejos.

CONTENIDO

	Pag.
I. Introducción	1
1. Antecedentes	2
2. Importancia del Metronidazol	2
3. Descripción y Características del Metronidazol	3
4. Necesidad de un Método Analítico para Metronidazol en Plasma	4
5. Métodos Analíticos Existentes	4
6. Objetivo del Trabajo	7
II. Desarrollo Experimental	9
1. Material y Reactivos	10
2. Elección de la Fase Estacionaria	11
3. Obtención de las Condiciones Optimas de Análisis	13
4. Cantidad Mínima Detectable de Metronidazol	13
5. Extracción del Metronidazol	16
III. Resultados y Discusión	18
1. Condiciones de Operación	19
2. Columna Optima	31
3. Sensibilidad	34
4. Diferencias en Función de la Respuesta de los 3 Detectores	34
5. Extracción del Metronidazol	39
IV. Conclusiones	51
V. Bibliografía	54

I

INTRODUCCION

1. Antecedentes.

El descubrimiento del 2-nitroimidazol (Nakamura 1955) y la demostración de sus propiedades tricomonocidas (Horie 1956) abrieron el camino para la síntesis química y estudios biológicos de muchos nitroimidazoles. Cuckler en 1955 mostró que el 2-acetamido-5-nitrotiazol poseía propiedades tricomonocidas. Perl en 1956 encontró que este fármaco era efectivo en el tratamiento de tricomoniasis humana, pero desgraciadamente el efecto curativo era muy lento. En 1959 Cosar y Julou publicaron la actividad tricomonocida del 1(β-hidroxy-etil)-2metil-5-nitroimidazol y mostraron que era mucho menos tóxico que los otros compuestos que se habían estudiado. En 1960 se encontró que una dosis oral de este fármaco impartía actividad tricomonocida al semen y a la orina y se mostró el rápido poder curativo tanto en mujeres como en hombres que sufrían de tricomoniasis. Subsecuentes experimentos han demostrado que la administración oral de este fármaco, llamado actualmente metronidazol, puede curar una alta proporción de individuos infectados por *Trichomonas vaginalis*.

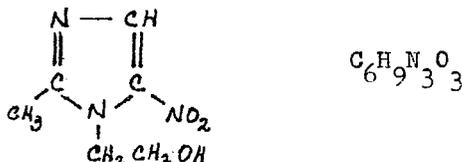
2. Importancia del Metronidazol.

El metronidazol es actualmente un fármaco de gran utilidad como tricomonocida y amebicida (1). Es un tricomonocida sistemático muy efectivo en el tratamiento de infecciones causadas por *Trichomonas vaginalis* tanto en el hombre como en la mujer. Tiene un efecto más eficaz por vía oral pero también puede

ser aplicado intravaginalmente. Se ha probado que es también muy efectivo en el tratamiento de amibiasis intestinal y amibiasis extraintestinal. Además, ha sido siempre considerado como un fármaco de baja toxicidad, aunque en estudios recientes se ha visto que sí puede afectar con el tiempo. Los efectos colaterales más comunes que produce el metronidazol son: náusea, diarrea, anorexia, molestias epigástricas y dolores abdominales. Durante el tratamiento con metronidazol el paciente debe dejar de tomar bebidas alcohólicas. (1)

3. Descripción y Características del Metronidazol.

El metronidazol es el 2-metil-1-etanol-5-nitroimidazol cuyo nombre comercial más conocido es Flagyl y su fórmula es la siguiente:



Es un fármaco en forma de cristales o polvo cristalino de color blanco o amarillo pálido, inodoro, estable al aire, oscurece al ser expuesto a la luz, funde entre 159 y 163°C y es bastante soluble en agua y alcohol (1.0 y 0.5 g/100 ml a 20°C respectivamente).

El metronidazol se prepara condensando, por calentamiento, el 2-metil-5-nitroimidazol con un gran exceso de clorhidrina. Después de eliminar la clorhidrina, el residuo se extrae

con agua y después de alcalinizarla se extrae con cloroformo. Este disolvente se evapora a sequedad y el sólido obtenido puede recristalizarse con acetato de etilo. (U.S. Pat. 2, 944,061) (2).

4. Necesidad de un Método Analítico para Metronidazol en Plasma.

Los individuos que responden débilmente al metronidazol, presentan bajos niveles del fármaco en el plasma, hecho que se relaciona a una absorción deficiente o a un rápido metabolismo del metronidazol.

Es por esto que ha sido necesario efectuar estudios farmacocinéticos de este fármaco. Para llevar a cabo estos estudios se debe disponer de un método analítico que sea sensible, específico y rápido. El método debe presentar una cantidad mínima detectable de $1\mu\text{g/ml}$; alta especificidad, ya que durante el metabolismo del metronidazol habrá en el plasma compuestos de estructura muy semejante a él; y ser lo bastante rápido para poderse aplicar como análisis de rutina.

5. Métodos Analíticos Existentes.

A la fecha se han desarrollado varios métodos analíticos químicos y microbiológicos para metronidazol en plasma y en orina. A continuación se describen brevemente los principales métodos químicos:

a) Métodos Espectrofotométricos. (3, 4)

Estos métodos están basados en la hidrólisis alcalina del nitroimidazol lo cual da como resultado la liberación estequiométrica del ión nitrito, el que se determina llevando a cabo una diazoación de la sulfanilamida en medio ácido para formar la sal de diazonio que se trata con un compuesto copulante como el reactivo de Bratton-Marshall, N-(1-naftil)-etilendiamina, formándose un compuesto colorido que puede determinarse espectrofotométricamente. La cantidad mínima detectable que puede obtenerse mediante estos métodos oscila entre 0.5 y 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Estos métodos no son específicos por lo que es necesario realizar previamente una separación por cromatografía en capa fina; además resultan bastante laboriosos.

b) Métodos Polarográficos. (4)

Estos métodos se basan en la reducción electroquímica del grupo nitro del metronidazol al grupo amino, en un medio de NaOH 0.1 N. Son métodos rápidos pero no específicos; el mínimo detectable es de 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

c) Métodos Cromatográficos.

Los principales métodos analíticos por cromatografía en fase vapor que se han desarrollado son los que se describen a continuación:

De Silva (4) desarrolló un método para cuantificar el metronidazol por cromatografía en fase vapor, empleando un detec

tor de captura electrónica. La columna de vidrio empleada para el análisis tiene una longitud de 1.83 m X 4 mm de diámetro interno, empacada con OV-17 al 3% sobre Gas Chrom Q de 60/80 mallas*. El gas de arrastre utilizado es una mezcla de argón-metano (90:10). Para extraer el metronidazol del plasma, De Silva utiliza una solución buffer de pH 9.0, cloruro de sodio y acetato de etilo. Después de extraer 2 veces con acetato de etilo y evaporar a sequedad el disolvente, el residuo se disuelve en metanol. Alícuotas de esta solución se someten a una separación por cromatografía en capa fina llevándose a cabo, por último, la trimetilsililación del metronidazol. Este método es muy sensible (0.01 a 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y específico, pero resulta sumamente laborioso debido a la separación por cromatografía en capa fina, y la reacción del metronidazol con los agentes sililantes para formar un derivado más sensible es muy tardada. A todo esto hay que agregar la pérdida inevitable del compuesto en cada paso.

Midha (5) publicó un método para el análisis, por cromatografía en fase vapor, de metronidazol extraído del plasma que elimina la separación por cromatografía en capa fina. Utiliza un detector de ionización de flama de hidrógeno y una columna de vidrio de 6 pies de longitud x 1.5 mm de diámetro interno, empacada con 1% apiezon L, 0.5% SE-30 y 0.5% OV-7 sobre Chromosorb W de 80/100 mallas y emplea nitrógeno como gas de arrastre. El autor efectúa la extracción del metronidazol del plasma con una mezcla de éter dietílico y cloruro de metileno, después eva

* Especificación ASTM E-11-61

para a sequedad y prepara los derivados trimetilsililados del metronidazol para después analizarlos por cromatografía en fase vapor. La cantidad mínima detectable es de $0.25 \mu\text{g/ml}$. Este método tiene un límite de detección peor que el desarrollado por De Silva pero tiene la ventaja de eliminar la separación por cromatografía en capa fina. Sin embargo, también se lleva a cabo la trimetilsililación del metronidazol por lo que el método resulta tardado.

Wood (6) desarrolló un método de análisis del metronidazol por cromatografía en fase vapor en el que utiliza, al igual que Midha, el detector de ionización de flama de hidrógeno, una columna de vidrio de 183 cm de longitud x 0.04 cm de diámetro interno, empacada con OV-1 al 3% sobre Gas Chrom Q, y se usa como fase móvil nitrógeno. La extracción del metronidazol del plasma se lleva a cabo con cloroformo y se efectúa también la sililación del metronidazol para después efectuar el análisis. El mínimo detectable es de $0.5 \mu\text{g/ml}$

6. Objetivo del Trabajo.

No existe aún un método analítico para metronidazol que reúna todas las características deseables pues aunque se han desarrollado métodos muy sensibles y específicos, son métodos que requieren de muchos pasos para la separación del compuesto, y en el caso de los métodos cromatográficos se requiere siempre hacer el derivado trimetilsililado del metronidazol, para tener una respuesta del detector que nos permita realizar la cuantificación.

En este trabajo se estudiaron las condiciones para analizar el metronidazol por cromatografía en fase vapor y se evaluaron varios detectores de ionización para llevar a cabo el análisis sin necesidad de formar derivados.

II

DESARROLLO EXPERIMENTAL

1. Material y Reactivos.

Cromatógrafo Varian Aerograph modelo 2100

Registrador Varian A-25

Detector de ionización de flama de hidrógeno

Detector de captura de electrones Sc^3H

Detector de ionización de flama alcalina

4 columnas de vidrio de 1.80m x 3mm d.i.

Columna de vidrio de 80cm x 3mm d.i.

Columna de acero inoxidable de 80cm x 3mm d.e.

Columna de vidrio de 90cm x 3mm d.i.

Jeringa de 10 l Hamilton modelo 700

Potenciómetro Beckman Century SS-1

Agitador vortex Maxi-mix, Thermolyne

Tubos de ensayo Pyrex

Chromosorb W, AW, DMCS 80/100 mallas, John Mansville

Chromosorb W HP 80/100 mallas, John Mansville

Fases líquidas: OV-17, OV-25, OV-101, OV-225, Pierce Chemical
Company

Cloroformo R.A. Merck

Metanol R.A. Merck

Acido tricloroacético R.A. Baker

Metronidazol de los Laboratorios Silanes, lote 51

Plasma obtenido de: Servicio de Hematología, Banco de Sangre,
Servicio de transfusiones, Colonia Roma, México, D.F.

Acido Nítrico R.A. Merck

Acetona del Depto. de Estudios de Posgrado de la Facultad de
Química, U.N.A.M.

Lentejas de sosa Baker

2. Elección de la Fase Estacionaria.

Se prepararon 4 columnas de vidrio de 150 cm de longitud x 3mm de diámetro interno, con las fases estacionarias que aparecen en la tabla 1. Se empleó como soporte Chromosorb W, AW, DMCS de 80/100 mallas. El porcentaje de la fase líquida fué de 3% en cada caso. Las columnas se prepararon según el método descrito por Supina, W.R. (7).

a) Determinación del Flujo Optimo para cada Fase.

Una vez preparadas las columnas se acondicionaron 24 horas a la temperatura máxima de cada fase. Para cada columna se determinó la temperatura a la cual la señal del metronidazol estuviese lo más próxima posible a la del disolvente. A esa temperatura se inyectaron soluciones de metronidazol en metanol a una concentración de 10 mg/ml, variándose el flujo, y se calculó el número de platos teóricos. De esta manera se obtuvo el flujo óptimo para cada columna.

b) Determinación de la Temperatura Optima para cada Fase.

Para determinar la temperatura óptima de cada columna se fijó un flujo de 30 ml/min y se varió la temperatura 20°C de la temperatura elegida para cada columna y se calculó el número de platos teóricos. Se obtuvo así la temperatura óptima para cada columna.

Para la determinación del flujo óptimo de gas acarreador así como de la temperatura de análisis, se fijaron las siguientes condiciones: El gas de arrastre usado fué nitrógeno,

TABLA 1

Características de las Fases Estacionarias Usadas

Fase	Tipo	Temp. Max. °C	Polaridad*
OV-17	Metil-fenil-silicón (50%fenil)	375	177
OV-25	Metil-fenil-silicón (75%fenil)	350	235
OV-101	Metil-silicón	350	46
OV-225	Fenil-cianopropil-silicón	265	363

* Según las constantes de McReynolds (8)

la temperatura del detector e inyector fué de 150°C y se utilizó el detector de ionización de flama de hidrógeno. Se inyectaron soluciones de metronidazol en metanol de 10 mg/ml.

3. Obtención de las Condiciones Optimas de Análisis.

Se prepararon 2 columnas de 80 cm de longitud, una de vidrio de 3 mm de diámetro interno y la otra de acero inoxidable de 1.5 mm de diámetro interno, empacadas con OV-225 al 3% sobre Chromosorb W HP de 80/100 mallas. Se inyectaron en ambas columnas soluciones de metronidazol en metanol a las siguientes concentraciones: 10, 5, 1, 0.5 y 0.1 mg/ml. Las condiciones fueron las siguientes:

Temp. columna: 200°C

Temp. detector: 220°C

Temp. inyector: 220°C

Flujo de N₂ : 30 ml/min

Se usó el detector de ionización de flama de hidrógeno.

4. Cantidad Mínima Detectable de Metronidazol.

a) Detector de Ionización de Flama de Hidrógeno.

El detector de ionización de flama de hidrógeno funciona como se describe a continuación: Se hace pasar el gas de arrastre que sale de la columna mezclado con hidrógeno por un quemador el cual tiene una pequeña llama alimentada por el hidrógeno y un suministro adicional de aire que generalmente atraviesa un disco de metal poroso situado en la base del quemador. La llama sirve de electrodo existiendo un segundo electrodo por

encima o al lado de la llama; se establece de esta manera una diferencia de potencial; cuando solo el gas de arrastre pasa por la llama existe una pequeña corriente entre los electrodos, pero al pasar las moléculas de la muestra sufren una ionización en la llama y aumenta notablemente la corriente que después de amplificada pasa al registrador. El detector de ionización de flama de hidrógeno es sensible a todos los compuestos orgánicos, pero el insensible al agua y gases inorgánicos. El detector da respuesta proporcional a la masa de la substancia por unidad de tiempo y es independiente del gas de arrastre o su concentración.

Se preparó una columna de vidrio con las siguientes características:

Diámetro interno: 3 mm

Longitud : 90 cm

Empaque : OV-225 al 3% sobre Chromosorb W HP

Se puso a acondicionar la columna a 265°C durante 24 horas.

Se prepararon soluciones de metronidazol en metanol y en agua a las siguientes concentraciones: 10,000, 5,000, 1000, 500, 100, 50, 10, 5, 2 y 1 µg/ml. Se inyectaron progresivamente estas soluciones de mayor a menor concentración hasta que se obtuvo el mínimo detectable. Las condiciones de flujo de hidrógeno y aire fueron 30 y 300 ml/min respectivamente.

b) Detector de Captura de Electrones.

El detector de captura de electrones es también un detector de ionización en el cual mediante el empleo de una peque

ña lámina de material radioactivo se ioniza el gas de arrastre; al pasar la muestra, y si ésta tiene afinidad por electrones, capturará algunos de los presentes produciéndose una disminución en la corriente que se produce por ionización del gas de arrastre. Su respuesta no es universal, pero sí presentará una gran sensibilidad para compuestos tales como los halogenados. (9).

El detector de captura de electrones usado es del tipo Sc^3H . Una vez instalado el detector se dejó acondicionando durante 2 horas. Nuevamente se prepararon soluciones de metronidazol en metanol y en agua a varias concentraciones y se inyectaron hasta obtener el mínimo detectable.

c) Detector de Ionización de Flama Alcalina.

Consiste en un detector de llama de hidrógeno al que se adiciona un electrodo circular recubierto de una sal de sodio. Tiene sensibilidades elevadas para los compuestos de fósforo y nitrógeno. Puede considerarse como un detector específico de este tipo de substancias. (10)

Se instaló el detector de ionización de flama alcalina y se dejó acondicionando durante varias horas. Una vez acondicionado, se inyectaron soluciones de metronidazol en metanol y en agua a las siguientes concentraciones: 1000, 500, 100, 50, 10, 5, 2, 1, 0.5 y 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los flujos de hidrógeno y aire fueron de 30 y 600 ml/min respectivamente.

Las condiciones a las que se llevaron a cabo estas determinaciones fueron las siguientes:

Temp. columna: 200°C

Temp. inyector: 220°C

Temp. detector: 240°C

Flujo de N₂: 30 ml/min

velocidad papel: 0.25 pulg/min

cantidad inyectada: 1.0 μl

El flujo de nitrógeno fué de 50 ml/min en el caso del detector de ionización de flama alcalina.

5. Extracción del Metronidazol.

a) Determinación del pH óptimo de Extracción del Metronidazol.

Se prepararon 50 ml de una solución de 50 μg/ml de metronidazol en agua y se tomaron alícuotas de 1 ml que por medio de un potenciómetro se ajustaron con NaOH 0.5 N a los siguientes pH's: 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5 y 11. A cada alícuota se le agregó 1 ml de cloroformo, se extrajo el metronidazol agitando 3 min con agitador vortex y se inyectó 1 μl de cada una de las fases al sistema cromatográfico diseñado para el empleo del detector de ionización de flama de hidrógeno.

b) Extracción del Metronidazol en Solución Acuosa.

Para calcular el rendimiento de la extracción del metronidazol con cloroformo, se preparó una solución de este producto en agua de 10 μg/ml y se ajustó a pH 9 mediante la técnica descrita. Se tomó una alícuota de 1 ml y se extrajo con 2.5 ml de cloroformo agitando durante 3 minutos con agitador

vortex. Se separó la fase orgánica y se repitió la extracción 3 veces más. Se reunieron los extractos de cloroformo y después de evaporar a sequedad el residuo se disolvió en 1 ml de agua caliente. Se inyectó la solución antes y después de la extracción y se calculó el rendimiento.

c) Extracción del Metronidazol del Plasma.

Posteriormente se llevó a cabo la extracción y análisis de una solución de metronidazol en plasma. Se preparó una solución de metronidazol en plasma de 5 μ g/ml. Se tomó 1 ml de esta solución y se le agregó 1 ml de ácido tricloroacético al 5% para precipitar las proteínas. Se centrifugó, se tomó 1 ml del sobrenadante y se ajustó a pH 9 con NaOH 0.5 N. Después se llevó a cabo la extracción agregando 2.5 ml de cloroformo y agitando 3 minutos con agitador vortex; se repitió 3 veces la misma extracción. Se reunieron los extractos, se evaporó a sequedad y se redisolvió el residuo en 1 ml de agua caliente. Se inyectaron las soluciones del plasma antes y después de la extracción y se calculó el rendimiento.

III

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Condiciones de Operación.

a) Material de la Columna.

Como es más práctico trabajar con una columna de acero inoxidable que con una de vidrio, se estudió la posibilidad de utilizar una columna de acero inoxidable para el análisis del metronidazol. Para esto, se inyectaron varias soluciones del fármaco en una columna de acero inoxidable de la misma longitud y con el mismo empaque que el de la columna de vidrio. Con las soluciones concentradas se obtuvieron 2 picos para el metronidazol por lo que se pensó que dentro de la columna ocurría la descomposición del fármaco. Se inyectaron 50 μ l de una solución de 10 mg/ml de metronidazol en agua para tratar de desactivar los sitios donde ocurría la descomposición del metronidazol. Sin embargo, esto no dió resultado ya que se siguieron obteniendo 2 picos (figura 10).

b) Soporte.

El soporte Chromosorb W, AW, DMCS de 80/100 mallas se cambió por un soporte más inerte, el Chromosorb W HP de 80/100 mallas, para que hubiera la mínima interacción posible entre el metronidazol y el soporte lográndose de esta manera picos más simétricos (η -0.9 y 1.02 respectivamente).

c) Fase Estacionaria.

Para elegir la fase estacionaria más conveniente para el análisis del metronidazol, se probaron 4 silicones con diferente polaridad (tabla 1).

i) Determinación del Flujo Optimo para cada Fase.

Las temperaturas para cada columna estudiada a las que el pico del metronidazol se separa completamente del pico del disolvente se encuentran en la tabla 2. Como se puede ver en la tabla 3, el flujo óptimo para todas las columnas fué de 21 ml/min. Los picos del metronidazol obtenidos con la columna OV-17 (figura 1) son muy asimétricos y "colean" mucho, en el caso de las columnas OV-25 y OV-101 los picos son un poco más simétricos pero aún "colean" como se puede ver en las figuras 2 y 3, con la columna OV-225 los picos son bastante simétricos (figura 4). En la tabla 3 se muestran los valores de η para cada columna.

TABLA 2

Fase	T (°C)	Resolución
OV-17	175	5.5
OV-25	175	4.5
OV-101	150	3.5
OV-225	250	5.0

ii) Determinación de la Temperatura Optima para cada Fase.

En la tabla 4 aparece la temperatura óptima y el número de platos teóricos de cada fase. La simetría de los picos en cada caso es similar a la que se obtuvo en la determinación del flujo óptimo (figuras 5, 6, 7 y 8).

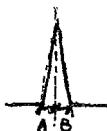
TABLA 3

Flujo Optimo

Fase	Flujo óptimo (ml/min)	n	η *
OV-17	21	1677	0.50
OV-25	21	954	0.67
OV-101	21	1119	0.57
OV-225	21	603	0.90

* η = simetría

La simetría de los picos se calculó de la siguiente manera:



donde $\eta = \frac{A}{B}$

El valor de η debe estar cercano a 1 (entre 0.8 y 1.2) para que el pico sea simétrico. (11)

Figura 1

Flujo óptimo Columna OV-17

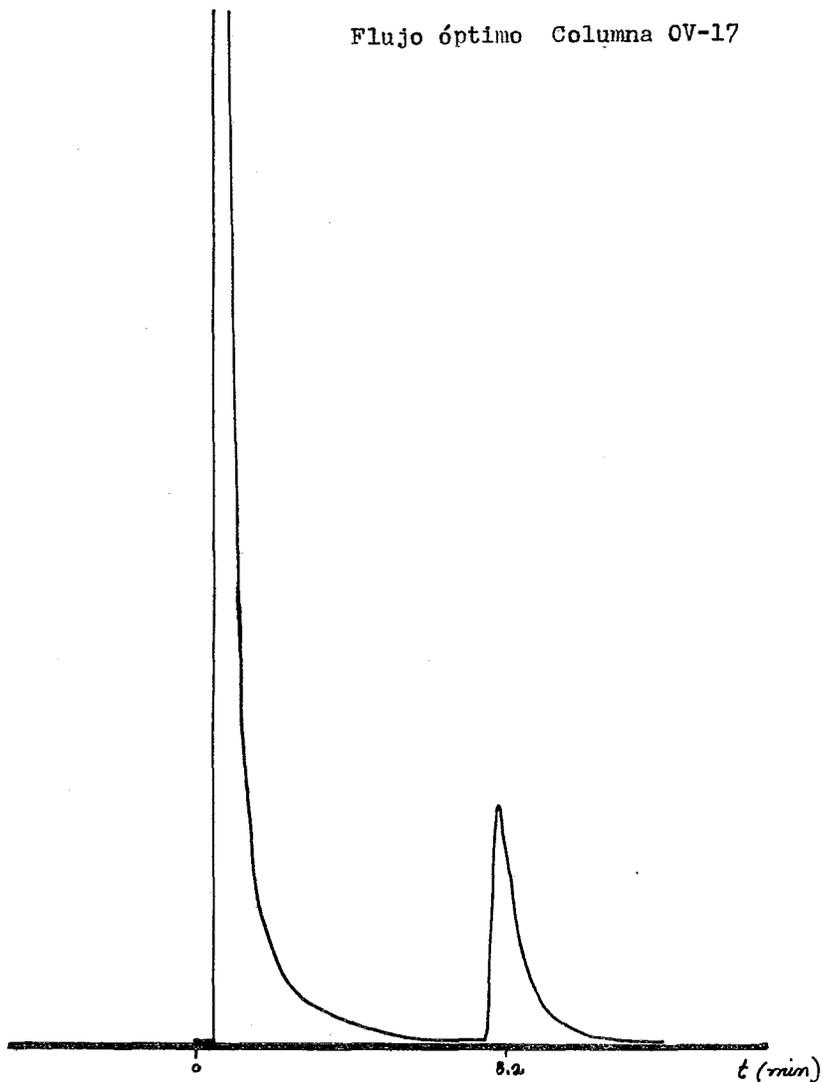


FIGURA 2

Flujo Optimo Columna OV-25

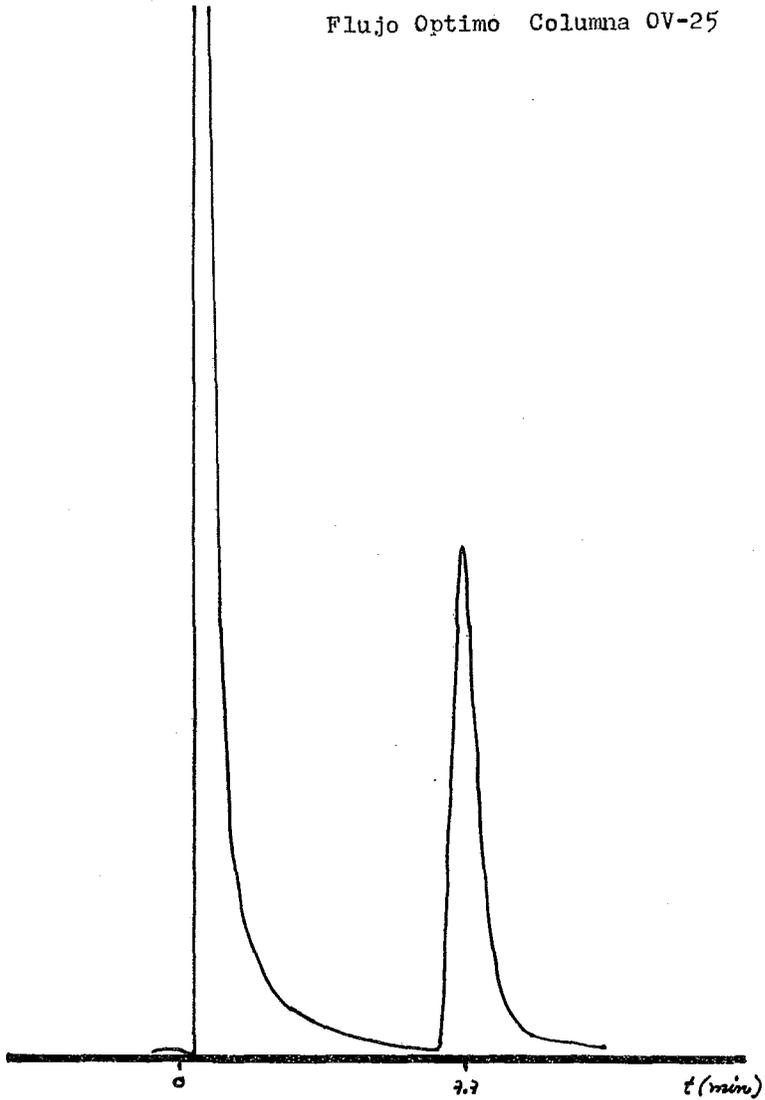


FIGURA 3

Flujo Optimo Columna OV-101

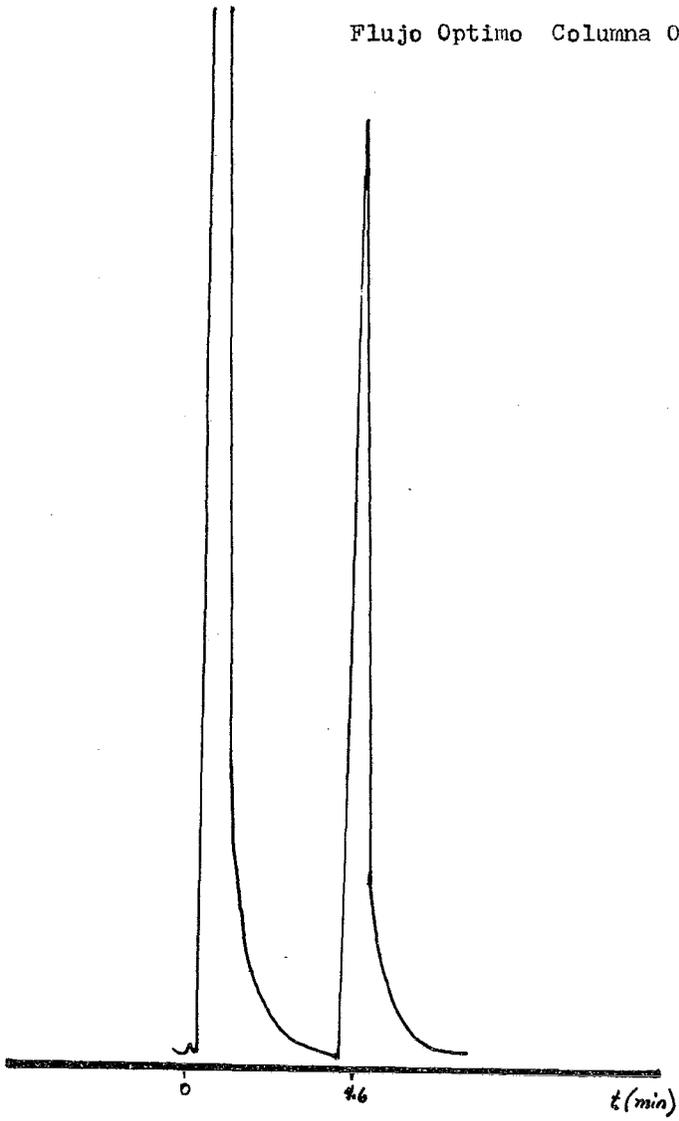


FIGURA 4

Flujo Optimo Columna OV-225

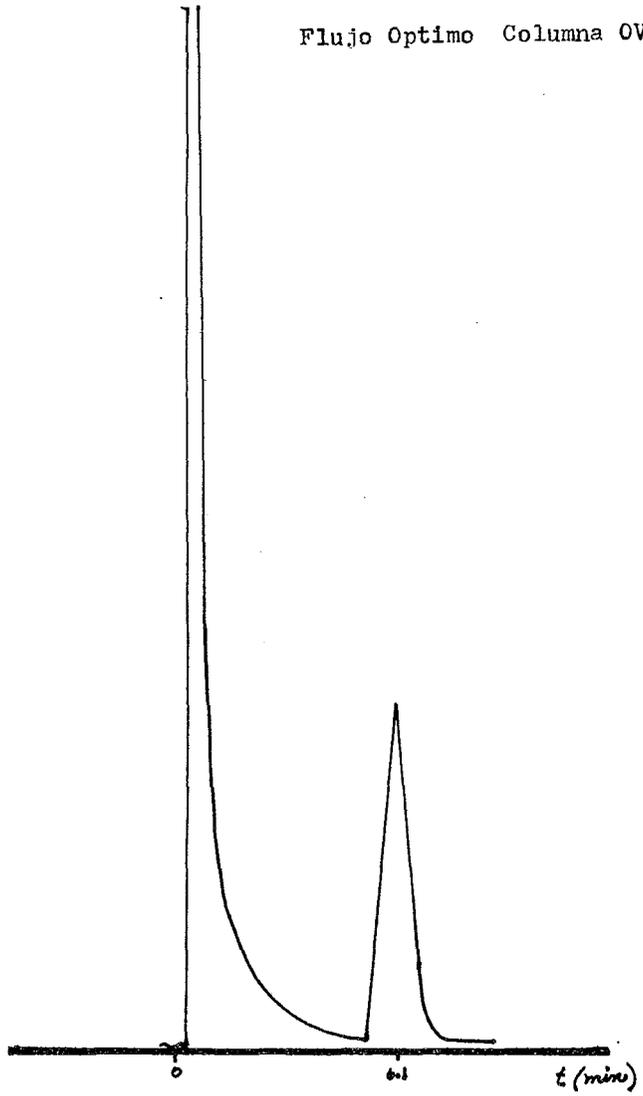


TABLA 4

Temperatura Optima

Fase	Temp. óptima (°C)	n	η
OV-17	150	3606	1.50
OV-25	150	1958	1.34
OV-101	130	1550	1.41
OV-225	230	776	1.04

FIGURA 5

Temperatura Optima Columna OV-17

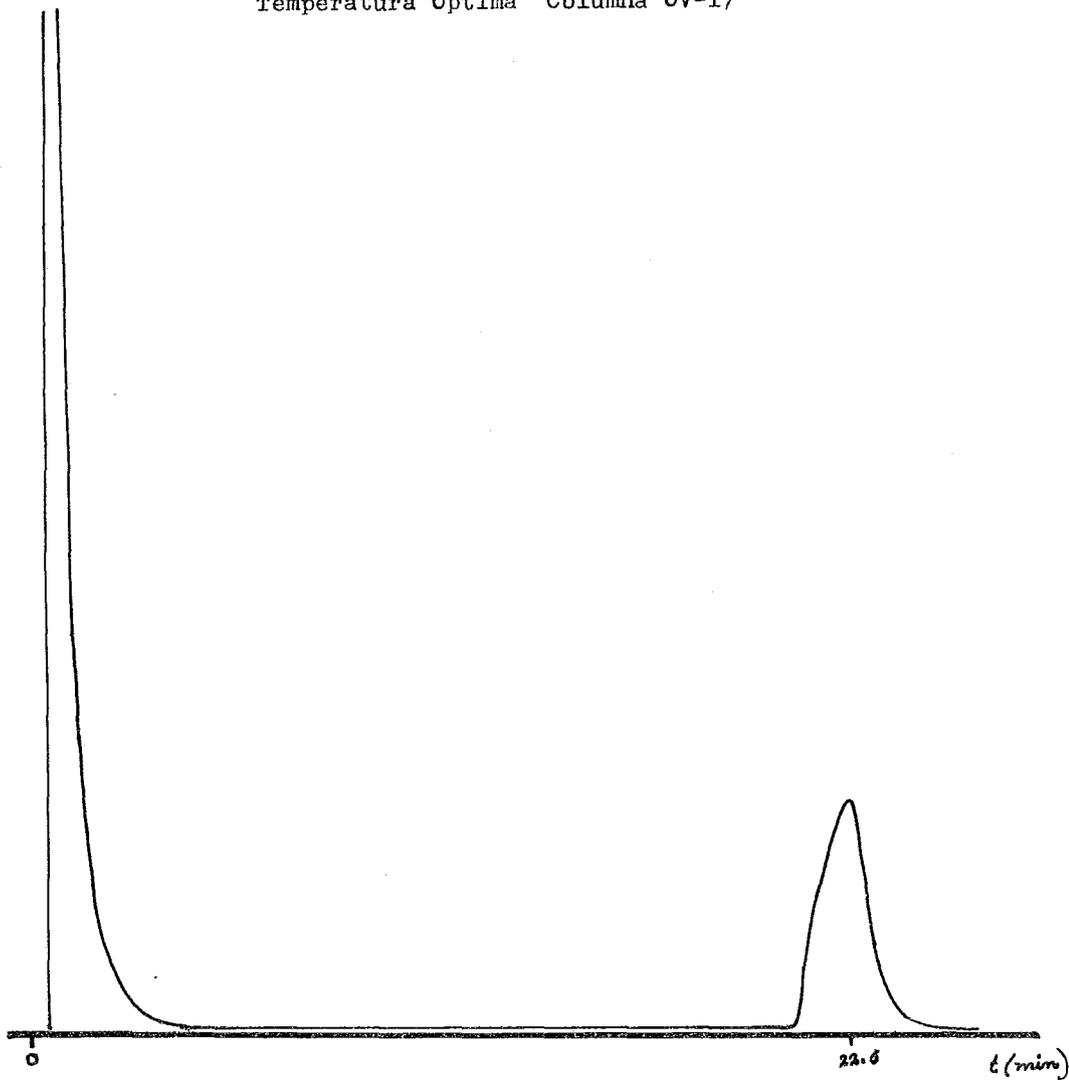


FIGURA 6

Temperatura Optima Columna OV-25

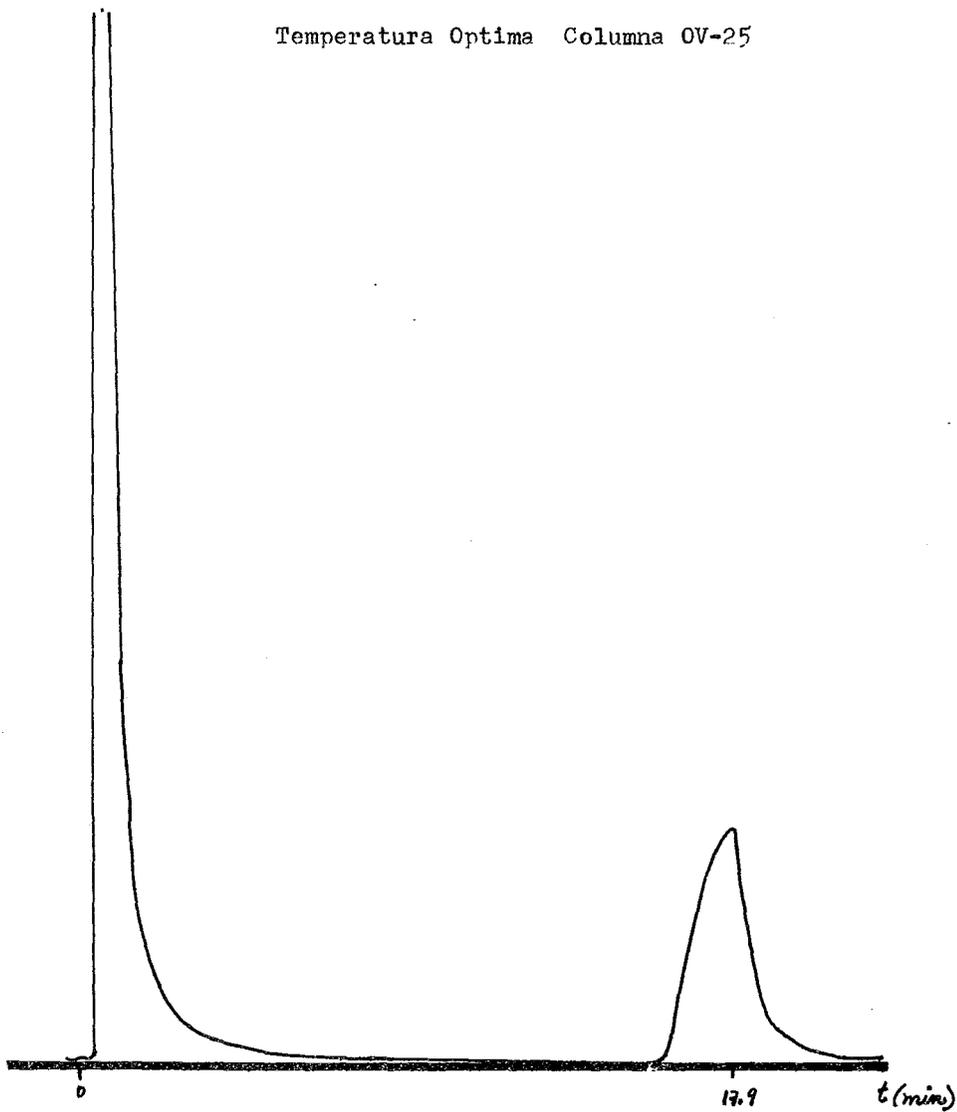


FIGURA 7

Temperatura Optima Columna OV-101

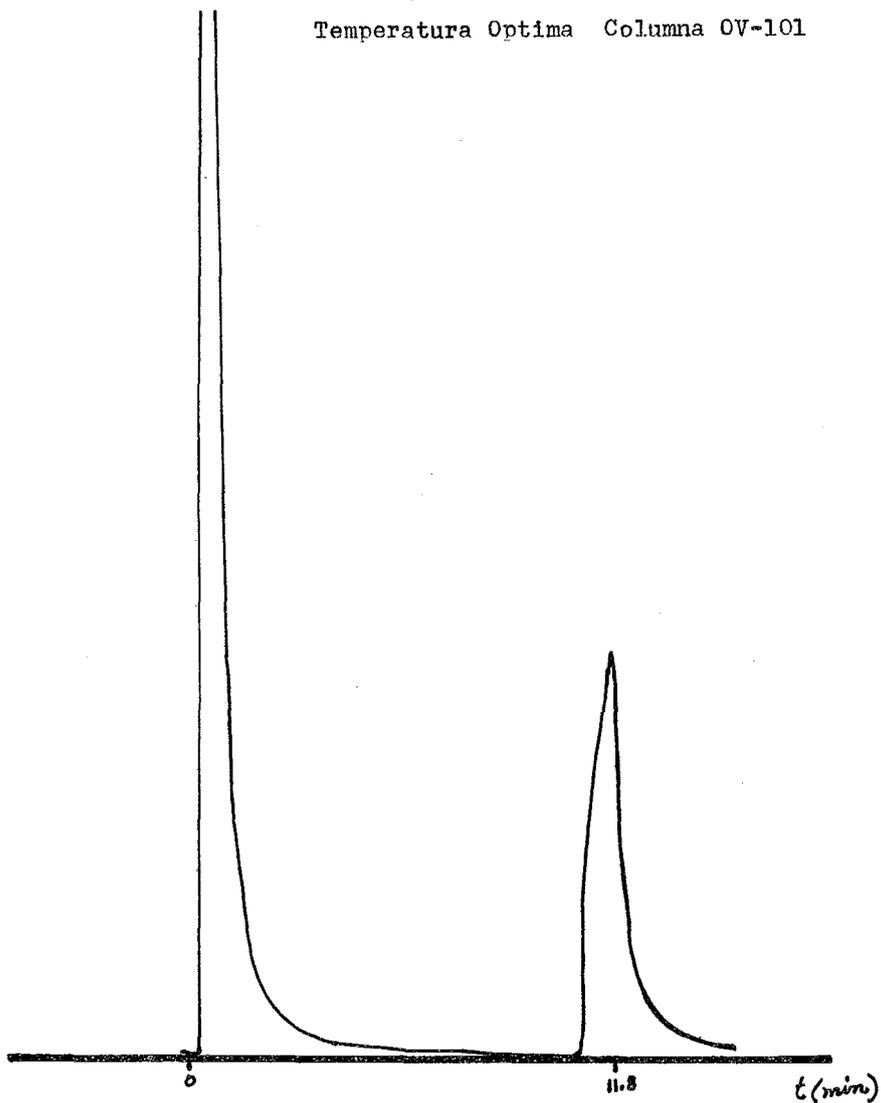
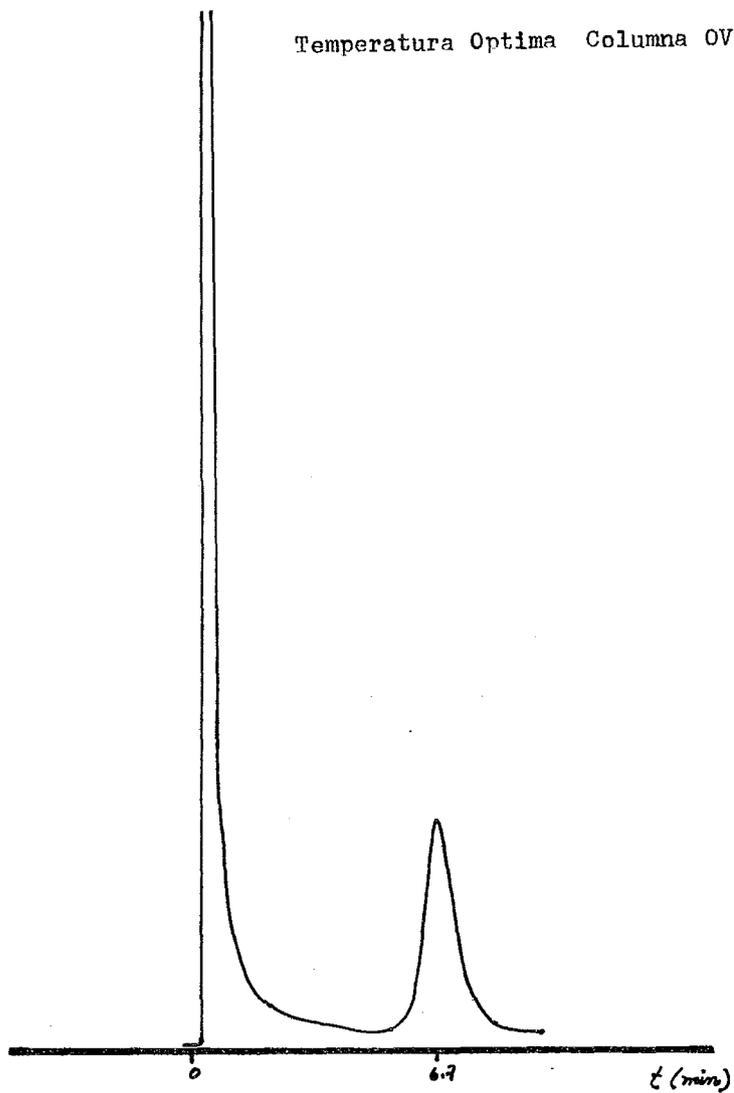


FIGURA 8

Temperatura Optima Columna OV-225



De acuerdo con los resultados obtenidos, la fase estacionaria que más conviene para el análisis del metronidazol es la OV-225.

d) Longitud de la Columna.

Con el objeto de disminuir el tiempo de retención y aumentar la altura del pico del metronidazol, se decidió disminuir la longitud de la columna. Se preparó una columna con OV-225 de 80 cm de longitud en la que se inyectaron soluciones de metronidazol en metanol; los picos obtenidos fueron más altos y angostos, y el tiempo de retención disminuyó (figura 9).

e) Temperatura de la Columna.

Como se puede ver en la tabla 4, la temperatura óptima de la columna OV-225 es de 230°C, sin embargo como se redujo la longitud de la columna la temperatura se bajó a 200°C ya que a esta temperatura se obtuvo una buena señal del metronidazol.

f) Flujo de Nitrógeno.

El flujo de nitrógeno que dió mejores resultados usando la columna de 80 cm de longitud fué de 30 ml/min.

2. Columna Optima.

Como se explicó anteriormente, la columna que dió mejores resultados fué la OV-225, debido a que con esta columna se obtienen picos bastante simétricos (figuras 4 y 8).

FIGURA 9

Columna de Vidrio de 80 cm Empacada
con OV-225

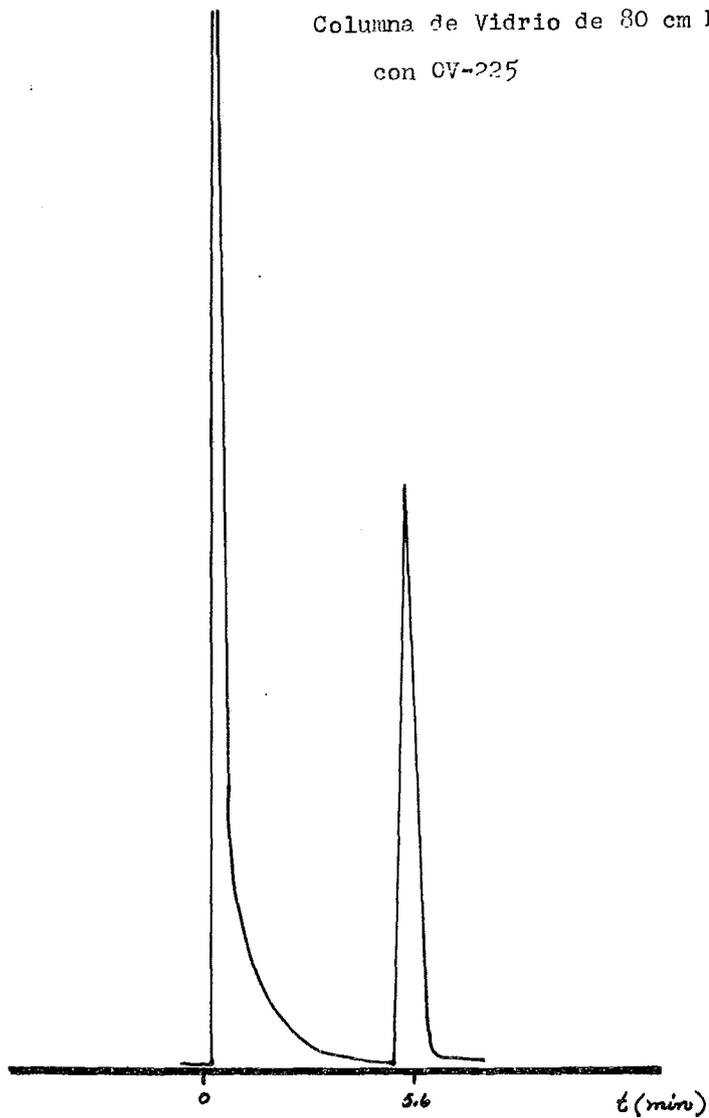
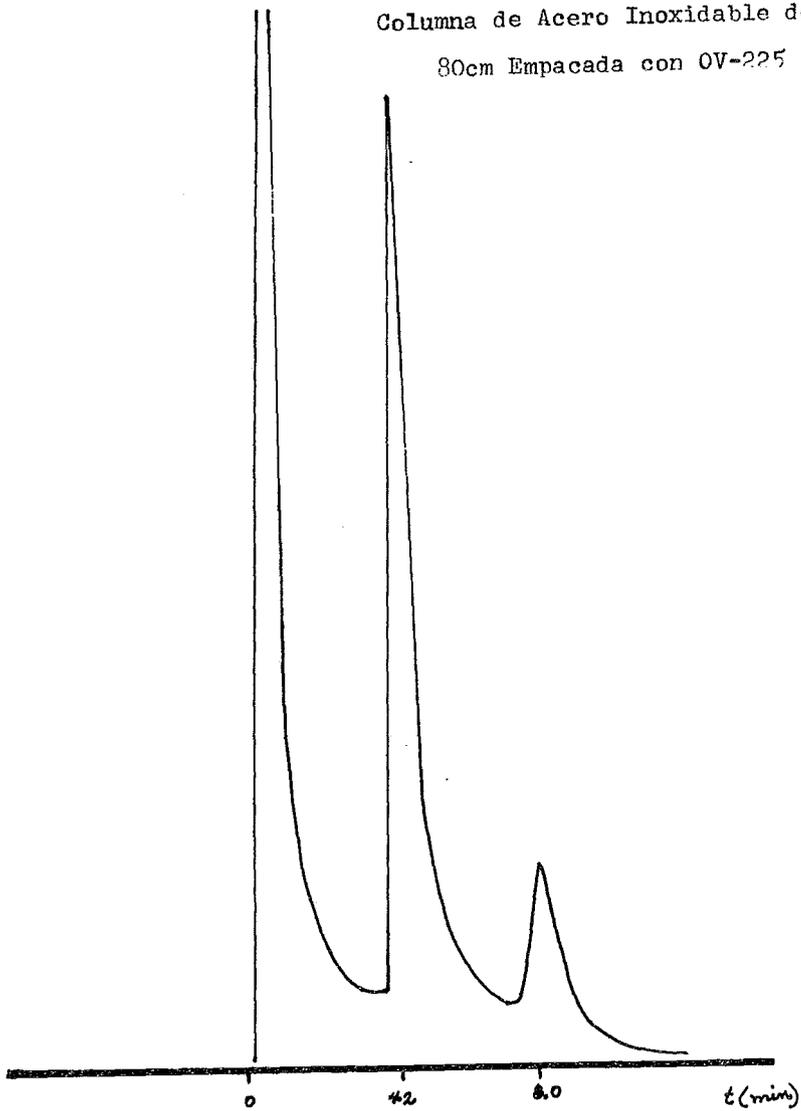


FIGURA 10

Columna de Acero Inoxidable de
80cm Empacada con OV-225



El sistema cromatográfico descrito se utilizó en las determinaciones de la cantidad mínima detectable de metronidazol con los tres detectores estudiados.

3. Sensibilidad.

La cantidad mínima detectable de metronidazol con el detector de ionización de flama de hidrógeno fué de 10 $\mu\text{g/ml}$ usando metanol como disolvente y de 5 $\mu\text{g/ml}$ usando agua como disolvente. (tabla 5).

Con el detector de captura de electrones el mínimo detectable fué de 0.01 $\mu\text{g/ml}$ usando metanol o agua como disolvente. La sensibilidad con este detector es muy alta. (tabla 6)

La cantidad mínima detectable de metronidazol con el detector de ionización de flama alcalina fué de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ en metanol y 0.1 $\mu\text{g/ml}$ en agua. (tabla 7)

4. Diferencias en Función de la Respuesta de los 3 Detectores.

Detector	Min. detectable en metanol ($\mu\text{g/ml}$)	Min. detectable en agua ($\mu\text{g/ml}$)	Linealidad (coef. corr.)	
			Metanol	Agua
DIFH	10.00	5.00	0.980	0.995
DCE	0.01	0.01	0.988	0.997
DIFA	0.50	0.10	0.988	0.989

Con el detector de ionización de flama de hidrógeno la respuesta del metanol a sensibilidades altas es muy grande y ta

TABLA 5

Mínimo Detectable con el Detector de

Ionización de Flama de Hidrógeno

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	En metanol	En agua
	Area (cm^2) $\times 10^{-9}$	Area (cm^2) $\times 10^{-9}$
10,000	7.400	
5,000	3.160	2.420
1,000	1.720	0.520
500	0.214	0.330
100	0.050	0.082
50	0.022	0.027
10	Mínimo	0.004
5		Mínimo

TABLA 6

Mínimo Detectable con el Detector de

Captura de Electrones

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	En metanol Area (cm^2) $\times 10^{-9}$	En agua Area (cm^2) $\times 10^{-9}$
100.00		56.00
50.00	39.36	35.28
10.00	26.24	11.52
5.00	10.88	7.56
1.00	3.60	2.58
0.50	2.08	1.47
0.10	1.28	0.75
0.05	0.58	0.53
0.01	Mínimo	Mínimo

TABLA 7

Mínimo Detectable con el Detector de

Ionización de Flama Alcalina

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	En metanol	En agua
	Area (cm^2) $\times 10^{-11}$	Area (cm^2) $\times 10^{-11}$
1000	40.32	163.84
500	19.40	83.52
100	9.86	17.76
50	4.16	11.28
10	0.92	2.32
5	0.27	1.97
2		0.48
1	0.14	0.18
0.5	Mínimo	0.04
0.1		Mínimo

pa la señal del metronidazol, obteniéndose así un mínimo detectable muy alto. El agua con este detector da una señal muy pequeña (prácticamente no da señal), sin embargo la señal que se obtuvo fué bastante grande debido tal vez a que el agua contenía impurezas de materia orgánica; es por esto que la cantidad mínima detectable fué también muy alta empleando este disolvente.

La linealidad es bastante buena con el detector de ionización de flama de hidrógeno como se puede ver en las gráficas 1 y 2.

La respuesta del metronidazol con el detector de captura de electrones fué mucho mayor que con el detector de ionización de flama de hidrógeno. A concentraciones mayores de 100 $\mu\text{g/ml}$ se saturó el detector. Debido a la alta sensibilidad de este detector, el metanol presentó varias señales que estorbaron al pico del metronidazol. Todos estos picos se deben a pequeñas impurezas que contiene el metanol. Se probó usar metanol de mayor pureza pero también dió varios picos, por lo que se procedió a purificarlo. La primera purificación que se efectuó (12) no ayudó en nada a reducir las impurezas,, pero se hizo una segunda purificación (13) con la que disminuyeron las impurezas pero no desaparecieron. Las impurezas que puede tener el metanol son: CO_2 , éter metílico, formiato de metilo, acetato de metilo, formaldehído, acetaldehído, acetona, etanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-metil 2-propanol y agua (14).

La linealidad con este detector es muy buena (gráficas 3 y 4).

La respuesta de los disolventes con el detector de

ionización de flama alcalina es bastante pequeña, sobre todo la del agua, por lo que la señal del metronidazol se obtiene con mayor facilidad que en el caso del detector de captura de electrones. La sensibilidad de este detector es bastante buena. En las gráficas 5 y 6 se puede ver que la linealidad también es buena.

5. Extracción del Metronidazol.

a) Determinación del pH Óptimo de Extracción del Metronidazol.

Para determinar cuál es el pH óptimo al que se debe llevar a cabo la extracción del metronidazol del plasma, se utilizó el detector de ionización de flama de hidrógeno debido a que es el que presenta mayor estabilidad, además de no presentar problemas con el cloroformo como en el caso del detector de captura de electrones y el de ionización de flama alcalina. Se llevó a cabo la extracción del metronidazol con cloroformo a diferentes pH's como se indica en el capítulo II parte 5 y se inyectaron la fase orgánica y la fase acuosa. De esta manera se pudieron obtener los valores de la constante de extracción del metronidazol con cloroformo a los diferentes pH's.

El valor de la constante aparente D' se calcula dividiendo la concentración de metronidazol en la fase orgánica entre la concentración del mismo en la fase acuosa, esto es:

$$D' = \frac{|M|_{org.}}{|M|_{ac.}}$$

Como el área del pico del metronidazol es proporcional a la concentración de éste, se puede obtener la constante aparente de extracción dividiendo el área del pico del metronidazol de la fase orgánica entre el área del pico del metronidazol de la fase acuosa:

$$D' = \frac{A \text{ org.}}{A \text{ ac.}}$$

En la tabla 8 se presentan los resultados de las constantes aparentes de extracción a los diferentes pH's. El pH óptimo de extracción fué 9.

b) Extracción del Metronidazol en Solución Acuosa.

Una vez obtenido el pH óptimo de extracción y la constante aparente de extracción a este pH, se calculó el número de extracciones y volúmen de la fase orgánica necesarios para tener una extracción cuantitativa del metronidazol.

Para que la extracción sea cuantitativa $q = 10^{-2}$, dónde q es la fracción en fase acuosa.

$$q = \frac{1}{1 + D \frac{V_{\text{org.}}}{V_{\text{ac.}}}}$$

A pH = 9 D = 0.967

$$q = \frac{1}{1 + 0.967 \frac{V_{\text{org.}}}{V_{\text{ac.}}}}$$

Para extracciones sucesivas se tiene:

$$q^n = \left(\frac{1}{1 + 0.967 \frac{V_{\text{org.}}}{V_{\text{ac.}}}} \right)^n$$

TABLA 8

Valores de D' a diferentes pH's

pH	D'
11.0	0.652
10.5	0.686
10.0	0.666
9.5	0.857
9.0	0.967
8.5	0.796
8.0	0.783
7.5	0.700
7.0	0.700
6.5	0.739
6.0	0.680
5.5	0.654
5.0	0.417

Se va a considerar que: $V_{ac.} = 1 \text{ ml}$

$V_{org_{\text{T}}} = 10 \text{ ml}$

Para no tener que evaporar un volúmen muy grande de fase orgánica, se hizo el cálculo considerando un volúmen de fase orgánica total de 10 ml.

$$q^n = \left[\frac{1}{1 + 0.967 (10/n)} \right]^n$$

$$q^n [1 + 0.967 (10/n)]^{-n}$$

$$-\log q^n = n \log [1 + 0.967 (10/n)]$$

Si	$n = 1$	$-\log q^n = 1.03$	$q^n = 9.4 \times 10^{-2}$
	$n = 2$	$-\log q^n = 1.53$	$q^n = 3.0 \times 10^{-2}$
	$n = 3$	$-\log q^n = 1.88$	$q^n = 1.3 \times 10^{-2}$
	$n = 4$	$-\log q^n = 2.13$	$q^n = 0.7 \times 10^{-2}$

Para tener una extracción cuantitativa del metronidazol con cloroformo se requieren efectuar 4 extracciones de 2.5 ml cada una teniendo 1 ml de solución acuosa de metronidazol.

Se llevó a cabo prácticamente la extracción del metronidazol con cloroformo en una solución acuosa de metronidazol de 10 $\mu\text{g/ml}$. La extracción se llevó a cabo como se indica en el capítulo II parte 5. Se inyectaron las soluciones antes y después de la extracción, se calcularon las áreas de los picos del metronidazol y así se obtuvo el rendimiento de la extracción. En la tabla 9 se encuentran los resultados obtenidos.

c) Extracción del Metronidazol del Plasma.

Se efectuaron extracciones de una solución de metroni

dazol en plasma de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se sacaron igualmente los rendimientos (tabla 9). Al efectuar la extracción del metronidazol del plasma hubo problemas ya que se formaba una emulsión, sin embargo ésta se pudo romper por centrifugación o simplemente dejando en reposo el tubo de ensayo durante algunos minutos.

Estas determinaciones se hicieron con el detector de captura de electrones ya que su sensibilidad es bastante buena, aunque el solvente presenta una señal muy grande, sobre todo el plasma (figura 11). No se usó el detector de flama alcalina debido a las dificultades de estabilidad que presenta este detector, aunque hubiera sido más conveniente pues los solventes dan una respuesta menor.

TABLA 9

Rendimientos de Extracción

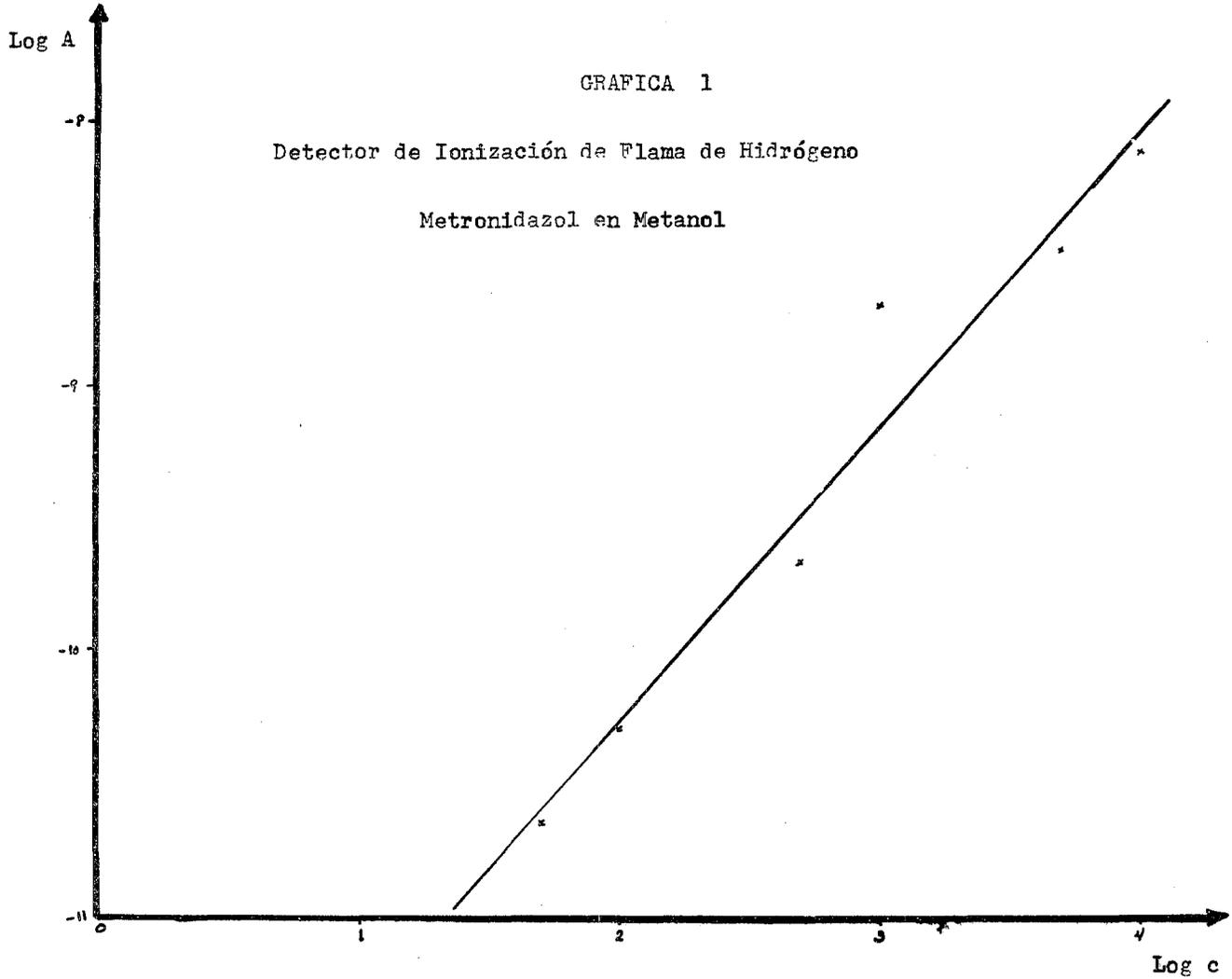
Muestra	De agua	Del plasma
1	94.12 %	90.00 %
2	96.50 %	95.00 %

Como se puede ver en la tabla 9 los rendimientos de extracción obtenidos difieren del valor teórico calculado (99 %); esto se puede deber a errores experimentales ya que durante las extracciones puede haber pérdida del producto.

FIGURA 11

Extracción del Metronidazol



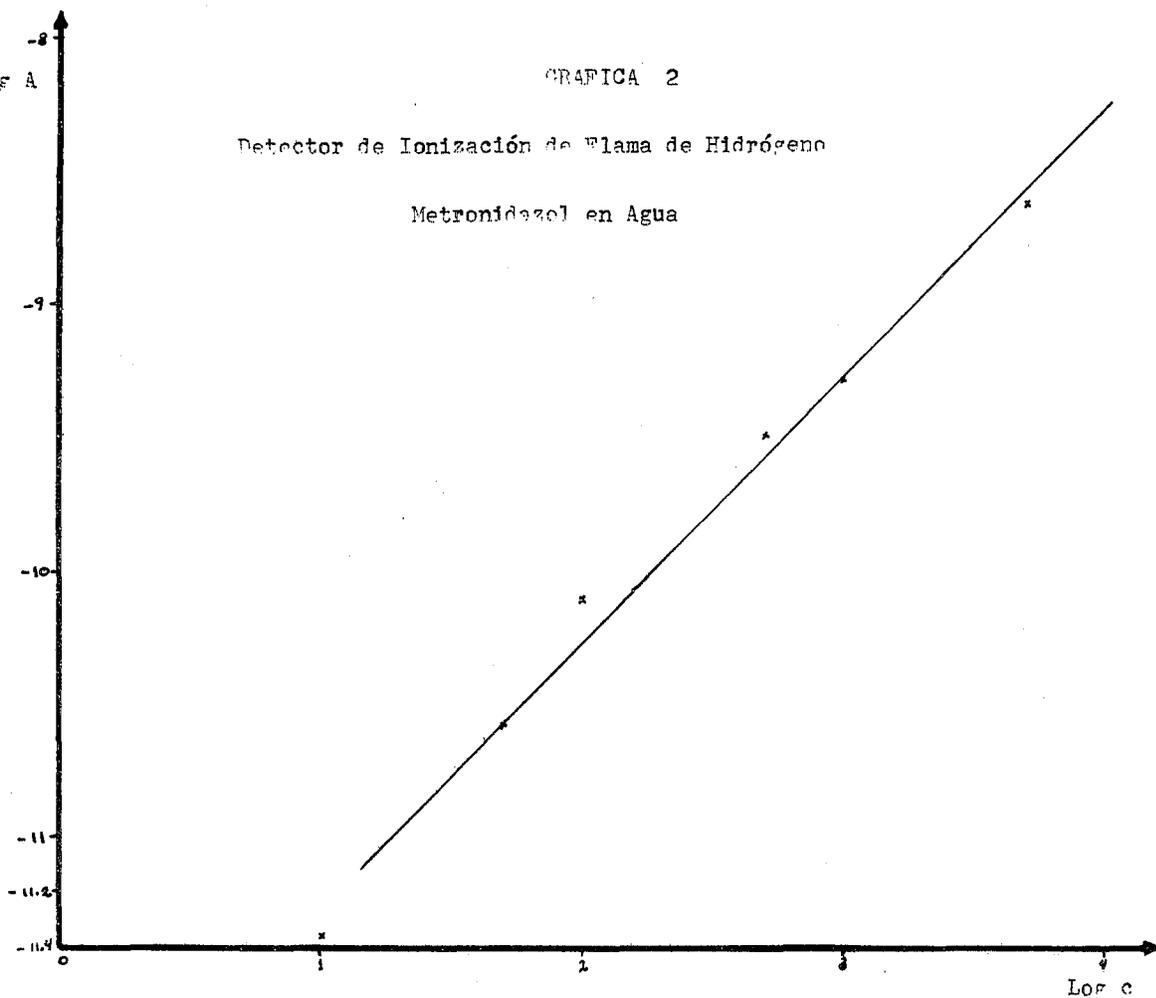


Log A

GRAFICA 2

Detector de Ionización de Flama de Hidrógeno

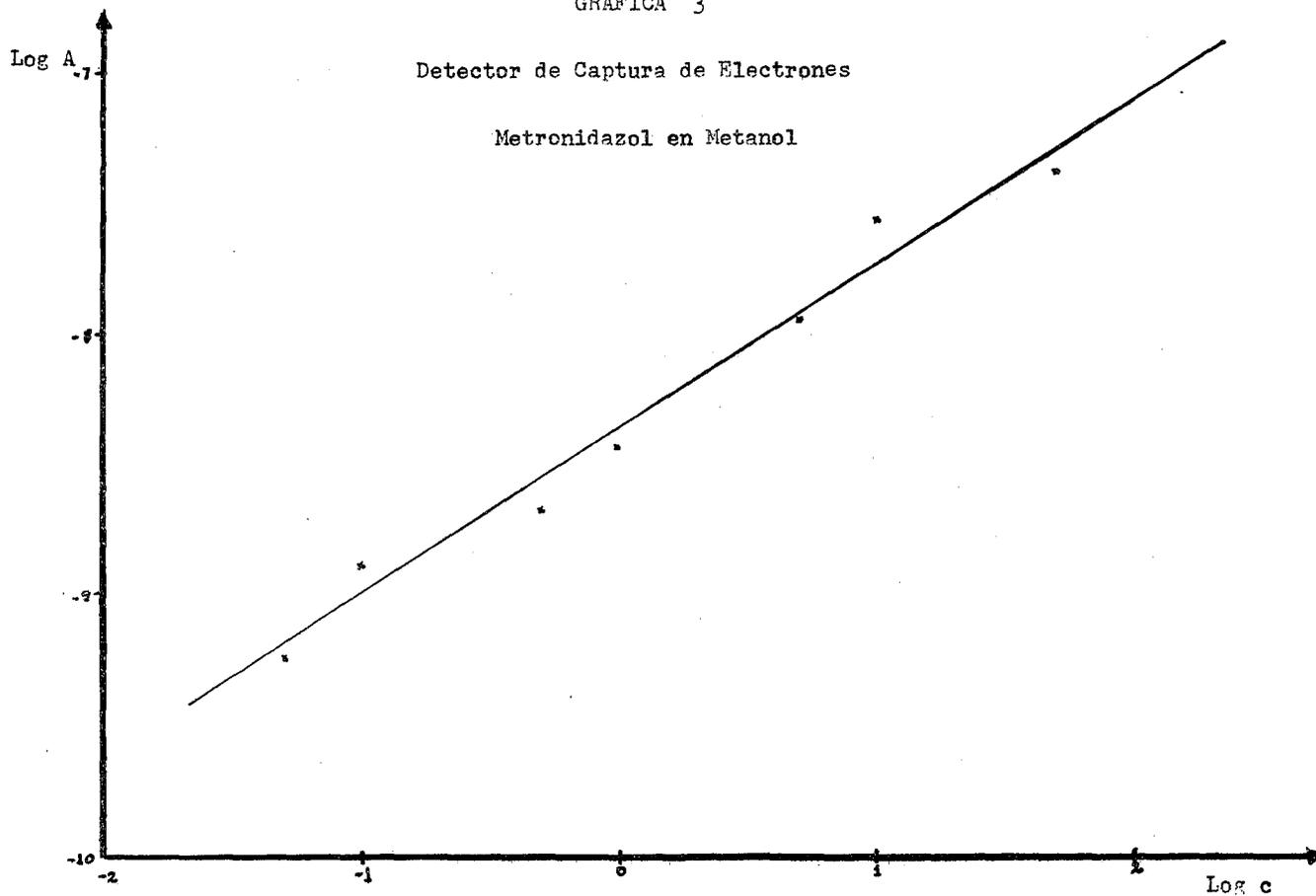
Metronidazol en Agua



GRAFICA 3

Detector de Captura de Electrones

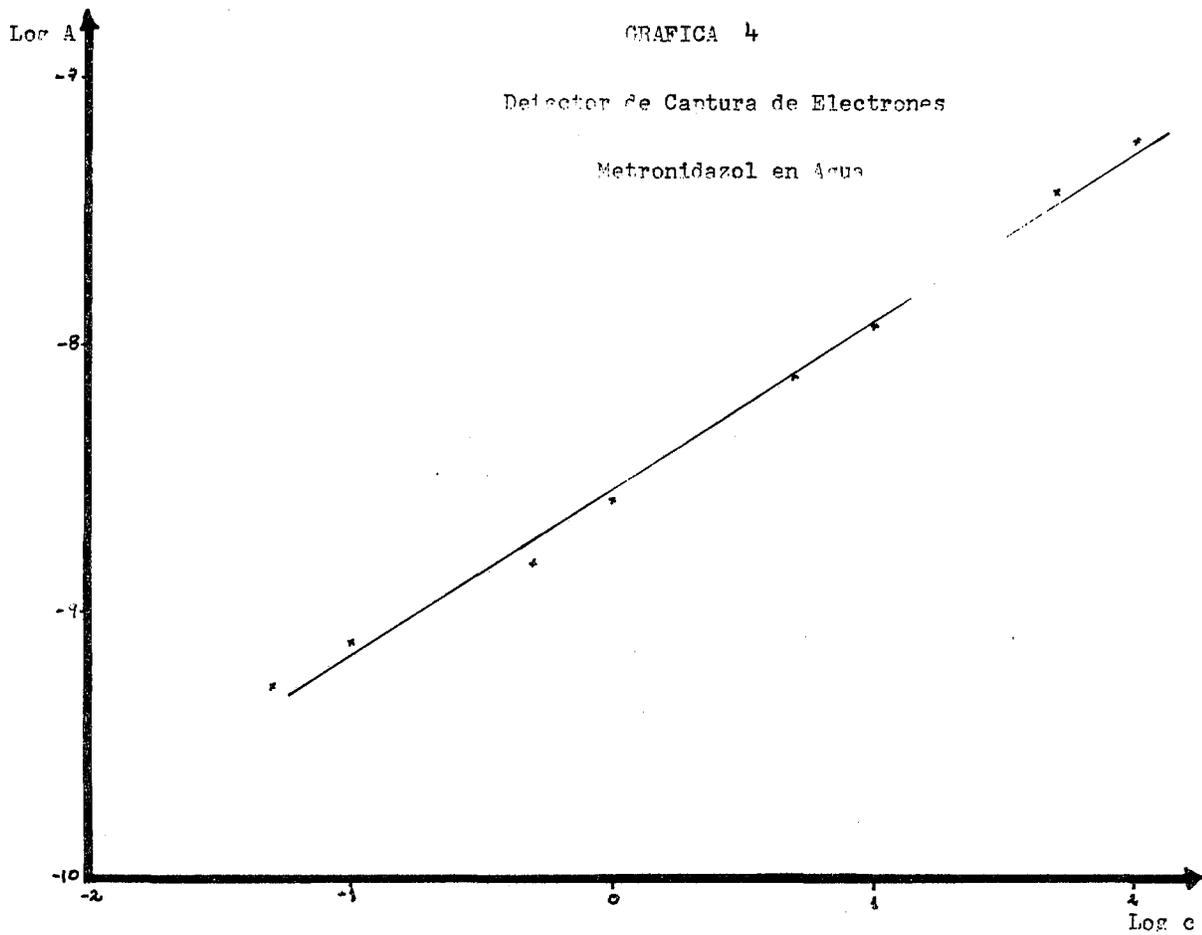
Metronidazol en Metanol



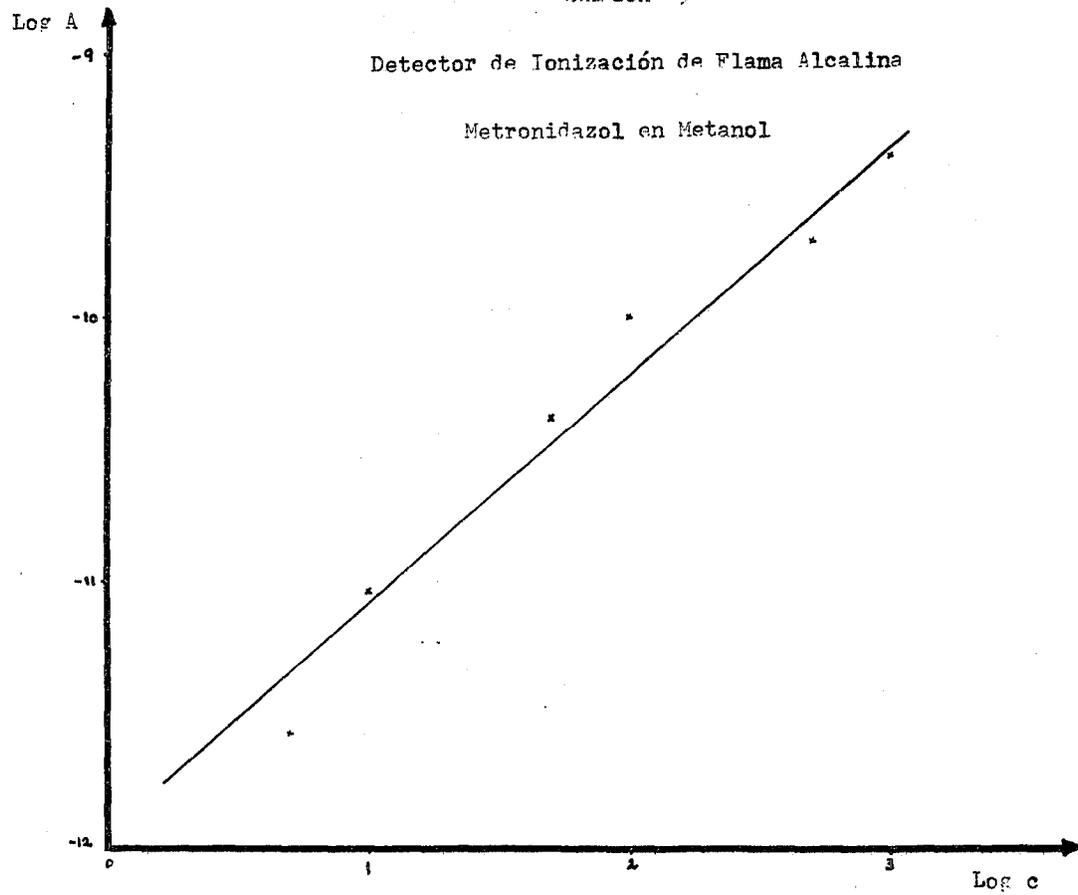
GRAFICA 4

Detector de Captura de Electrones

Metronidazol en Agua



GRAFICA 5

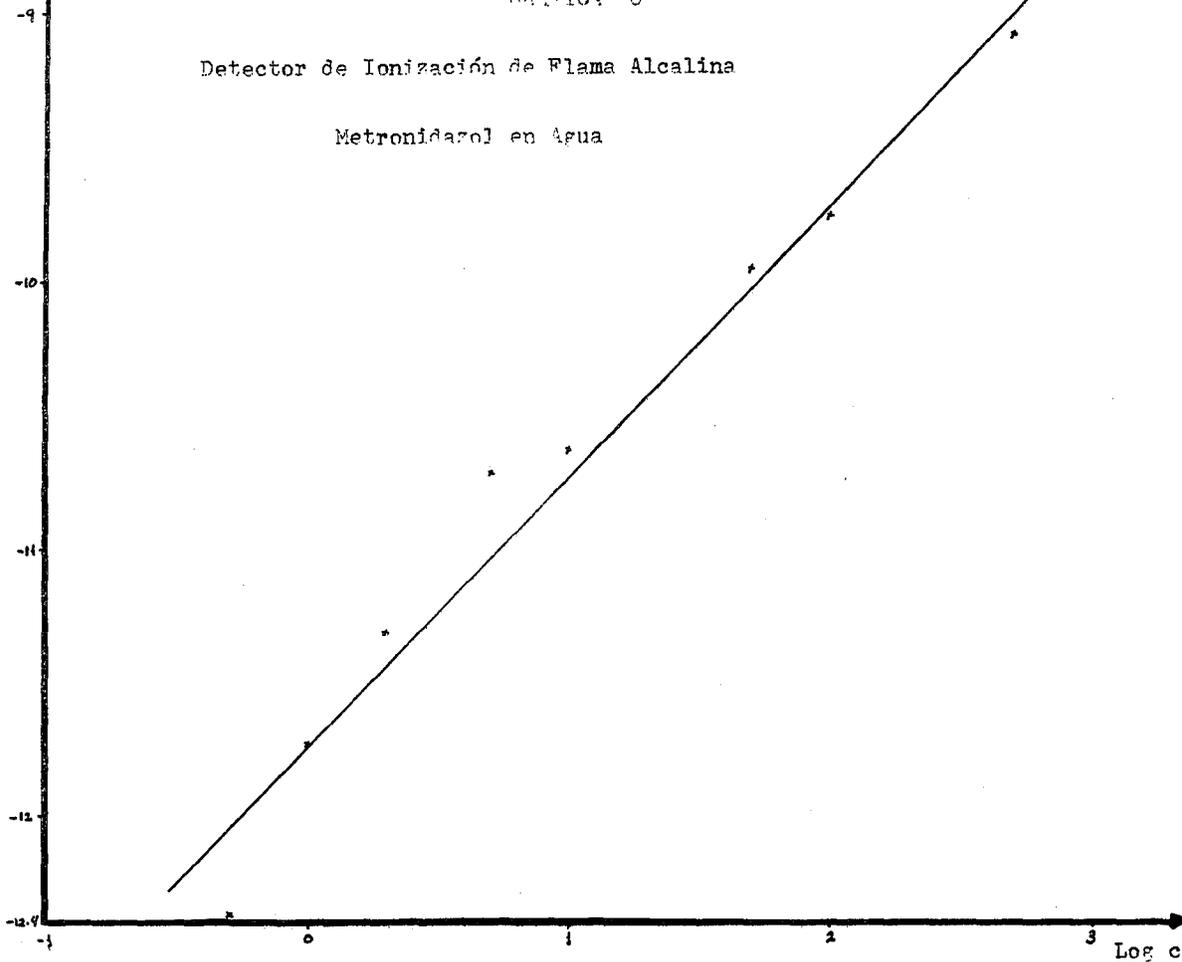


Log A

GRAFICA 6

Detector de Ionización de Flama Alcalina

Metronidazol en Agua



IV

CONCLUSIONES

Es posible efectuar el análisis del metronidazol en plasma por cromatografía de gases sin necesidad de efectuar el derivado silitado del fármaco utilizando el OV-225 como fase estacionaria. Es necesario utilizar una columna de vidrio para evitar la descomposición del metronidazol.

El detector de ionización de flama de hidrógeno tiene una sensibilidad muy baja por lo que no es conveniente este detector para la realización de estudios farmacocinéticos. En cambio, el detector de captura de electrones tiene una sensibilidad muy alta al metronidazol lo mismo que el detector de ionización de flama alcalina. Debido a la alta sensibilidad del detector de captura de electrones, la respuesta del solvente es demasiado grande por lo que se presentan algunos problemas para determinar el área del pico del metronidazol a concentraciones muy bajas. El detector de ionización de flama alcalina tiene también una buena sensibilidad al metronidazol y además tiene la ventaja de no dar una respuesta muy grande a los solventes. Sin embargo, este detector presenta poca estabilidad por lo que se dificulta su utilización, pero en trabajo rutinario se podría lograr una buena estabilidad teniendo el detector prendido continuamente.

El método utilizado para la extracción del metronidazol del plasma es sencillo y rápido, además de tener un rendimiento aceptable.

Así, en este trabajo se ha propuesto un método analítico para metronidazol que es simple y rápido. Se pueden detectar y cuantificar niveles plasmáticos de metronidazol, por lo

que sería factible realizar estudios farmacocinéticos utilizando este método analítico.

V

BIBLIOGRAFIA

- (1) Remington's Pharmaceutical Sciences
5th Edition
Mack Publishing Co. (1975)
- (2) The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals and Drugs
Eighth Edition
Merck and CO., Inc.
Rahway, N.J., U.S.A. (1968)
- (3) Edward P.K. Lau et al. Colorimetric Determination of some
N-1-substituted Nitroimidazoles. Journal of Pharmaceutical
Sciences 58 [1] 55-57 (1969).
- (4) J.A.F. de Silva, N. Munno y N. Strojny. Absorptiometric,
Polarographic and Gas Chromatographic Assays for the
Determination of N-1-substituted Nitroimidazoles in Blood
and Urine. Journal of Pharmaceutical Sciences. 59 [2]
(1970).
- (5) K.K. Midha, I.J. Mc. Gilveray and J.K. Cooper.
Determination of Therapeutic Levels of Metronidazole in
Plasma by Gas-Liquid Chromatography. Journal of Chromato-
graphy 87 491-97 (1973).
- (6) N.F. Wood GLC Analysis of Metronidazol in Human Plasma.
Journal of Pharmaceutical Sciences 64 [6] (1975).
- (7) W.R. Supina
The Packed Column in Gas Chromatography
Supelco, Inc.
Bellefonte, Pennsylvania, U.S.A. (1974)
- (8) Analabs. Guide to Stationary Phases for Gas Chromatogra-
phy. 12th Edition. Ed. Joel A. Yancey.

- (9) Manual Práctico de Cromatografía de Gases.
- (10) M.V. Dabrio
Cromatografía de Gases
Ed. Alhambra, S.A.
Madrid (1978)
- (11) R.J. Laub y R.L. Pecsok
Physicochemical Applications of Gas Chromatography
John Wiley and Sons
New York (1978)
- (12) Morton-Mark. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 6, 151 (1931)
- (13) Eveis-Knox. J. Am. Chem. Soc., 73, 1739 (1951)
- (14) Weissberger Arnold
Techniques of Chemistry
V. II Organic Solvents
3th Edition
Wiley Interscience, New York (1970)