

53
28



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**DETERMINACION DE p-ACETAMIDOFENOL EN FLUIDOS
BIOLOGICOS, POR CROMATOGRAFIA DE GASES Y
DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION**

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION

Que para obtener el titulo de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGO
p r e s e n t a

Patricia Elizabeth Morales Barajas



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México

1988



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.

C O N T E N I D O

| | Pag. |
|---|------|
| OBJETIVOS | 1 |
| INTRODUCCION | 2 |
| 1 GENERALIDADES | 3 |
| 1.1 p-Acetamidofenol | |
| 1.2 Propiedades | |
| 1.3 Efectos farmacológicos | |
| 1.3.1 Biotransformación | |
| 1.3.2 Reacciones metabólicas | |
| 1.4 Toxicidad | |
| 1.5 Usos y dosis | |
| 2 CROMATOGRAFIA INSTRUMENTAL | 18 |
| 2.1 Cromatografía de gases (CG) | |
| 2.1.1 Gas portador | |
| 2.1.2 Control de flujo y su medición | |
| 2.1.3 Muestra | |
| 2.1.4 Columnas | |
| 2.1.5 Detectores | |
| 2.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) | |
| 2.2.1 Sistema cromatográfico | |
| 2.2.2 Clasificación | |
| 2.2.3 Notación y terminología | |
| 2.2.4 Equipo instrumental | |
| 2.2.5 Columnas | |
| 2.2.6 Fase móvil | |
| 3 CUANTIFICACION POR CROMATOGRAFIA DE GASES (CG) | 52 |
| 3.1 Determinación en suero | |
| 3.2 Determinación en plasma | |
| 3.3 Determinación en orina | |
| 3.4 Determinación en otros fluidos biológicos | |

| | Pag. |
|--|------|
| 4 CUANTIFICACION POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (CLAR) | 74 |
| 4.1 Determinación en suero | |
| 4.2 Determinación en sangre | |
| 4.3 Determinación en plasma | |
| 4.4 Determinación en orina | |
| 4.5 Determinación en otros fluidos biológicos | |
| 5 DISCUSION | 134 |
| 6 CONCLUSIONES | 138 |
| BIBLIOGRAFIA | 140 |

OBJETIVOS

Los métodos para la cuantificación de paracetamol usan una gran variedad de técnicas analíticas incluyendo espectroscopía, espectrofotometría, cromatografía, voltametría, etc.

El objetivo principal de este trabajo, es presentar una revisión bibliográfica de las técnicas para llevar a cabo los análisis de diferentes fluidos biológicos por cromatografía de gases y de líquidos de alta resolución, para evaluar concentraciones de este fármaco y tener un diagnóstico en casos de sobredosis o intoxicación, ya que el acetaminofén puede causar daño renal o hepático y del conocimiento e interpretación de sus concentraciones en sangre o plasma, dentro de las primeras horas de ingestión, es posible aplicar un tratamiento terapéutico correctivo.

INTRODUCCION

El paracetamol es un analgésico y antipirético que a la fecha está sustituyendo a la aspirina, además de ser menos tóxico que ésta y que se puede dar a personas sensibles a la misma.

Se presentan los métodos para determinar p-Acetamidofenol en sangre, suero, plasma, orina y otros fluidos biológicos, por CG (Cap. 3) y CLAR (Cap. 4), clasificándolos tentativamente en base a estos parámetros y haciendo resaltar las diferencias entre ellos a manera de tablas, previa exposición de procedimientos típicos.

Se incluye una revisión de las propiedades y efectos farmacológicos de este analgésico (Cap. 1) así como los antecedentes teórico-prácticos considerados como básicos, de la cromatografía instrumental (Cap. 2).

Se discute la información analizada (Cap. 5), se presentan los aspectos más relevantes a manera de conclusiones (Cap. 7) y la bibliografía mínima seleccionada para el desarrollo de la hipótesis de trabajo indicada como contexto.

CAPITULO 1

GENERALIDADES

1.1 p-Acetamidofenol.

Sinónimos: N-acetil-p-aminofenol, p-hidroxi-acetanilida, 4-hidroxiacetanilida, acetaminofén y paracetamol.

Es un compuesto acetilado usado primeramente en medicina por Von Mering en 1893 (1).

El acetaminofén es uno de los principales derivados del p-aminofenol. La anilina, de la que derivan la fenacetina y el acetaminofén, posee propiedades analgésica y antipirética pero resulta demasiado tóxica para su uso clínico, el p-aminofenol también es apreciablemente tóxico y tampoco se emplea para este uso terapéutico (2).

Si se reemplaza en la anilina un hidrógeno del grupo amino por el radical acetyl da acetanilida; esto disminuye la toxicidad pero el compuesto aún resulta dañino y su uso ha sido abandonado.

Al efectuar sustituciones en la molécula del p-aminofenol para disminuir su toxicidad se llegó tanto al acetaminofén, derivado acetilado igual que la acetanilida; como a la fenacetina o acetofenetidina, éter etílico del anterior, pero algo más tóxico que el paracetamol. Estos derivados del p-aminofenol son potentes antipiréticos y analgésicos con no muchas propiedades antiinflamatorias (3). Asimismo el acetaminofén es el mayor metabolito de la fenacetina.

1.2 Propiedades.

Propiedades físicas. El paracetamol es un polvo cristalino blanco inodoro con sabor amargo. Peso molecular = 151.16 con punto de fusión = 169-170.5 ° C.

Su solubilidad es baja en agua fría (1 g en 70 ml); más soluble en agua caliente en proporción 1:20. Soluble en metanol, etanol, dimetilformamida, dicloruro de etileno, acetona y acetato de etilo. Insoluble en éter de petróleo, pentano y benceno (4). Soluble en soluciones de hidróxidos alcalinos. Una solución saturada tiene un pH cerca de 6. Se almacena en recipientes protegidos del aire y la luz.

Se ha observado que la absorción de paracetamol se mejora con la adición de sorbitol. Los estudios "in vitro" con tabletas conteniendo 500 mg de paracetamol y 100 mg de sorbitol muestran que éste no forma un complejo absorbible, sino que actúa únicamente mejorando el grado de disolución del acetaminofén.

Estabilidad: el p-acetamidofenol es muy estable en soluciones acuosas. La vida media en soluciones reguladas a pH=6 se estima de 21.8 años a temperatura ambiente, la degradación fué catalizada por ácidos y bases. La vida media fué de 0.73 años a pH=2 y 2.28 años a pH=9. Los productos de degradación son: p-aminofenol y ácido acético (5).

Su espectro de absorción ultravioleta en metanol presenta un máximo a 249 nm (E 1%, 1cm=900), Fig. 1.1.

En su espectro de infrarrojo en bromuro de potasio, los principales picos están a : 1650, 1563 y 1443 cm, (6) Fig. 1.2.

Propiedades químicas: El acetaminofén tiene características polares. Siendo una base débil se absorbe más rápidamente

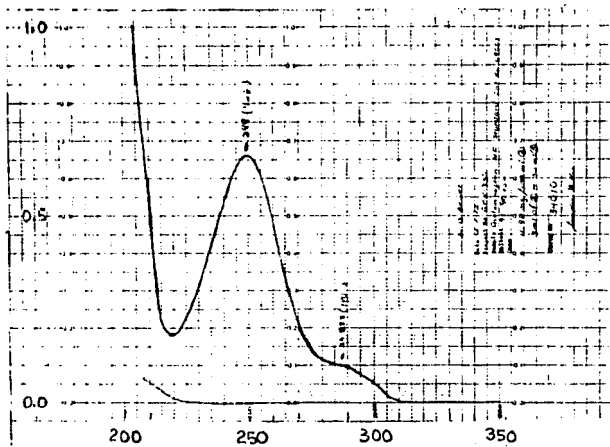


Fig. 1.1 Espectro Ultravioleta de Acetaminofén.

Fuente: Analytical Profiles of Drug Substances. Vol. 3
Ed. Klaus Florey
Academic Press Inc. (London) LTD
New York 1974.

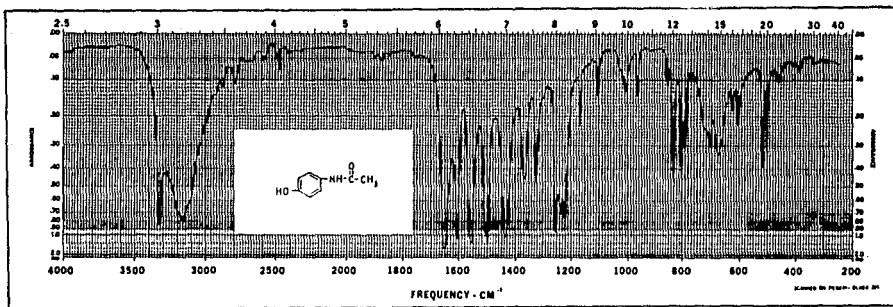


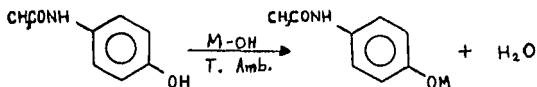
Fig. 1.2 Espectro Infrarrojo de Acetaminofén.

Fuente: Sadtler Research Labs. The Sadtler Standard Spectra.
Sadtler Res. Labs. Inc. Philadelphia, 1972.

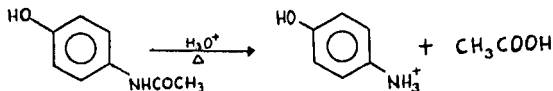
en el intestino y muy poco en el estómago (1).

El paracetamol reacciona con el cloruro férrico dando una coloración azul. Con el reactivo de Lieberman, con ácido clorhídrico caliente en solución acuosa y con dicromato de potasio en frío, da una coloración violeta.

Forma ésteres con los ácidos sulfúricos y glucurónicos. Forma sales hidrosolubles con metales alcalinos (M) principalmente sodio y potasio, derivadas del reemplazo del protón ácido del OH (4).

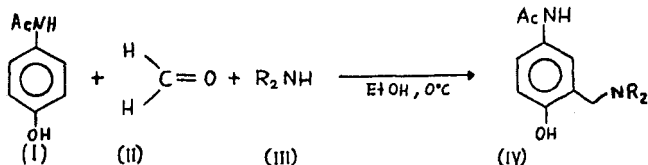


Su hidrólisis ácida es la típica del grupo funcional amido (7).



Sustitución electrofílica aromática.

La reacción de formalina con acetaminofén vía SEA en presencia de aminas alifáticas secundarias lleva por deshidratación a la correspondiente amina terciaria (8).



La relación molar informada de I/II/III es 1/3.72/5.52. En estas condiciones cuando R= Et, IV es el producto princi-

pal, cuando R=Me, IV es el producto mayoritario obteniéndose en menor proporción el producto 2,6 diaminoalquilado.

1.3 Efectos farmacológicos.

El acetaminofén tiene acción antipirética, analgésica y antiinflamatoria en forma semejante o en mayor grado que los compuestos del ácido acetyl salicílico provocando descenso de la temperatura en animales y humanos febriles en su acción antipirética y aliviando los dolores somáticos como analgésico. A diferencia de los salicilatos que si son antiinflamatorios, el acetaminofén no es un antiinflamatorio potente.

Su mecanismo de acción es semejante a los salicilatos o sea, acción antipirética de origen central y central periférica para la analgesia (1).

Sin embargo el acetaminofén no es antiinflamatorio urico-súrico; poniendo de relieve que la intensidad y no la naturaleza es lo que determina si el paracetamol es efectivo o no, su efectividad es similar a la aspirina y el acetaminofén se puede usar cuando la irritación gástrica o sensibilidad del paciente por aquella es un problema.

Otra forma de acción es la inhibición de prostaglandinas, no es conocida totalmente pero puede estar relacionada a su acción como antagonista de la bradicina y más verosímilmente a su capacidad de inhibición de síntesis de estas prostaglandinas que son liberadas durante la inflamación (2).

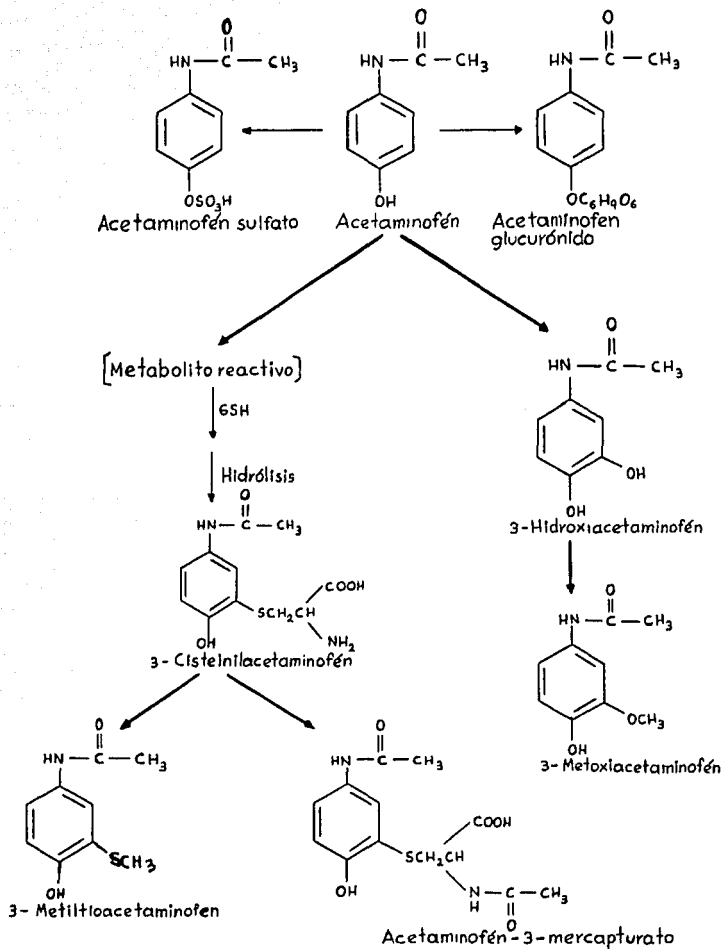
Las prostaglandinas son compuestos químicos de naturaleza lipídica, se encuentran en casi todas las células y tejidos, desempeñan funciones importantes en el organismo tales como:

elevar o disminuir la presión sanguínea, mediar una inflamación, proteger contra úlceras y regular la reproducción (9). Su vida media es corta y actúan probablemente como mediadoras o moduladoras en el lugar de liberación, además de gran variedad de efectos fisiológicos y aplicaciones terapéuticas potenciales, cuya importancia biológica se ha hecho resaltar a últimas fechas (10,11).

1.3.1 Biotransformación (Fig. 1.3).

El paracetamol se absorbe por todas las vías incluyendo la digestiva, se absorbe algo en el estómago y muy rápidamente en el intestino; ya absorbido pasa a la sangre donde alcanza una concentración máxima a la primera o segunda hora de ingestión, se combina con las proteínas plasmáticas distribuyéndose así por todos los tejidos. Es de rápida biotransformación lo cual hace que los niveles sanguíneos desciendan rápidamente y no haya acumulación por dosis repetidas. La vida media del paracetamol y de sus metabolitos fué cerca de 4 horas (en recién nacidos se incrementa a cerca de 5 horas) y cuando es más grande es una señal de posible daño hepático. La absorción de paracetamol parece ser influenciada por : la velocidad de vaciado gastrointestinal, la presencia de alimento (especialmente carbohidratos) y la hora del día a la cual es tomado (12). La administración de propanetelina y metoclopramida reduce e incrementa respectivamente la absorción de paracetamol.

Se distribuye ampliamente a través de fluidos biológicos por ejemplo es secretado en la saliva en concentraciones similares a las que alcanza en plasma: proteína unida= 8 a 40% en



un volumen de distribución de 1 litro por kg de peso.

La biodisponibilidad de paracetamol en conejos se ve afectada por aminoácidos. En el suministro oral de 10 mg/kg de paracetamol, se ve que se absorbe rápidamente mientras que una administración de paracetamol junto con varios aminoácidos, excepto glicina, bajan los niveles del mismo en plasma. El incremento de acetaminofén en presencia de glicina (100%) se puede deber al incremento en la solubilidad de éste en el tracto gastrointestinal (13).

La biodisponibilidad de acetaminofén en supositorios es más alta que en forma de tabletas, por experimentos "in vitro" se ha encontrado que la biodisponibilidad de los supositorios de paracetamol depende de la base del mismo y del surfactante no aniónico empleado.

La formulación de 85:5 de "Witepsol H" : "Myri 53" mostró la máxima liberación (14).

La composición, tipo de experimento y formulación podrían explicar resultados aparentemente contradictorios, tales como la absorción más lenta de 5 supositorios escandinavos ensayados "in vivo" en 12 voluntarios y correlación de resultados por análisis de plasma y orina después de una sola dosis (15).

El acetaminofén es excretado en forma libre por la orina en un 5% y cerca del 85% conjugado con los ácidos sulfúrico y glucurónico como metabolitos farmacológicamente inertes. El p-aminofenol es el metabolito principal del paracetamol y es el responsable de la producción de metahemoglobinemia, pues se transforma en quinonimina, que forma con el p-aminofenol un sistema de oxidorreducción en forma tal que el oxígeno impli-

cado oxida a la hemoglobina en metahemoglobina.

Alrededor del 85% de la dosis terapéutica es excretada en la orina en 24 horas; del material excretado en el adulto, del 1 al 4% es sin cambio; 20-30% es conjugado con sulfatos, 40-60% es conjugado con ácido glucurónico, 5 a 10% esta compuesto de: 3-hidroxi-3-sulfato; 3-metoxiglucurónico y 3-metoxi-3-sulfato metabolitos, 5-10% esta compuesto de ácido mercaptúrico y cisteína conjugados (1,12).

Bitzen y colaboradores llevaron a cabo estudios sobre la excreción de paracetamol en mujeres lactantes, después de una dosis de 500 mg se encontró que las concentraciones son más bajas en leche que en plasma, en una proporción = 0.76, obtenida de las áreas bajo las curvas concentración-tiempo.

Las vidas medias del paracetamol en plasma y en leche materna son casi idénticas, 2.7 horas en promedio en tratamientos con dosis convencionales.(16).

1.3.2 Reacciones metabólicas (12).

Comprenden principalmente a: la conjugación, la formación de grupos glucurónicos y sulfatos étereos, la hidroxilación (que en posición 3 ocurre seguida por una conjugación o una o-metilación del grupo hidroxilo producido) y la oxidación, que ocurre en pequeña proporción cuando es una dosis terapéutica y es más significativa a grandes dosis.

El metabolito producto de la oxidación se conjuga por la ruta del glutatión para formar ácido mercaptúrico y cisteína conjugados. Aún no se sabe la naturaleza del metabolito oxidado, que puede ser: un epóxido, un metabolito N-hidroxilado, un

derivado de la benzoquinonaimina producto de la N-hidroxilación o un radical.

Este metabolito parece ser responsable de la necrosis hepática en una sobredosis de paracetamol.

En recién nacidos se producen más sulfatos conjugados que en adultos, en éstos las proporciones son iguales o la fracción glucurónica es mayor.

Se ha visto que la administración de salicilamida bloquea la conjugación de paracetamol debido a una inhibición competitiva. En sobredosis, la formación de compuestos sulfato y glucurónico es exhaustiva y ocurre mayor oxidación del fármaco, dando por resultado un incremento de la conjugación del ácido mercaptúrico y cisteína. Dependiendo de la sobredosis, el glutatión puede agotarse y no haber mecanismo para la destoxicación del metabolito.

En pacientes con enfermedades de Crohn y Celiaca, se ha juzgado por las concentraciones en plasma y lavado gástrico, que la absorción de acetaminofén es lenta. La absorción completa del mismo no varía en ambos casos según se determinó por recuperación urinaria, pero la vida media en plasma fué más corta y la conjugación de glucurónido fué más elevada en pacientes con enfermedad de Crohn (17).

1.4 Toxicidad.

Los efectos colaterales o secundarios del paracetamol son generalmente suaves, aunque se han reportado reacciones hematológicas, púrpura y erupciones en la piel. Después de un uso prolongado raramente ocurre daño renal.

En sobredosis los síntomas incluyen: vómito, hemorragia

gastrointestinal, daño cardíaco, daño hepático, edema cerebral y necrosis renal tubular, también se han reportado hiper e hipoglicemia. La necrosis puede ser fatal algunos días después de una sobredosis. Se ha informado daño hepático después de dosis de 7 g aunque se asegura que es causada por 15 gramos en adelante (5).

Por estudios hechos sobre el metabolismo de acetaminofén marcado con ^{14}C radiactivo (18) los pacientes con nefropatía lo metabolizan normalmente, pero la excreción se retrasa en proporción al daño renal. En mujeres sanas y con nefropatía se reporta la vida media de excreción de paracetamol y sus metabolitos durante la fase α , ésta fué 2.58 h en controles, 4.28 h en pacientes con nefropatía analgésica y 6.53 h en pacientes con nefropatía por abuso de otros analgésicos. La recuperación total de ^{14}C en 12 h se correlacionó positivamente con la prueba de aclaramiento de creatinina.

Las concentraciones ($\mu\text{g}/\text{ml}$) de paracetamol en plasma son útiles para diagnóstico: de 120 a 300 son indicativas de una necrosis hepática. Esta es bastante probable a concentraciones mayores de 300 y se considera no probable abajo de 120. Similarmen te después de 12 h de dosificado las concentraciones arriba de 120 indican probable necrosis, de 50 a 120 posible necrosis y abajo de 50 indican necrosis no probable (12).

La necrosis hepática parece ser causada por incremento de la oxidación del acetaminofén que da por resultado la formación de un metabolito tóxico. Este metabolito es normalmente detoxificado por la conjugación con glutatión, pero una vez acabadas las fuentes de éste el metabolito libre es aprovechado para

ser unido covalentemente con las proteínas celulares del hígado ocurriendo 10 horas después de la dosificación.

En una intoxicación aguda de paracetamol el daño hepático puede provocar, en un tiempo de 2-6 días: ictericia, dolor hepático, orina oscura, cilindruria y azoemia (insuficiencia renal), lo que puede conducir a la muerte con un cuadro de encefalopatía hepática (19).

Por estudios hechos en 160 voluntarios se vió que dosis terapéuticas normales, ingeridas continuamente arriba de su límite, causan metahemoglobinemia no detectable (20).

La severidad del daño hepático se ha relacionado a la ruta de los metabolitos primarios del acetaminofén. Por estudios hechos en pacientes con sobredosis de este fármaco y en voluntarios con dosis de 6.5 - 26.6 mmoles (85-100%) de acetaminofén, éste fue excretado en la orina de 24 horas como sus conjugados sulfato, glucurónido, cisteína y ácido mercaptúrico. En los pacientes que desarrollaron daño hepático se vió incrementada la producción de cisteína y ácido mercaptúrico conjugados con el fármaco (21).

En casos de toxicidad severa el estómago debe ser vaciado por aspiración y lavado con un purgante salino tal como el sulfato de sodio (30 g en 250 ml de agua) para promover el peristaltismo. La metahemoglobinemia debería ser tratada con azul de metileno administrado intravenosamente como una solución al 1% en una dosis de 1 a 2 mg por kg de peso. La hemodiálisis puede ser necesaria si ocurre daño renal. Si el daño hepático es severo debería suministrarse hidrocortisona (5).

La hipótesis actual para explicar la toxicidad se basa en

la suposición de que el acetaminofén puede sufrir una N-hidroxilación, reacción demostrada para la fenacetina. Con las dosis terapéuticas, el metabolito tóxico podría ser conjugado y detoxificado por glutatión. Después de dosis grandes, los compuestos del hígado que poseen grupos sulfhídrido podrían agotarse y entonces aparecer la acción tóxica (2b).

De lo anterior el tratamiento puede consistir en proporcionar grupos sulfhídrido para neutralizar los metabolitos tóxicos. El glutatión no penetra a las células y los experimentos se centran alrededor de la acetilcisteína. La prueba de su eficacia cuando se administra intravenosamente en humanos es más o menos convincente. En E.U.A. se administran los grupos sulfhídrido por vía bucal utilizando una preparación (Mucomyst) que se expende como agente mucolítico. Los estudios de la eficacia de la acetilcisteína se hayan en investigación.

1.5 Usos y dosis.

Usos: el paracetamol tiene acciones analgésica y antipirética similares a la aspirina. No tiene propiedades antiinflamatorias. Por tener propiedades similares a las de la aspirina es una alternativa para pacientes sensibles a ella.

Se usa en el tratamiento de dolor para un alivio moderado, como: dolor de muelas, de cabeza, reumatismo y neuralgia.

Como analgésico se usa para dolores traumáticos no intensos, dolores posparto y procesos reumáticos.

Como antipirético se usa cuando la fiebre es perjudicial sobre todo en cuadros leves de corta duración para aliviar al paciente (1,2,12).

Se administra como tableta, jarabe o supositorio.

En veterinaria, el paracetamol es usado como analgésico en perros. Se administra por vía bucal y la dosis usual es de 20 mg/kg de peso.

La posología en humanos es:

Adultos: 0.5 a 1.0 g cada 3 ó 4 horas. No más de 4 g diariamente.

La dosis usual para niños menores de 1 año es de 120 mg, de 1 a 5 años 250 mg y para niños de 6 a 12 años 500 mg.

Dosis oral: 300-600 mg (4).

La dosis letal en el hombre se establece entre 5 a 20 g aunque se ha visto que algunos pacientes se recuperan después de una ingestión de 35 y 40 g.

LD₅₀ (oral) en ratas = 3.7 g/kg (6).

CAPITULO 2

CROMATOGRAFIA INSTRUMENTAL

La cromatografía es un método de aislamiento y separación con numerosas aplicaciones para fines cualitativos, cuantitativos y preparativos.

El principio común de todas las técnicas cromatográficas es el siguiente: un fluido (fase móvil) circula a través de una fase estacionaria (sólido o líquido), cuando una mezcla de sustancias se introduce en el sistema se produce una serie de equilibrios de distribución entre las dos fases, generalmente de distinta magnitud para cada componente de la mezcla, por lo que cada uno de ellos se desplazará con diferente velocidad a lo largo del sistema (22). El resultado final es la separación de los componentes, con todas las ventajas y potencialidad analítica que ello representa.

En la cromatografía instrumental tienen lugares preponderantes la cromatografía de gases y la de líquidos de alta presión, también denominada de alta resolución (CLAR).

En el efluente de la columna salen los componentes individuales separados. Las separaciones o los análisis de mezclas por cromatografía instrumental requieren mucho más precauciones experimentales, pero las grandes ventajas que se logran son que: se pueden hacer separaciones cuantitativas de mezclas complejas que por métodos cromatográficos más simples resultan prácticamente imposibles, además de que los tiempos requeridos para un análisis dado son generalmente cortos, comparados con los usados en otros métodos.

2.1 Cromatografía de gases (CG).

La cromatografía de gases es una técnica de separación que emplea como fase móvil un gas. Fue ideada por James y Martin en 1952 y es de aplicación tanto para compuestos orgánicos como inorgánicos con ciertas restricciones. Los primeros cromatogramas de gases aparecieron en 1954.

La fase móvil también se llama gas portador, éste es un gas inerte el cual transporta el material a separar a una columna en que se efectúa la separación cromatográfica.

La cromatografía de gases, como su nombre lo indica es empleada para la separación de mezclas gaseosas y su análisis, también se emplea para compuestos líquidos volátiles y para sólidos que se pueden pasar al estado gaseoso (23).

Esquema de un cromatógrafo de gases. Fig. 2.1

En este sistema un gas inerte contenido en un cilindro de alta presión pasa a través de un manómetro y una válvula que controla el flujo, al puerto de inyección en donde se introduce la mezcla por separar. La corriente gaseosa continúa a la columna cromatográfica donde se efectúa la separación de los componentes individuales, de allí pasa a un detector en el que se genera una señal eléctrica que activa un registrador y sale del sistema.

La temperatura de inyección, de la columna y del detector se mantienen controladas por medio de resistencias eléctricas acopladas a termóstatos para tener el sistema estabilizado.

2.1.1 Gas portador.

Su propósito primario es transportar los componentes volátiles de la muestra a través de la columna. Este es conecta-

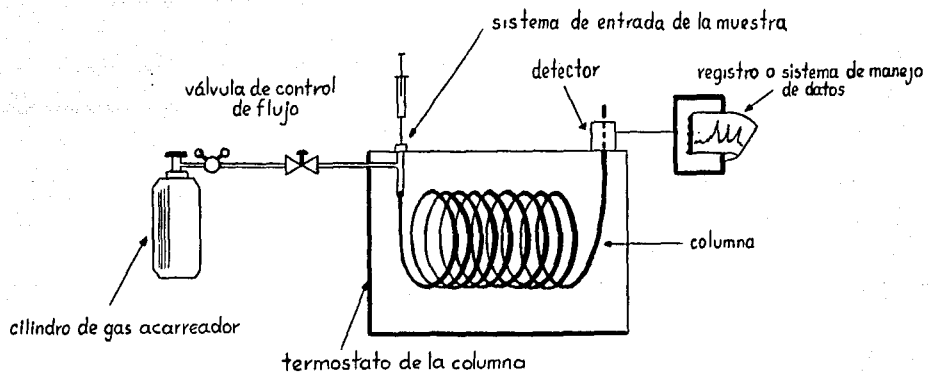


Fig. 2.1 Sistema Cromatográfico de Gases.

do al cromatógrafo empleando un regulador de presión para asegurar un flujo constante a la entrada de la columna. Debe ser inerte y no reaccionar ni con la muestra ni con la fase estacionaria, de pureza elevada, difusividad pequeña y adecuado para el tipo de detector. Los gases comúnmente utilizados son: hidrógeno, helio, nitrógeno y argón.

El flujo del gas portador debe ser fijado adecuadamente, ya que la eficiencia de la columna depende notablemente de este parámetro, cuando el flujo es muy elevado los componentes se separan poco saliendo casi juntos y cuando el flujo es bajo, los componentes permanecen mucho tiempo en la columna. Por el fenómeno de difusión las bandas se van haciendo más anchas. La determinación del flujo óptimo en una separación cromatográfica se logra construyendo una gráfica de alturas equivalentes a un plato teórico (AEPT) contra flujo del gas, Fig. 2.2

La AEPT se calcula por medio de la ecuación:

$$AEPT = \frac{L}{N}$$

donde L = largo de la columna, en cm.

$$N = 16 \left(\frac{x}{y} \right)^2$$

En la x e y se leen del cromatograma experimental.

N representa el número de platos teóricos x = tiempo de retención; y = ancho de la base.

Las impurezas en el gas portador especialmente oxígeno y agua, pueden alterar químicamente la fase líquida y por ende modificar los tiempos de retención. En estos casos y dependiendo del detector a usar se recomienda el helio por su alta pu-

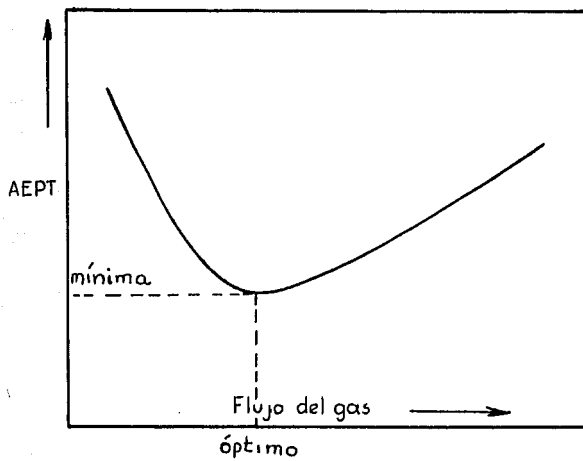


Fig. 2.2 Gráfica de Van Deemter.

reza aunque el nitrógeno tiene mayor eficiencia y producirá más platos teóricos para una determinada longitud de columna; el análisis será más lento que con el helio, debido a su peso molecular.

2.1.2 Control de flujo y su medición.

El control del caudal y medición del gas acarreador son esenciales tanto para el análisis cualitativo y cuantitativo como para la eficiencia de la columna. Esta depende de la velocidad lineal apropiada del gas. El caudal óptimo puede determinarse fácilmente ajustándolo hasta obtener el número máximo de platos teóricos.

En un sistema de flujo por lo general se conecta un regulador de dos etapas al cilindro con el gas portador. La primera etapa indica la presión en el cilindro. Al girar la válvula del regulador se tendrá una presión creciente (registrada en la segunda etapa) al cromatógrafo. Este no funciona bien a presiones bajas. En la segunda etapa se recomienda usar un mínimo de 20 libras/pulg² (psi). Si con esta presión se consigue un caudal demasiado grande, deberá colocarse un tubo constrictor o capilar entre la segunda etapa y el cromatógrafo.

Para cromatógrafos de gases sencillos y baratos que funcionan isotérmicamente, la segunda parte del sistema de control de flujo es una válvula de aguja simple.

Las mediciones de flujo, se hacen por dispositivos tales como un rotámetro y un caudalímetro con burbuja de jabón. El rotámetro proporciona un índice rápido y apropiado del caudal, pero no es exacto.

El caudalímetro de película de jabón es simplemente un tu-

bo calibrado (por lo general una pipeta o bureta) a través del cual fluye el gas portador (24).

2.1.3 Muestra.

La entrada de la muestra deberá permitir la introducción de una amplia variedad de muestras incluyendo gases, líquidos, sólidos y su inyección rápida y cuantitativa en la corriente del gas portador.

Es muy importante que toda la muestra de una determinación dada se inyecte si es posible instantáneamente, ya que de esta manera se ayuda a minimizar la difusión de los compuestos. En la práctica esto es imposible y una meta más realista consiste en introducir la muestra como una banda estrecha de concentración, que tenga un intervalo mínimo entre el "frente" y "cola" de la banda. Para obtener la mejor forma del pico y una resolución máxima deberá usarse la mínima cantidad posible de muestra y mientras más componentes contenga la muestra más grande deberá ser su tamaño, hasta cierto límite. Al ser la muestra un gas, se usan dos métodos generales para muestrearla: empleo de jeringa de cierre hermético para gases y válvulas muestreadoras.

Jeringas:

Las partes de que consta una jeringa son: émbolo de acero inoxidable bien ajustado en el interior de un cilindro de precisión de vidrio borosilicato. La aguja es también de acero inoxidable y está pegada con epóxido al cilindro; la punta de la misma es biselada para facilitar la penetración al diafragma.

El otro método para introducir las muestras al cromatógra fo son las válvulas para muestreo de gases. Con este método se logra una mejor reproducibilidad.

En el muestreo de líquidos, debido a su alto grado de expansión cuando se vaporizan, se trabaja con tamaños de muestra mucho más pequeños y las jeringas son empleadas en todo el mundo para la inyección de éstos, usándose con más frecuencia las de 5, 10 y 25 microlitros (μ l).

En el muestreo de sólidos, éstos se manejan mejor solubilizándolos en un disolvente apropiado y utilizando una jeringa para inyectar la disolución.

Cámara de inyección:

Sirve para precalentar el gas portador, garantizar una rápida vaporización y alcanzar el proceso isotérmico.

Temperatura de la columna:

La columna lleva un termostato para que la separación pueda efectuarse a una temperatura reproducible.

La temperatura de la columna deberá ser suficientemente alta para que el análisis se efectúe en un plazo razonable y suficientemente baja para lograr la separación deseada. En la mayoría de las muestras, a menor temperatura se obtiene mejor separación. A medida que la temperatura aumenta disminuyen los tiempos de retención.

2.1.4 Columnas.

En las columnas se efectúa la separación, siendo ésta el objetivo primario de la cromatografía de gases. La columna cromatográfica está constituida por un cilindro que puede ser de vidrio, cobre, aluminio o acero inoxidable, siendo estas últimas las más utilizadas, ya que las de vidrio resultan demasiado frágiles, las de cobre presentan reacciones químicas con algu-

nos compuestos o absorben determinados componentes de la muestra y las de aluminio son relativamente costosas.

Pueden ser de forma recta, dobladas en U o helicoidales. Su longitud puede variar desde unos 20 cm o menos hasta más de 15 metros, aunque las columnas analíticas comunes suelen ser de 1 a 5 metros, una columna más larga presenta un número mayor de platos teóricos pero resulta mucho más difícil operarla a la velocidad de flujo óptima, debido a que hay que proporcionar una presión mucho mayor porque habrá una caída de presión muy grande, además de que aumenta la posibilidad de fugas del gas acarreador. Entre las ventajas de una columna larga esta el mayor número de platos teóricos y mayor cantidad de muestra por analizar, lo cual sirve para fines preparativos.

Diámetro:

El diámetro de la columna varía de 0.025 a 1.25 cm de diámetro interno (DI) como máximo. Mientras menor sea el diámetro de la columna mayor es la eficiencia de ésta. El diámetro externo (DE) de las columnas analíticas estándar es de 0.3 a 0.6 cm.

En las columnas capilares el DE es de 0.15 cm, el DI de 0.025 ó 0.05 cm. Desgraciadamente la eficiencia de la columna disminuye al aumentar la capacidad de la misma, ya que para ello hay que aumentar su diámetro.

Fase líquida:

Es la fase estacionaria que debe exhibir la capacidad, como disolvente diferencial, necesaria para lograr la separación de los componentes de una mezcla. Esta selectividad es una propiedad termodinámica y puede calcularse a base del coeficiente de reparto pero se tienen pocos datos y se determina experimental-

mente en base a la solubilidad de la fase líquida en relación a la muestra y fase móvil.

Supina y Rose (25) informan de la metodología para seleccionar una fase líquida.

La eficiencia del disolvente no es el único criterio para seleccionar una fase líquida. También son importantes las limitaciones de: la temperatura (tanto máxima como mínima), la solubilidad absoluta, el costo y disponibilidad de la misma.

Para la separación o análisis de mezclas gaseosas, generalmente se utiliza el método de adsorción también conocido como cromatografía gas-sólido, en tanto que para mezclas líquidas y de sólidos volátiles se emplea el método de reparto o cromatografía gas-líquido, sin que esto quiera decir que en un caso específico dado no se pueda hacer un análisis de un compuesto en un estado físico, por el otro método.

Soporte sólido:

En las columnas de reparto, el propósito del sólido es el de proporcionar un soporte o apoyo inerte que tenga una superficie grande sobre la cual se pueda depositar la fase estacionaria líquida (23). Se emplean gran variedad de materiales como soporte inerte, que van desde celita, arcillas o simplemente polvo de ladrillo, hasta materiales comercialmente preparados para este fin, entre los más populares se encuentran los llamados "Chromosorb".

Las características que debe presentar un soporte óptimo son:

- a) Una superficie específica extensa de 20 m²/g o más.
- b) Un diámetro de poros uniforme del orden de 10μ o menos.

- c) Inactividad, un mínimo de interacción química y adsorptiva con la muestra.
- d) Partículas de forma regular, de tamaño uniforme para un relleno eficiente.
- e) Resistencia mecánica (no debe romperse bajo presión).

La materia prima que se usa generalmente en cromatografía de gases es la diatomita, también denominada tierra de diatomáceas o kieselguhr. Está formada por los exoesqueletos de diatomeas que son algas unicelulares microscópicas cuya constitución fundamental es sílice microamorfa hidratada.

Hay varias formas o tipos de Chromosorb.

Chromosorb es la marca comercial registrada de la Johns Manville Corp. para este tipo de soportes.

Chromosorb A: para cromatografía de gases en escala preparativa.

Chromosorb G: para separar compuestos polares.

Chromosorb F: preparado a partir de ladrillos refractarios.

Chromosorb T: se ha utilizado para separar compuestos altamente polares o reactivos, tales como agua, hidrazina, dióxido de azufre y halógenos.

Chromosorb W: soporte de diatomita calcinada con fundente, obtenido durante la fabricación de la Celita.

El Chromosorb * es el mejor soporte sólido inerte disponible por haber sido calcinado en su procesamiento.

2.1.5 Detectores.

El detector cromatográfico es un dispositivo que mide la concentración de cada uno de los componentes de la muestra y ge-

nera una señal eléctrica proporcional a dicha concentración.

Las características primarias importantes de un detector son: 1) sensibilidad, 2) ruido, 3) respuesta y 4) recorrido lineal. Las características secundarias son: simplicidad, costo, disponibilidad y durabilidad.

1) Sensibilidad: denota la cantidad de señal generada para determinada concentración de una muestra.

También puede medirse como la pendiente en la gráfica de la respuesta del detector en función de la concentración de la muestra.

2) Ruido: se refiere a la respuesta de corta duración y al azar del detector determinado por: las propiedades eléctricas, la temperatura o la sensibilidad al caudal. El ruido limita la detección de una muestra pequeña. Se define como cantidad mínima detectable (c.m.d.) aquella muestra lo suficientemente grande para generar una señal 2 veces mayor que su nivel de ruido. Tanto la sensibilidad como el ruido determinan la c.m.d.

3) Respuesta: respuesta universal significa que el detector genera una respuesta para todos los componentes, exceptuando el gas portador.

Respuesta selectiva: significa que el detector sólo responde a determinados tipos de compuesto, por ejemplo, el detector fotométrico de flama sólo responde a compuestos que contienen átomos de S ó P.

4) Recorrido lineal: es la región sobre la cual la señal del detector es directamente proporcional a la concentración de la muestra. Es decir es una gráfica logarítmica de la respuesta del detector en función de la concentración, significa el

recorrido en el cual la curva es lineal y tiene una pendiente de $1.0 \pm 5\%$.

Los dos detectores más importantes son: el de conductividad térmica (CT) y el de ionización de llama (DIL), representan en total el 90% de todos los detectores actualmente en uso (24).

CONDUCTIVIDAD TÉRMICA (CT).

El funcionamiento del detector de conductividad térmica se basa en el principio de que un cuerpo caliente perderá calor a una velocidad que depende de la composición del gas que lo rodea.

La celda está constituida por un filamento metálico en espiral, sostenido en el interior de una cavidad que está dentro de un bloque metálico grande de acero inoxidable, para obtener una temperatura de referencia constante.

El filamento calentado transfiere calor al bloque más frío por medio de 2 procesos de pérdida de calor que son la conducción térmica gaseosa y la convección forzada. Si se usa un gas portador ligero como el helio o el hidrógeno, predominará la pérdida de calor por conductividad térmica.

La conducción térmica puede explicar que el calor se transfiera instantáneamente por conducción al chocar las moléculas gaseosas con el filamento caliente. El detector CT es sensible al caudal del gas portador, porque cuanto mayor es el número de colisiones moleculares por unidad de tiempo con el filamento, mayor será la velocidad de pérdida de calor. Además de que cuanto menor es la molécula, mayor es su movilidad y mayor su conductividad térmica. La variación de la resistencia del filamento se mide y convierte a señal eléctrica por medio de un puente de Wheatstone.

DETECTOR DE IONIZACION DE LLAMA (DIL).

Se basa en el principio de que la conductividad eléctrica de un gas es directamente proporcional a la concentración de las partículas cargadas dentro del mismo.

El gas portador fluye desde la columna hasta la flama, la cual ioniza algunas de las moléculas orgánicas presentes en la corriente gaseosa. La presencia de partículas cargadas (iones positivos, negativos y electrones) en el espacio entre los electrodos origina una corriente que fluye en éstos y a través de una resistencia que los mide. La disminución de potencial resultante se amplifica por un electrómetro y se alimenta a un registrador.

El DIL responde a los compuestos orgánicos, entre las sustancias que dan respuesta figuran: el aire, el agua, los gases inertes, CO, CO₂, CS₂, NO, SO₂ y H₂S. Por esto mismo el DIL es apropiado para el análisis de trazas de materia orgánica en el aire, agua o de muestras acuosas tales como bebidas alcohólicas y materiales biológicos.

El DIL es un detector muy sensible y su recorrido lineal es más amplio que el de cualquier detector de uso corriente.

DETECTOR DE CAPTURA DE ELECTRONES (DCE).

Su funcionamiento consiste en medir las disminuciones de una señal en vez del aumento de la corriente eléctrica. A medida que el gas portador nitrógeno fluye a través del detector, una lámina de tritio (³H) o de níquel radiactivo (⁶³Ni) ioniza moléculas de nitrógeno y forma electrones lentos. Estos electrones se desplazan hacia el ánodo cuyo potencial es de 90 voltios positivos. Al colectarse estos electrones, se produce una co-

corriente constante que se amplifica por un electrómetro. Esta corriente de fondo es de unos 10^{-8} amperios. Si en ese momento se introduce en el detector una muestra que contenga moléculas que capturen electrones, se reducirá esa corriente. La disminución de corriente es una medida de la cantidad y afinidad electrónica de los compuestos de la muestra.

El DCE es muy sensible a moléculas como haluros de alquilo, carbonilos conjugados, nitrilos, nitratos y compuestos organometálicos, no es sensible a hidrocarburos, alcoholes y cetonas. Es decir sólo responde selectivamente a las moléculas con átomos electronegativos. Su recorrido lineal es limitado. Sólo para muestras pequeñas. Las muestras deben estar secas, vestigios de agua destruyen la respuesta normal del detector.

Además requiere licencia de las comisiones o juntas nacionales de energía atómica respectivas para la fuente radiactiva. La de tritio sólo se utiliza hasta 220°C . La de ^{63}Ni es más costosa y se puede calentar hasta 350°C , una desventaja es que este detector se contamina fácilmente. Es especialmente valioso para plaguicidas ya que mide cuantitativamente nano y picogramos.

DETECTOR DE NITROGENIO, FOSFORO (DNF).

Page y Wooley proponen un mecanismo para la respuesta del detector conocido por muy diversos nombres ("termiónico", "termiónico de sodio", "fósforo" y "detector de electrón de llama (DEL) sensibilizado al fósforo").(26).

El DNF es básicamente un detector DIL pero modificado por adición de CsEr.

Su selectividad es excelente para compuestos fosforados y

regular para los halógenos. También se dispone de un detector selectivo para nitrógeno basado en el mismo principio. Estos se usan ampliamente en el análisis de aditivos para gasolina. Se indica que esta técnica permite detectar cantidades de 10^{-10} gramos de fósforo.

DETECTOR DE CONDUCTIVIDAD ELECTROLITICA (DCE).

Es un detector costoso, su sistema consiste de un pirclizador, un mezclador de gas-líquido, un separador de gas-líquido y un par de electrodos de platino en circuito con un puente que funciona con corriente continua. El pirolizador convierte a los halógenos, el azufre o el nitrógeno unidos a compuestos orgánicos en sustancias oxidadas o reducidas que conducen la electricidad cuando se disuelven en agua. La conductividad se mide entre dos electrodos de platino mediante un puente de Kohlrausch y se registra continuamente sobre un registrador de 1 mV. Los aumentos de conductividad se pueden relacionar con la concentración de los componentes presentes. El DCE es un detector selectivo moderadamente sensible para compuestos de halógeno y nitrógeno. Requiere la obtención de electrolitos.

2.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

2.2.1 Sistema cromatográfico:

En cromatografía de gases es necesario que la muestra se volatilice sin descomposición para que sea arrastrada por el gas portador. Se puede aumentar la volatilidad de la muestra incrementando la temperatura, sin embargo el máximo posible de temperatura es aproximadamente 400°C . Por este hecho, sólo ga-

ses y cerca de un 15% de los compuestos orgánicos conocidos se analizan por cromatografía de gases.

La cromatografía líquida requiere que la muestra sea soluble en la fase móvil y esto da facilidades a analizar compuestos de muy alto peso molecular: orgánicos e inorgánicos, iónicos o covalentes. Es necesario encontrar la fase estacionaria adecuada que separe selectivamente los componentes de la muestra, a veces en la práctica esto es difícil de lograr.

La cromatografía líquida de alta resolución se llama así porque ocupa columnas de diámetro muy reducido rellenas de materiales especiales, cuyas partículas tienen un tamaño no mayor de 30-40 μm y con frecuencia hasta de 3.5 ó 10 μm , generalmente con una distribución de tamaño no mayor de 2 μm . Este tipo de columnas es muy eficaz, pero ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil. Por esta razón es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión (hasta 1000 atm) que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna. El flujo es muy pequeño por lo que se requiere que la muestra también lo sea (entre 1 y 10 μl). Si la presión de entrada a la columna no es muy elevada (400 atm o menos) la muestra se introduce en la cámara de inyección mediante una jeringa de alta presión, a presiones más elevadas, se utilizan las válvulas de inyección.

Un detector colocado a la salida de la columna, proporciona un registro continuo de la composición del líquido que sale, lo que permite obtener un cromatograma similar a los obtenidos en cromatografía de gases y que se utiliza para identificar los componentes de la mezcla.

Analizando la literatura sobre CLAR se observan numerosas clasificaciones en base a los elementos, características y variantes de la misma. Un esquema en base a la fase estacionaria, su naturaleza y el mecanismo de separación es:

| TECNICA | FASE ESTACIONARIA | MECANISMO DE SEPARACION | TIPO |
|---------|-------------------|--------------------------|----------------------------------|
| CLAR | SOLIDA | ADSORCION | CLS |
| | | INTERCAMBIO IONICO | CII { catión anión |
| | | EXCLUSION | { CFG P. ALTA CFG P. BAJA |
| | LIQUIDA | PARTICION | { CLL |
| | | | { CPQU { F. NORMAL F. INVERSA |

Donde:

CLAR : Cromatografía líquida de alta resolución
 CLS : Cromatografía líquido sólido
 CII : Cromatografía de intercambio iónico
 CFG : Cromatografía de permeación en gel
 CFG : Cromatografía de filtración en gel
 P : Presión
 CLL : Cromatografía líquido líquido
 CPQU : Cromatografía en fase químicamente unida
 F : Fase.

Los elementos básicos comunes en todos los tipos de cromatografía y la instrumentación típica de este sistema cromatográ

fico se indican en el diagrama de la figura 2.3 a manera de propuesta simplificada y sujeta a revisiones.

2.2.2 Clasificación.

Los distintos principios fisico-químicos involucrados en las técnicas de separación han dado lugar a la siguiente clasificación de la cromatografía líquida.

Cromatografía de adsorción: se basa en la adsorción y desorción continua sobre un soporte estacionario. De esta manera los compuestos que se adsorben con mayor debilidad serán desplazados de la columna por los compuestos unidos más fuertemente, como quiera que la adsorción es un proceso reversible, la percolación descendente y/o continua del disolvente a través de la columna desplazará gradualmente hacia la salida cada banda. El empleo de una propiedad física en un proceso continuo es análogo a la destilación fraccionada, en la que un buen equilibrio entre el líquido y el vapor es un criterio importante para el rendimiento de la separación.

Cromatografía de partición: se basa en el reparto de los componentes de la mezcla entre la fase estacionaria retenida en la columna y la fase móvil que fluye por la misma. En una fase estacionaria polar los componentes más polares tienen una marcada afinidad para la fase estacionaria (o la solubilidad en ella) y quedarán retenidos corriente arriba de la columna, mientras que los materiales menos polares más hidrófobos (o lipófilos), solubles en el medio no polar se moverán corriente abajo de la columna y por lo tanto se eluirán primero. Cuando los compuestos a separar tienen un carácter no polar se recomienda traba-

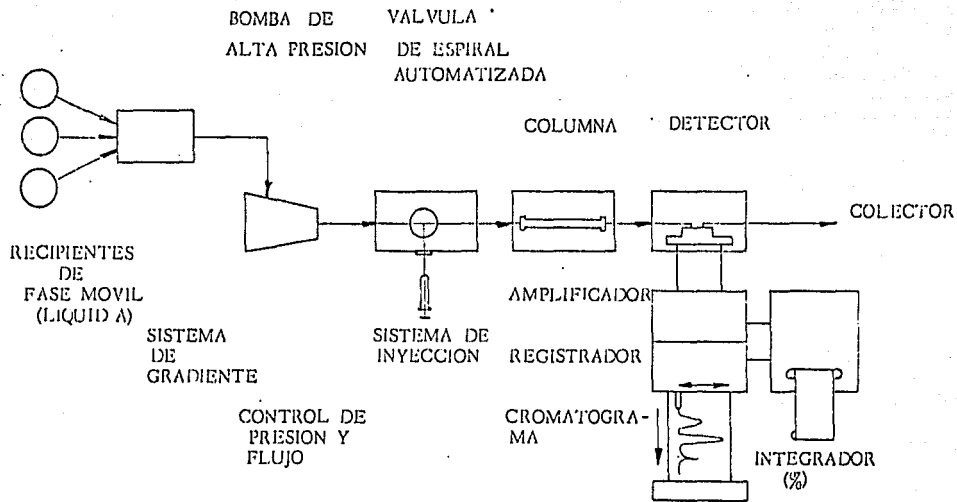


Fig. 2.3 SISTEMA CROMATOGRAFICO DE CLAR.

jar con la cromatografía de partición fase normal para proporcionar una buena separación en la fase estacionaria hidrofílica o polar, los solutos polares se trabajan por fase inversa no polar (22).

Cromatografía de permeación: se usa para la separación de macromoléculas y determinaciones de peso molecular, su principio fisicoquímico aún no está bien estudiado debido a que la distribución de cada muestra problema no se ha determinado teóricamente para cada uno de los disolventes.

El soporte esférico poroso debe ser de un tamaño conocido, en una mezcla de macromoléculas de diferente tamaño provoca que las más pequeñas sufran una retención en los poros y las moléculas grandes se difundan a través de la fase estacionaria porosa con ayuda de un eluyente adecuado. Al final las moléculas pequeñas retenidas se pueden eliminar con un eluyente apropiado. En este tipo de cromatografía de adsorción las moléculas pueden fluir dentro de los poros o canalículos internos del soporte, (microesponja porosa) retardando su elución; mientras que los solutos de mayor tamaño son arrastrados por la fase móvil.(27).

Cromatografía de intercambio iónico: básicamente esta técnica es la separación de compuestos con carga que son capaces de intercambiar su catión o anión según se trate.

Su principio es la competencia entre la fase móvil y el soporte por los sitios con carga opuesta en el mismo para un ión particular. En cromatografía de fase químicamente unida, la fase estacionaria está químicamente unida a la superficie de un soporte. El mecanismo de separación de esta técnica es comple-

jo, sus características son similares a las de cromatografía de adsorción o reparto según el estado físico de la fase estacionaria, es la técnica más útil en cromatografía líquida de alta resolución.

2.2.3 Notación y terminología.

Los términos y su representación que se usan en CLAR son los mismos que los de cualquier técnica instrumental y se basan en la interpretación del cromatograma (fig. 2:4)

Esta información proporcionada directamente por el cromatograma es útil para calcular la eficiencia de la operación en términos de la columna, del disolvente, la resolución lograda y el número de platos requeridos para la separación, como parámetros básicos en su optimización.

Estos son:

N= número de platos teóricos de la columna (cuyo largo es L)

$$N = 16 (X/Y)^2$$

H = HEPT = AEPT = altura equivalente a un plato teórico, a menor HETP, mayor eficiencia de la columna.

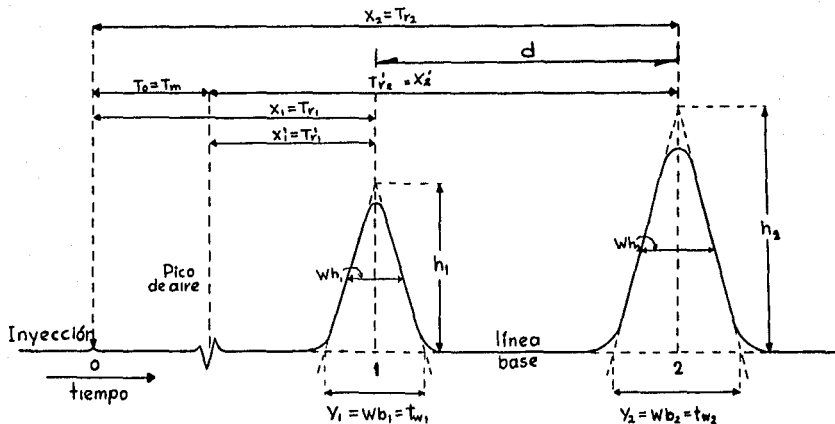
$$HETP = L/N$$

α = retención relativa, mide la eficiencia del disolvente y correlaciona a coeficientes de reparto (K):

$$\alpha = \frac{X_2}{X_1} = \frac{Tr_2}{Tr_1} = \frac{Tr_2 - Tr_0}{Tr_1 - Tr_0} = \frac{K_2}{K_1}$$

R = resolución, se correlaciona a la separación lograda entre dos picos sucesivos de un cromatograma. Una R = 1.5 indica una separación de 100%.

Fig. 2.4 Cromatograma típico.



Donde:

- $T_0 = T_m$ Tiempo muerto (aire o disolvente)
- $x = T_r$ Tiempo de retención
- $x' = T_r'$ Tiempo de retención corregido = $T_r - T_0$
- $Y =$ ancho de la base = $t_w = W_b$
- $h =$ altura del pico
- $Wh =$ ancho medio (W medio a la mitad de h)
- 1 y 2 picos de los compuestos separados.

$$R = \frac{2d}{wb_1 + wb_2} = \frac{2 (Tr_1 - Tr_2)}{tw_1 + tw_2} = \frac{2 (X'_2 - X'_1)}{y_1 + y_2}$$

N req. = número de platos teóricos requeridos para la separación óptima.

$$N \text{ req.} = 16R^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left[\frac{(X'_2/T_0) + 1}{X'_2/T_0} \right]$$

$X'/T_0 = K'$ = factor de capacidad.

Existen cinco formas de realizar la CLAR:

- Cromatografía líquido-líquido (CLL)
- Cromatografía líquido-sólido (CLS)
- Cromatografía líquida por exclusión (CPG,CFG)
- Cromatografía por intercambio iónico (CII)
- Cromatografía de fase químicamente unida (CFQU)

Las características de la cromatografía de gases y de CLAR se mencionan en la siguiente tabla:

| | Cromatografía de gases | Cromatografía líquida de alta resolución |
|------------------------------|---|---|
| Requerimientos de la muestra | Volátil | Soluble |
| Tipos de muestra | Gases y 15% de los compuestos orgánicos; hasta un peso molecular de 500 | Moléculas orgánicas e inorgánicas de peso molecular intermedio y alto |
| Cantidad mínima | 10^{-9} - 10^{-12} g | 10^{-6} - 10^{-12} g |
| Tiempo de análisis | Minutos | Minutos-horas |
| Resolución | 2000 platos teóricos por metro de columna | 50 000 platos teóricos por metro de columna |
| Costo | Menor costo | Mayor costo |

Ventajas y limitaciones de la cromatografía líquida de alta resolución:

| Ventajas | Limitaciones |
|---------------------------------|---|
| - Velocidad de análisis | - Instrumentación costosa |
| - Alta resolución | - No existe detector universal y sensible |
| - Buena sensibilidad | - Elevado costo de operación |
| - Automatización | - Experiencia indispensable |
| - Amplio espectro de aplicación | |

2.2.4 Equipo instrumental (27).

El instrumental de la cromatografía de líquidos debe reunir ciertas características como son:

a) Versatilidad: debe ser útil para una gran variedad de muestras. Por ello esta formado de los siguientes aditamentos:

- Sistemas de bombeo
- Programadores de la fase móvil
- Controles de temperatura para columna y detector
- Controles de flujo
- Columnas
- Diversos detectores
- Sistema para recolección de fracciones

b) Rapidez: los análisis deben efectuarse en el menor tiempo posible, por lo que la columna debe poseer materiales de relleno de alta eficiencia y sistemas de bombeo de alta presión para la fase móvil.

c) Reproducibilidad y estabilidad: el instrumento debe proveer un control adecuado sobre los parámetros de operación tales como: el flujo de la fase móvil, la temperatura, presión y composición de la fase móvil, para ello debe estar provisto de controles de temperatura y flujo, sistema de bombeo de alta presión programadores de fase móvil, detectores, etc.

d) Sensibilidad: un buen instrumento cuando trabaja con pequeñas cantidades de muestra, debe generar señales de intensidad apreciables. La sensibilidad depende del sistema de detección que se emplea.

Sistema de bombeo (Bombas).

Los sistemas de bombeo tienen como características más importantes las siguientes:

Presión máxima de operación (usualmente hasta 400 atm)

Intervalo de volúmenes obtenibles (entre 0.5 y 10 ml por minuto).

Reproducibilidad y constancia del flujo (aproximadamente 1% de error).

Características del flujo (continuo o pulsado).

También son importantes la resistencia a líquidos corrosivos, la facilidad para efectuar el cambio de fases móviles y la limpieza del sistema.

De acuerdo con las características de funcionamiento y de diseño se consideran dos tipos de bombas:

- 1) Bombas mecánicas
- 2) Bombas neumáticas

Dentro de las primeras existen dos tipos:

- a) Bombas reciprocantes (pistón o diafragma)
- b) Bombas de desplazamiento continuo

Válvulas inyectoras:

Requieren de un diseño cuidadoso puesto que deben resistir altas presiones, tener un volumen pequeño y sus cavidades deben ser bien barridas por la fase móvil.

Programadores de fase móvil:

Equivalen a la programación de temperatura de cromatografía

de gases y consiste en cambiar la composición de la fase móvil conforme el análisis transcurre. En general, se emplean dos disolventes de diferente polaridad y se varía el porcentaje del disolvente más polar en la mezcla binaria.

Las ventajas que ofrece son:

Análisis más rápidos, mejores separaciones, mayor simetría en los picos y mejor detectabilidad.

Entre sus desventajas están:

Necesidad de regenerar la columna e incompatibilidad con el detector en ciertos casos.

Básicamente existen programadores de dos clases:

1) Programadores que efectúan el mezclado en una cámara, después el líquido pasa a la bomba, la que envía la mezcla a la columna.

2) Programadores de mezclado en corriente. Requieren de dos bombas que desplazan cantidades determinadas de cada líquido.

Registadores:

Su función es representar en un registro gráfico la señal dada por el detector. Generalmente se utilizan registradores potenciométricos de 1 a 10 mV. Entre sus características deseables de éstos están: respuesta rápida de la pluma y velocidad variable del papel.

Controles de temperatura:

Muchas veces el control de temperatura que requieren las columnas no necesita ser superior a $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Muchos análisis se efectúan a temperatura ambiente, así que muchos instrumentos carecen de controles de temperatura.

Recolectores de fracciones:

Los recolectores disponibles son automáticos y/o manuales bien como accesorios o como componentes del instrumento.

Detectores:

Los detectores deben tener propiedades generales como son:

Respuesta universal o selectiva

Sensibilidad

Ruido

Linealidad

Estabilidad

El ruido es una variación en la señal del instrumento que no se debe a la muestra.

La linealidad se utiliza como una señal generada por el detector como medida cuantitativa, dicha señal guarda una relación lineal con la concentración de la muestra.

Los detectores más usados en cromatografía de líquidos de alta resolución se resumen a continuación:

Detector de índice de refracción:

Mide la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y de la solución de la muestra que sale de la columna de esta manera se detecta cualquier cambio en la composición de la fase móvil. La respuesta de éste es universal y su sensibilidad es moderada, por lo general del orden de picogramos o partes por millón.

Con este detector, debido a su respuesta universal, es muy difícil programar la fase móvil, siendo además sensible a las variaciones de flujo y temperatura.

Existen dos modelos de este tipo de detector; el llamado refractómetro de desviación y el tipo "Fresnel". Ambos miden

cambios en el índice de refracción hasta de 10^{-7} unidades. El refractómetro de desviación es menos sensible a los cambios de temperatura y es compatible con la programación de fase móvil tiene un intervalo lineal menor, es muy sensible a las vibraciones o movimientos del instrumento y sus cavidades o celdas no son tan pequeñas como las del refractómetro Fresnel. Este último, se considera más sensible y menos adecuado para programaciones de fase móvil, sus celdas son de volumen más pequeño, es más sensible a los cambios de temperatura y además es necesario intercambiar prismas para abarcar por completo el intervalo de índices de refracción.

Detector de luz ultravioleta (UV).

Su funcionamiento se basa en la absorción de luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta. La respuesta de éste es selectiva, ya que sólo se detectan los compuestos que absorben luz de la longitud de onda a la que opera el detector.

Existen dos tipos de detectores: el de longitud de onda variable y el llamado fotómetro de luz ultravioleta. El primero es de aplicación más variada y sensible pero es muy costoso; el segundo es sencillo, económico y con él se obtienen buenos resultados. Este fotómetro de luz ultravioleta es relativamente insensible a los cambios de flujo y temperatura, siempre y cuando el disolvente no absorba en grado apreciable en la longitud de onda que opera el fotómetro y es fácil efectuar programaciones de fase móvil. En condiciones óptimas se pueden obtener sensibilidades de hasta 0.005 unidades de absorción y si el compuesto absorbe intensamente en el ultravioleta, es posible

detectar cantidades de muestra del orden de 2 nanogramos.

La mayor parte de los diseños comerciales operan a longitud de onda tan corta como por ejemplo de 254 a 280 nm, utilizando como fuente de luz ultravioleta una lámpara de mercurio de baja presión.

Los detectores de longitud de onda variable presentan algunas ventajas sobre los fotómetros y entre las más sobresalientes se mencionan las siguientes:

Es posible seleccionar la longitud de onda óptima para la muestra.

Pueden evitarse algunos problemas de la fase móvil (absorción excesiva).

Algunos diseños permiten obtener el espectro de absorción de cada compuesto por separado.

Este tipo de detectores son considerados como los más sensibles y de uso más generalizado en cromatografía líquida, en especial en el campo de las investigaciones bioquímicas, porque muchos compuestos de interés biológico absorben intensamente en la región ultravioleta.

La muestra no resulta alterada por el proceso de detección y el intervalo lineal es aproximadamente de 3000; este detector no es sensible a los cambios de flujo o de temperatura y es apto para programaciones de fase móvil.

Detector de fluorescencia.

En la actualidad es el detector más sensible de que se dispone, se pueden detectar cantidades del orden de picogramos (10^{-12} g).

Hay dos diseños básicos de estos detectores de fluorescencia-

cia, los llamados fluorómetros de filtros que emplean filtros para seleccionar la radiación de excitación y la de emisión y los espectrofluórometros que emplean monocromadores, ambos diseños dan muy buenos resultados, presentan una alta selectividad de respuesta y sensibilidad. En algunos casos, cuando la muestra no tiene propiedades fluorescentes es posible formar compuestos derivados de la muestra original que si poseen dichas propiedades.

2.2.5 Columnas.

Básicamente las columnas consisten en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones. De entre todos los materiales el acero inoxidable es el más usado. En algunos casos también se ha empleado vidrio de paredes gruesas, pero éste no permite conexiones metal-vidrio, herméticas a altas presiones.

La longitud de la columna es por lo general, entre 10 y 50 cm, aunque en ocasiones puede ser mayor. El diámetro en la mayoría de los casos es de alrededor de 3 a 4 mm, pero en las columnas de tipo preparativo puede ser hasta de más de 1 cm.

La capacidad de la columna depende de su longitud, diámetro y material de relleno. Las conexiones deben ser herméticas.

En la actualidad las columnas para cromatografía de líquidos de alta presión, llegan a tener una eficiencia de 10,000 platos teóricos por metro de columna o mayores.

Los avances de la tecnología en columnas se resumen como sigue:

Elaboración de partículas de tamaño muy reducido ($5\mu\text{m}$).
Uniformidad de tamaños de partículas.
Refinamiento en los procesos de relleno de las columnas.
Procesos químicos muy eficientes en la preparación de materiales de fase estacionaria químicamente unida (Bonded-phase).

En cromatografía líquida de alta presión, las dimensiones de las partículas de los materiales usados, son muy pequeñas y muchas veces se les llama "películas", otros contienen fases líquidas químicamente unidas a la superficie del material. Las partículas de los materiales de relleno porosos (gel de sílice y alúmina) serán más o menos grandes, similares a las de los utilizados en cromatografía líquida clásica. El tamaño de partícula es importante porque controla el proceso de difusión de las moléculas de la muestra hacia dentro y hacia afuera de los poros de la misma. A medida que el tamaño de la partícula aumenta, el proceso de difusión se hace más lento, es decir, la transferencia de masas entre la fase móvil y la fase estacionaria es lenta. Al mismo tiempo hay que considerar que si se aumenta el flujo de la fase móvil para obtener análisis rápidos, el proceso de difusión, que es lento, hace que la columna pierda eficacia y por lo tanto, resolución. Conforme disminuye el tamaño de las partículas, la profundidad de los poros también disminuye y el proceso de transferencia de masa se hace más rápido, permitiendo obtener análisis rápidos sin pérdidas en la resolución. Por esta razón sólo se utilizan materiales porosos cuyas partículas sean de tamaño menor de $50\mu\text{m}$.

Otros tipos de materiales utilizados son los llamados adsorbentes películares, consisten en partículas esféricas, generalmente vítreas, no porosas, recubiertas de una capa muy fina

de un adsorbente poroso, como gel de sílice o alúmina. El espesor de esta capa es $1/40$ del diámetro total de la partícula (alrededor de $1\mu\text{m}$).

Los materiales porosos, cuyas partículas pueden ser de forma regular o irregular, tienen una gran superficie específica, entre 50 y $500\text{ m}^2/\text{g}$ y por tanto pueden aceptar muestras de tamaño considerable, del orden de miligramos por gramo de relleno, sin que la columna pierda mucha eficacia. En contraste, los materiales peliculares son de superficies específicas menores, entre 1 y $12\text{ m}^2/\text{g}$; aceptan menor tamaño de muestra, de 10 a 20 veces menos que los materiales porosos y su costo es mucho más elevado. Algunos de los materiales que se emplean en cromatografía de líquidos de alta presión son: Porasil, Silica A, Lichrosorb Si-60, Lichrosper Si-100, Spherisorb SW, Corasil I y II, Zipax, Bondapak C-18.

2.2.6 Fase móvil.

El control del flujo y la composición de la misma son muy importantes, pues modifican los parámetros de selectividad y capacidad en la resolución.

Las características que debe presentar son:

Disolver la muestra.

No degradar o disolver la fase estacionaria.

Tener baja viscosidad.

Ser compatible con el tipo de detector utilizado.

Tener la polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna. Se desea un valor de K' entre 2 y 10 (K' = capacidad).

$$K' = \frac{t'r}{t_o} = \frac{\text{Tiempo en la fase estacionaria}}{\text{Tiempo en la fase móvil}}$$

Los disolventes que se emplean con mayor frecuencia son:

Hexano
 Cloruro de metileno
 Cloroformo
 Tetrahidrofurano
 Acetonitrilo
 Isopropanol
 Metanol
 Agua

Estos disolventes se mencionan en orden de polaridad creciente con respecto a la adsorción en gel de sílice (27).

2.3 Documentación bibliográfica.

La cromatografía instrumental es de reciente desarrollo y difusión: a mediados de los 50's para CG y principios de los 70's para CLAR. A pesar de ello su literatura y obras tanto de fundamentos como aplicativas son extremadamente numerosas, su perfil bibliográfico se haya en la etapa del máximo de información publicada y cada día aparecen nuevas aplicaciones en campos especializados tanto prácticos como teóricos.

En este último aspecto existen a la fecha innumerables obras de texto y la mayoría de ellas es bastante voluminosa, por lo que el material presentado en este capítulo no pretende ser exhaustivo sino introductorio, como apoyo en cuanto a conocimientos generales y de transición para los capítulos subsecuentes.

CAPITULO 3

CUANTIFICACION POR CROMATOGRAFIA DE GASES

Por el principio fisicoquímico de la cromatografía y el equipo instrumental usado, el método de análisis a partir de la inyección de la muestra al cromatógrafo queda definido por la columna y el detector empleados, pudiendo optimizarse en función de los parámetros que se fijen para su operación. En este aspecto prácticamente todos los procedimientos concuerdan y la única variación encontrada fue la operación a temperatura constante o el uso en algunos casos de temperaturas programadas.

La parte con más variaciones es la preparación de la muestra, mismas que se derivan del fluido biológico a analizar y reactivos involucrados. Por las operaciones iniciales los procedimientos revisados se pueden agrupar en dos tipos fundamentales:

A: adsorción-desorción previa con adición en este paso del estándar interno. (Usualmente sobre carbón activado y precipitación de proteínas por efecto salino. El uso de percolación en columna vía absorción y elución es menos común).

B: extracción líquido-líquido (pudiendo involucrarse un medio regulado y/o efecto salino, la variante principal es el disolvente; usualmente el estándar interno también se dosifica desde la etapa inicial).

Las operaciones intermedias son más coincidentes, las cuales salvo variaciones mínimas en la realización específica de cada operación, siguen el esquema general C:

C: mezcla de desorción, elución o extracción + centrifugación + decantación + evaporación + reconstitución + inyección al cromatógrafo.

La formación de derivados (D), se realiza usualmente durante las operaciones finales de evaporación del disolvente o en la reconstitución; por dosificación y reacción en las condiciones apropiadas del reactivo especificado.

Ciertos procedimientos hacen resaltar la simplificación de las operaciones preparativas y la precisión de los resultados obtenidos.

Las técnicas cromatográficas y sus aplicaciones propuestas por diversos autores así como los datos que se consideraron más importantes o distintivos, se resumen a manera de tablas clasificadas tentativamente en base a los diferentes fluidos biológicos y el detector utilizado; en ellas se usaron las siguientes abreviaciones:

E.I. = estándar interno; FIG. = figura; REF = referencia bibliográfica. GLC = cromatógrafo (o cromatografía) gas-líquido EM = espectrómetro (o espectrometría) de masas. D. I. = diámetro interno.

DIL = detector de ionización de llama. DTI = detector termiónico. DIQ = detector de ionización química. CE = detector de captura de electrones.

tr = tiempo de retención. CV = coeficiente de variación. r = coeficiente de correlación. n = número de determinaciones. \bar{v} = desviación estándar. Prep: = operaciones preparativas típicas.

3.1 Determinación en suero.

| GAS PORTADOR Y EQUIPO | INYECCION Y E.T. | COLUMNA | DETECTOR | RESULTADOS | OBSERVACIONES | FIG. | REF. |
|--|---|--|--|--|--|------------|------|
| — | t=150-295 ^o C. Elaborar bitarbitral sódico y cafeína. | OV-17(3%), t=100-295 ^o C. | DIL y selecti vo de nitróge no. | dete-cción simultá nea de 20 fármacos comunes, nivel -- ≥ 0.1 mg/dl. | Prep: A-C. Procedim. rápido de rutina para sobredosis. | - | 28 |
| He, 40ml/min. | 1μl. t=300 ^o C. | SE-30(3%)/ chromosorb AW- DMCS. t = 145 ^o C | DIL t=300 ^o C. | Separación de bar- bitúricas y salici- latos. Efic. extr= 91%. Linealidad 10- 50 mg/dl. | Prep: B-C-D(HO ⁻ C ₆ H ₃ N(CH ₃) ₃) Análisis de 40 fármacos pa- ra posibles interferencias. | - | 29 |
| PyeUnicam CCD H ₂ y N ₂ 140ml/ min. Aire: - 400ml/min. Ran- go=10 x 32 | 1μl. t=200 ^o C. EI=2-acetamid- nofenol (15 mg/l AcOEt). | Vidrio, 900 x 2 mm D.I. OV-210 (2.8%) y OV-1 (3.2%)/mosorb WHP (malla 80- 100). t = 120 ^o C | DIL t=250 ^o C. Pa- trón: 60mmol de paraceta- mol/1 EtOH. | Tr=1.9min. Estabi- lidad patrón = 1 año a 4 ^o C. Lineali- dad: 50-4000 μmol/l (y=0.00084 x - 0.0016), r=0.9987. CV=4.3-6%(n=8-14). 1 extracción. Cál- culo: altura de Pi- cos. | más específico que espectro- fotometría. Prep: B-C-D, du- plicado ([C ₃ CO] ₂ O/C ₆ H ₅ CH ₃) evap: 50 ^o C/N ₂ . V = 10 mm/min | 3.1 3.2 | 30 |
| Dendix 2600, Registador Speedomax x XL N ₂ , 50ml/min. Acondiciona- miento: 12 h, 200 ^o C. | 2μl. t=220 ^o C (vaporizador flash). EI= 2-acetamido- fenol, 50mg/ 1 agua desai- nizada | Vidrio, 910 x 2 mm D.I. (6 mm D.E). HiEff BBP (1%)/Gas Chrom Q (80-100). t=190 ^o C. | DIL. t=260 ^o C. es- tándares de 25 a 500 mg de acetamino- fén/1 de suero. | tr = 7.3 min. Lími- te de detección = 0.1 μg. Linealidad: 50 a 500mg/l. No - interferencia con varios fármacos y metabolitos comu- nes | método rápido de rutina. Prep: A-B-C. evap: 50 ^o C aire seco. Extr. iPrOH/AcOEt; 1/1. Reconstitución; EtOH anh. | 3.3 | 31 |
| N ₂ , 40 ml/min. | 5μl. EI = 2-acetam- idofenol | OV-17 (3%) t = 165 ^o C | DIL. | Identificación de- más de 40 fármacos tr=6.6min. Límite de detección 10mg/l ≥ 0.05 μg. | Suero y aspirado gástrico Prep: C.C./Kieselguhr. | - | 32 |

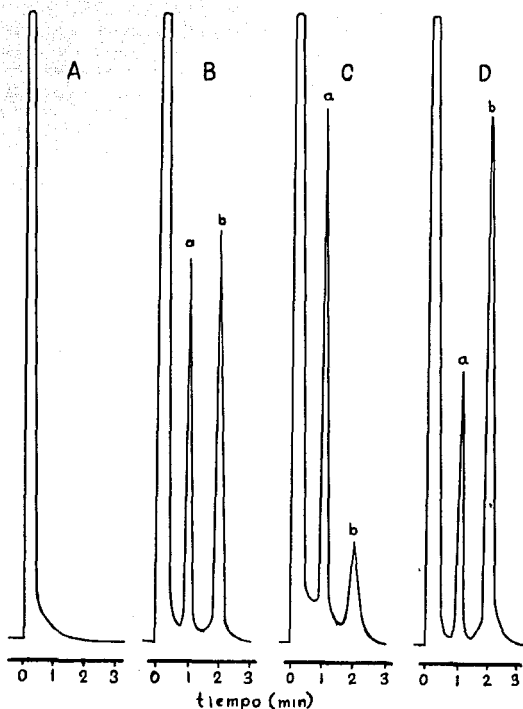


Fig. 3.1 Determinación de paracetamol en suero.
 Cromatogramas de: (A) extracto sérico blanco sin estándar interno;
 (B) extracto estándar con paracetamol a 1200 mol/l; (C) extracto
 sérico de un paciente que recibió dosis terapéuticas de 220 mol/l
 (D) extracto sérico de un paciente con sobredosis, con una concentra-
 ción de acetaminofén en suero de 2160 mol/l.
 Picos: (a) 2-acetaminofenol (estándar interno); (b) paracetamol.
 Kaa Ref. 30.

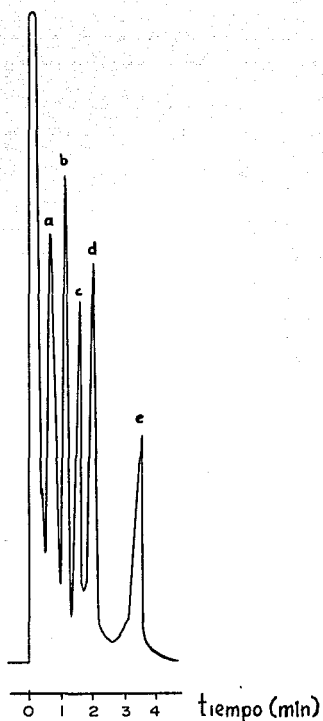


Fig. 3.2 Cromatograma de los derivados de anhídrido trifluoroacético: (a) ácido salicílico, (b) 2-acetaminofenol, (c) salicilamida, (d) paracetamol y (e) fenacetina. Kaa Ref. 30

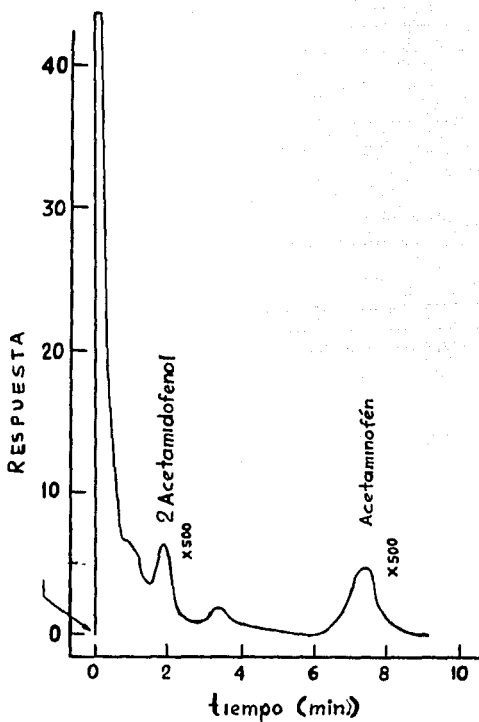


Fig. 3.3 Cromatograma de recuperación para una muestra de suero fijada a una concentración conocida (50 mg/l) según Jeevanandam, y col. Ref. 31

| REF. | FIG. | RESERVACIONES | RESULTADOS | DETECTOR | COLUMNA | INYECCION Y EQUIPO | CAS PORTADOR Y EQUIPO | |
|------|------|---|--|--|--|---|---|--|
| 33 | 3.4 | Prepi B-C-D-(Ac ₂ O pir ₂) dina), evap. 40-50°C/N ₂ . Reconstitución con CH ₂ Cl ₂ . No se observó interfe- rencia, tratamiento terapéu- tico sobredosado. Prep: A(CC/Boratocefilite/b- ter)-C-D-(Ac ₂ O - pir ₂) (n ₂) evap. 50°C/N ₂ . Uso en evaluaciones urgentes. | Tr: 3,0 min. Límite de detección = 5mg/l Línealidad: 50-500 mg/l. G = 4%. CV = 7.4%. | DIL. t = 275°C. patrones de paracetamol 50-500 mg/l suero | Vitrío 900 x 2 mm D.I., (6mm O.C.), SP2250 DA (5%) Supel- coport (100- 120). t = 180°C. relizada. | Vitrío 900 x 2 mm D.I., (6mm O.C.), SP2250 DA (5%) Supel- coport (100- 120). relizada. 12 h, 260°C. Fyeltom CCD N ₂ 30 ml/min. Et = difusio- pitólino | Vitrío 2100. Vaporizador N ₂ 40 ml/min Amplificador x 10 ₁₀ , atenu- ción x 8 - 32, Accondionm. H ₂ O destina- 100). t = 190°C. | Vitrío 2100. Y E.I. INYECCION Y EQUIPO |
| 34 | 3.6 | | de interfe- rencia. Picos libres columna. Picos libres curte absorción en la A niveles < 5mg/l paracetamol 90-100%. Recu- dad 5-500 mg/l. Recu- ter)-C-D-(Ac ₂ O - pir ₂) (n ₂) evap. 50°C/N ₂ . Uso en evaluaciones urgentes. | DIL. t = 280°C. Vitrío 1.83m x 4mm D.I., (eopl- ra), OV-17 (%) sobre Gas- Chrom Q(80- 100). t = 190°C. | 3.2. Determinación en plasma. Y E.I. INYECCION Y EQUIPO | 3.2. Determinación en plasma. Y E.I. INYECCION Y EQUIPO | | |
| 35 | - | Prepi B-C-D-C ₂ H ₅ (CH ₃) ₂ OH, 0.2 M. Extracción: Ac ₂ O. Método rápido para CLAR. Estudio clínico entres. | Línealidad: 0-100 µg/ml Límite de detección = 0.5 µg/ml. R = 81% (n = 7). Recuperación = 79.6%. | DIL. t = 275°C Vitrío, OV-17 Chrom Q, t = 190°C | t = 275°C Et = fenobarb ₂ rel. | N ₂ t = 275°C Et = fenobarb ₂ rel. | N ₂ t = 275°C Et = fenobarb ₂ rel. | |
| 36 | - | Prepi B(Ac ₂ O)-C-D ml. Ausencia de piasor. Ac ₂ O-pir ₂ (dina) evap. 42°C. Estudios de bio- disponibilidad. | Líne. detecc. = 0.5 µg/ ml. Ausencia de piasor. de elución lenta. Re- cuperac. = 54%. | DIL - | Et = N-butyl p-metilfenol. | Et = N-butyl p-metilfenol. | DLC - común Et = N-butyl p-metilfenol. | |

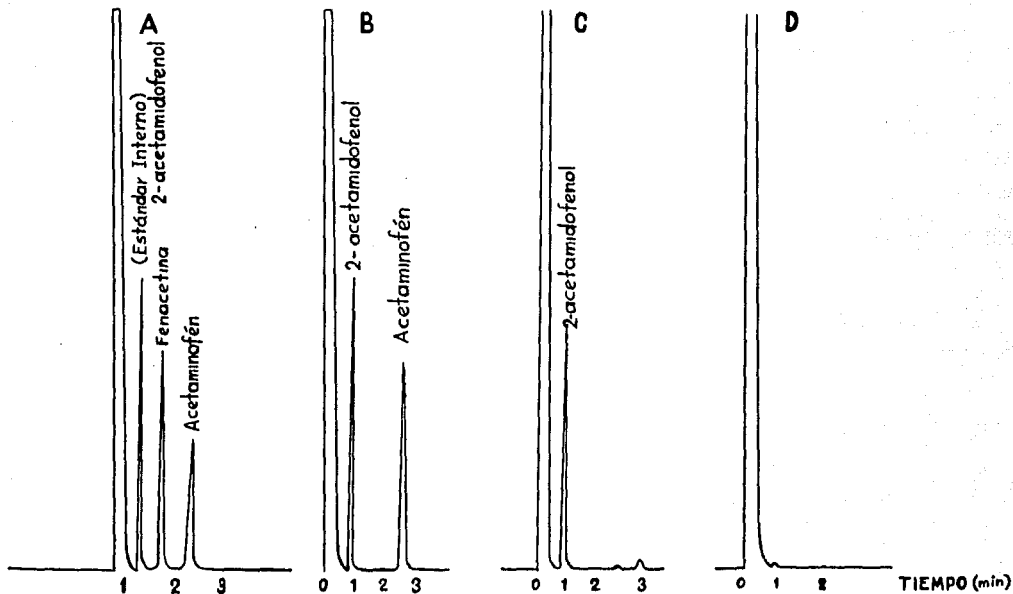


Figura 3.4. (A) Estándares sin extracción muestran separación de acetaminofén, fenacetina, y 2-acetamidofenol; (B) Muestra de suero con una concentración fijada de acetaminofén (100 mg/l); (C) Muestra de suero de un paciente conteniendo 450 mg/l de salicilato y 15 mg/l de cafeína; y (D) Muestra de suero como blanco.
Thoma y cols. Ref. 33

ACETAMINOFEN

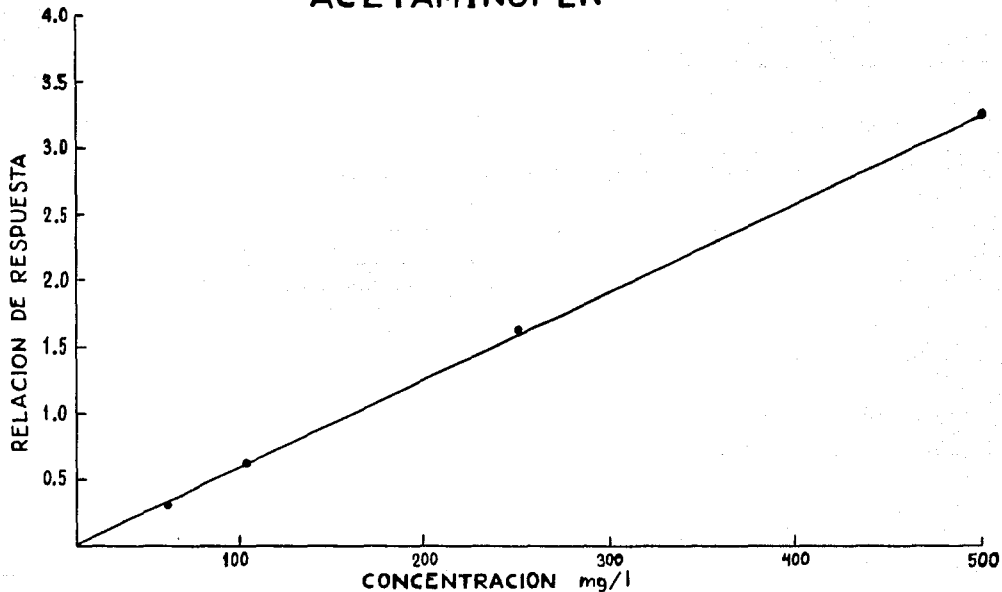


Figura 3.5 Verifica la linealidad del método por encima del rango de 50 mg/l a 500 mg/l. Thoma y cols. Ref. 33

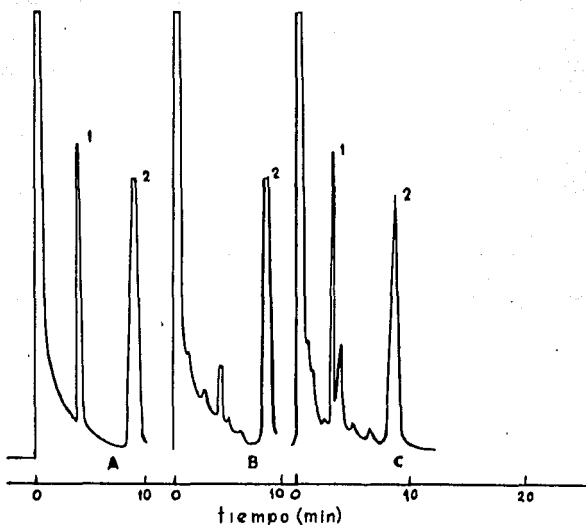


Figura 3.6 (A) Cromatograma de una mezcla de estándares de 2 μ g de paracetamol acetilado y 5 μ g de estándar interno. (B) Cromatograma de un extracto sérico blanco. (C) Cromatograma de un extracto sérico conteniendo paracetamol a niveles de 20 mg/l. 1, paracetamol acetilado; 2, difenil pivalina, Hackett y Dusci Ref. 34

| GAS PORTADOR Y EQUIPO | INYECCION Y E.I. | COLUMNA | DETECTOR | RESULTADOS | OBSERVACIONES | FIG. | REF. |
|--|--|---|--|--|--|------------|------|
| PyeUnicam 104 Integrador HP N ₂ , 40ml/min. P _{H₂} = 2.2atm, - P _{O₂} = 1.8atm. 2 | 5 µl t=ambiente (noseusó Δ) EI: N-butilil p-aminofenol, 200 mg/l CHCl ₃ . | Vidrio 1.50x4 mm D.I. silani- zada, Apolane 87 (3%)/chromo sorb WHP (100-120). t = 235°C. | DIL. t = 300°C. | Lim. detecc.=10mg/l CV = 9.2% (n=7). N-metilimidazol es 360 ve- ces más eficiente que la piridina. Linealidad 10-400 mg/l. Alternativa- en emergencias. | Prep: B-D directa (Ac ₂ O-N-metilimid- zol/CHCl ₃ ; 5/1/30) análisis por dupli- cado rápido y sim- ple. pH regulado = 7.4. | 3.7 3.8 | 37 |
| Varian 2100 N ₂ , 5ml/min. H ₂ , 30ml/min. Aire 150ml/min. | 1-3 µl, t = 300°C. EI: p-bromo ace- tanilida, 10 µg por ml. | vidrio, 2mx2mm D.I. SP 2250 (3%)/Chromo--- sorb WoAW/DMCS (m 80-120). t = 145°C | DIL t = 300°C Patrones 10µg/ml. | tr = 7,0 min. Linealidad: 0.1-20µg/ml. coef. de correlación = 0.99 Extracción completa en intervalos de prueba. | Prep: B(éter)-C-D (C ₆ H ₅ N(CH ₃) ₃ OH, 0.2 M en MeOH). Evap: 45°C/N ₂ . Cálculo: Altura de picos. Microanálisis para analéxicos. | 3.9 | 38 |
| Packard 427 | 4µl. t = 260°C. EI = N-butilil- p-aminofenol. | 2m x 2mm D.I. OV-17(3%)/ chrom WAW-DMCS (m 80-100) t = 190°C. | DIL. t = 300°C. | tr = 7.2 min. Linealidad: 0.1-7x10 ⁻⁴ M. No se encon- tró interferencia con 26 fármacos. Técnica rápida- mejorada. | Prep: B(piridina)- C (simplificado)- D(Ac ₂ O)reconstitu- ción: AcOEt. Preci- pitac. de protei- nas con ác. sulfo- tungstico y efecto salino. | 3.10 | 39 |
| GLC común | EI = acetamino fén-d ₃ . | - | DIQ. GLC-EM. m/e 166 y 169 | Límite de sensibilidad -- = 0.1 µg/ml. Linealidad: - 0.5 - 13 µg/ml. Para ace--- taminofén total se trata con B-glucoronidasa y - sulfatasa, se extrae --- (AcOEt), se metila y se anliza | Prep: B(C ₆ H ₆ /C ₂ H ₄ Cl ₂ 7/3)-C(simplific.)- D(diazometano), re-- constitución: AcOEt. | 3.11 | 40 |

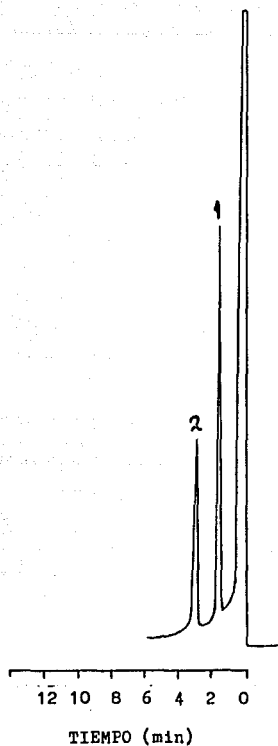


Fig. 3.7 Cromatograma obtenido de un extracto de solución acuosa conteniendo paracetamol (200 mg/l) sobre un sistema de hidrocarbon C87; con 3 μ l de inyección. La concentración inicial de N-butiril-p-aminofenol fue 200 mg/l. Picos: 1 = paracetamol acetilado; 2 = N-butiril-p-aminofenol acetilado. Huggett y Cols. Ref. 37

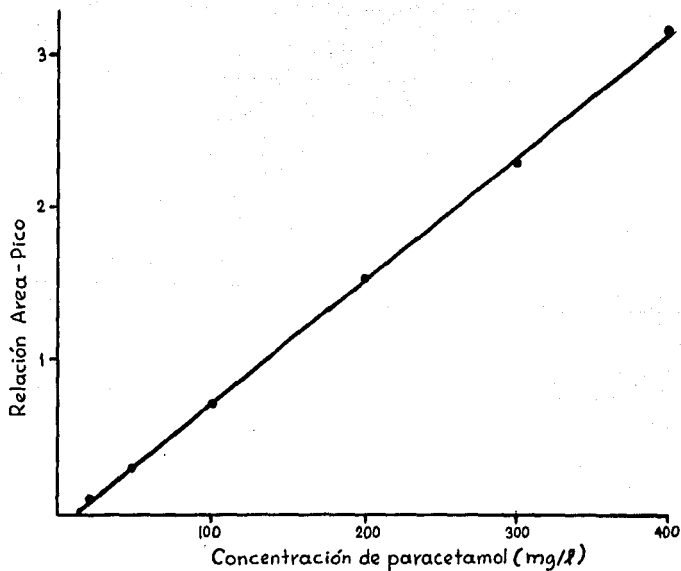


Fig. 3.8 Gráfica de calibración de la relación entre el área del pico de paracetamol acetilado y estándar interno, contra la concentración de paracetamol en la calibración de los estándares acuosos.

Huggett y Cols. Ref. 37

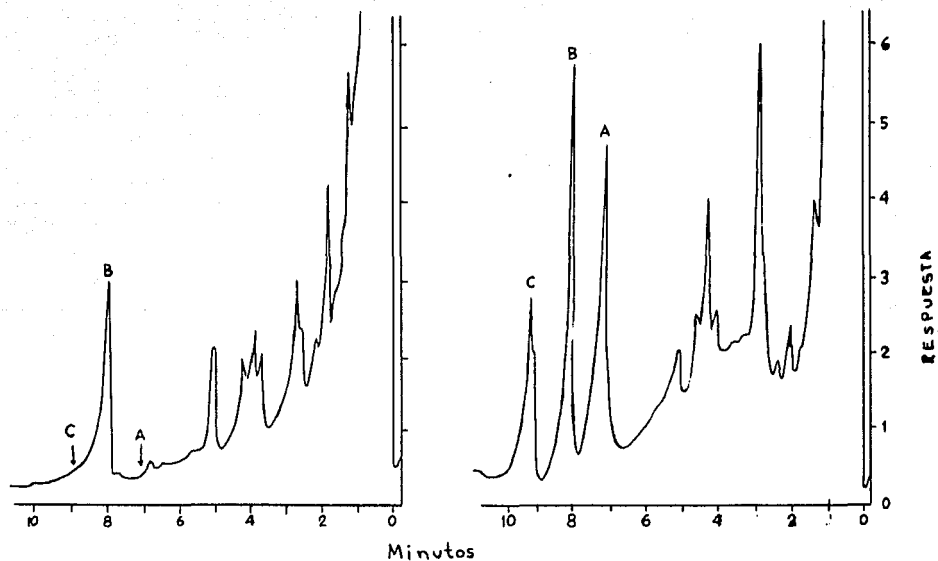


Fig. 3.9 Cromatogramas de gases de una muestra de plasma (0.5 ml). Izquierda: muestra de plasma control conteniendo $5\mu\text{g}$ del estándar interno (pico B); y derecha: muestra de plasma conteniendo $2.5\mu\text{g}$ de acetaminofén (pico A) y fenacetina (pico C) con $5\mu\text{g}$ del estándar interno (p-bromoacetanilida). Los compuestos mencionados fueron cromatografiados como derivados metilados.
 " Evans y Harbison. Ref. 38

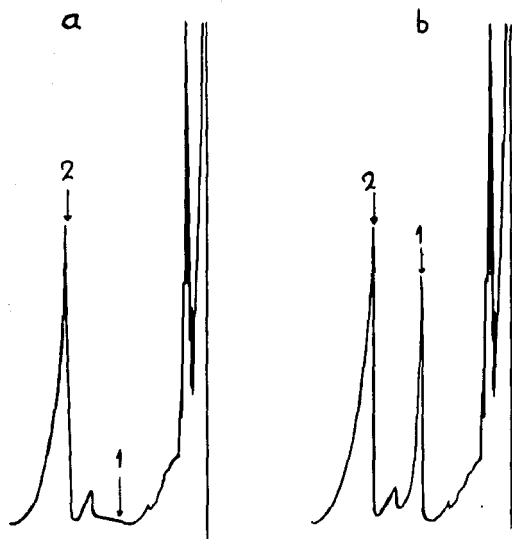


Fig. 3.10 Ejemplos de cromatogramas : (a) plasma blanco; (b) plasma
conteniendo una concentración de 0.13 mM/l de paracetamol.
(1) Paracetamol; (2) Estándar interno. Pegón y Vallon. Ref. 39

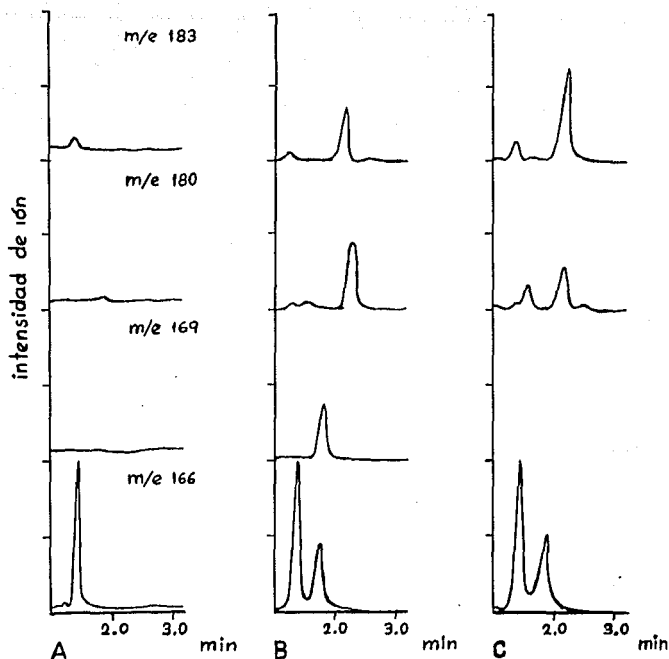


Fig. 3.11 Cromatogramas típicos GLC-EM para la determinación de fenacetina y acetaminofén en un sujeto quien recibió una dosis oral de 900 mg de fenacetina. (A) plasma blanco a tiempo cero. (B) 6 h después de dosificación, fenacetina (m/e180) = 17 ng/ml, fenacetina-d₃ (m/e183) = 25.3 ng/ml, acetaminofén (m/e166) = 2.51 g/ml, acetaminofén-d₃ (m/e169) = 2.52 g/ml. (C) 8h de dosificación, fenacetina = 6.1 ng/ml, fenacetina-d₃ = 25.3 ng/ml, acetaminofén = 1.62 g/ml y acetaminofén-d₃ = 2.52 g/ml. Garland y col. Ref. 40

| 3.3 Determinación en Orina. | | | | | | | |
|--|--|--|-------------------------------|--|---|------|------|
| GAS PORTADOR Y EQUIPO | INYECCION Y E.I. | COLUMNA | DETECTOR | RESULTADOS | OBSERVACIONES | FIG. | REF. |
| GLC | directa. EI = cihexanida | Programa de - temperaturas. Uso de capa delgada para reducir difusión | - | tr = 8,30min. (0.556 respecto a E.I.). O-rina Suero u otros y fluidos. | técnica rápida. Solo se acidifica o sicaliza y se inyecta directamente. Uso enfármacos. | - | 41 |
| GLC - EM | EI = fármacos deuterados (CD ₃ CO) ₂ O y la amina aromática apropiada. | - | DIL - EM monitoreo por m/e. | M ⁺ = 299 (di - TMS ² H -paracetamol), 97%. fenacetina, paracetamol acetanilida y productos de oxidación. | Hidrólisis enzimática de conjugados Prep: B-C-D- (N,O-bis (trimetilasilila acetamida) pH = 5. Orina y plasma. | 3.12 | 42 |
| N ₂ 50 ml/min. GLC, Registrador Hitachi 156. | 10 µl. t = 300°C EI = n-butiril-p - aminofenol. | Vidrio: 4mm x 1.5 m (espiral). SP - 2100 (3%) / Supelcoport (m 100-120). Silanizada "in situ" (HMDS) t = 200°C | CC ⁶³ Ni t = 330°C | CV = ± 1.1%. Linealidad: 0.1 - 20 mg/ml (n = 6) muestra = 0.5ml. tr = 2.4 min. Método rápido Selectivo y sensible, aplicación general. | Prep: B - C - D (Bromuro de pentafluoro benzilo, 30 * 60°C) pH regulado, efecto Salino. Uso: orina y plasma. | 3.13 | 43 |
| 3.4. Determinación en otros fluidos biológicos. | | | | | | | |
| GAS PORTADOR Y EQUIPO | INYECCION Y E.I. | COLUMNA | DETECTOR | RESULTADOS | OBSERVACIONES | FIG. | REF. |
| GLC común | Apropiados, según fármacos involucrados. | SE - 30 (3%) | DIL | 1 a 2 h de análisis total Sobredosis - de medicamentos más comunes. | Fluido: <u>inyecciones intrac.</u> Emergencias. Técnica: B-C-UV c.c.f. | - | 44 |

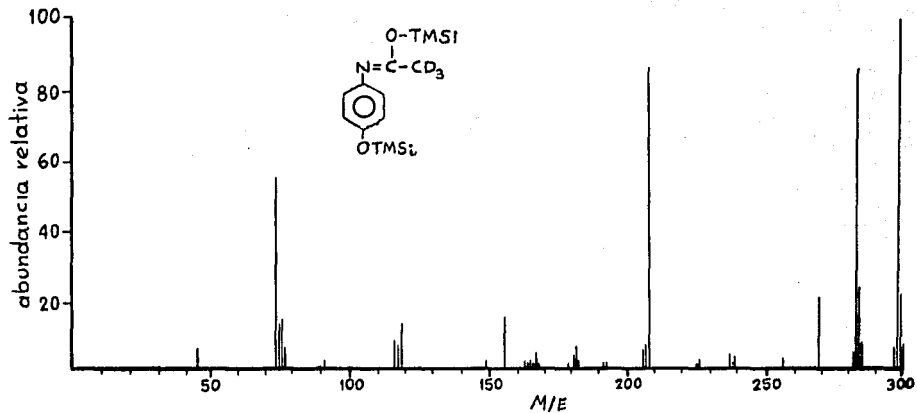


Fig. 3.12. Espectro de masas de di-TMS ²H-paracetamol.
Baty y Cols. Ref. 42

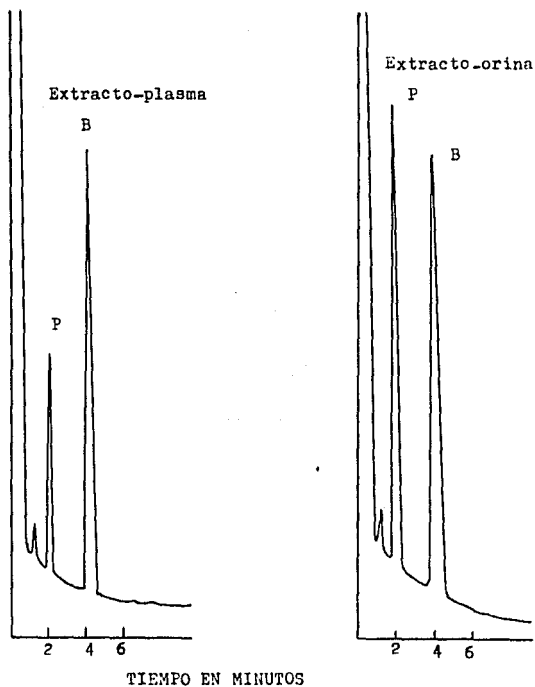


Fig. 3.13 Cromatogramas de los derivados pentafluorobenzilados de paracetamol (P) y n-butiril-p-aminofenol (B). Extracto plasmático: 200 ng por 0.5 ml; extracto de orina: 500 ng por 0.5 ml. Chan y McCann. Ref. 43.

| GAS PORTADOR Y EQUIPO | INYECCION Y E.I. | COLUMNA | DETECTOR | RESULTADOS | OBSERVACIONES | FIG. | REF. |
|--|---|---|---|---|--|--------------|------|
| GLC - EM típicos | EI = 2_{H_3} para cetamol. | - | CE (neg. ion chemical ionization). m/e = 391. | Límite de detección: 1 pg. Precisión: 8% (0.2-0.5 ng de paracetamol). | Fluido: <u>fracción microsomica de hígado</u> . Uso: incubaciones microsomales. Técnica: B-C-D (cloruro de 3,5 bis-trifluorometil benzilo) | - | 45 |
| Hewlet - Packard 5710 E. N_2 , 40ml min. | 1 μ l. t = 250°C. EI = N-propil-p-aminofenol. | dual de vidrio: 122x0.6cm (2mm D.I.), OV 17 - (3%)/chromosorb Q (m 100-120). t = 260°C. | DIL. t = 300°C. | tr=4.9 min. Límite de detección: 0.5mg/l. Reproducibilidad: 2% (suero, 10mg/l, n=10) y 3% (saliva, 10mg/l, n = 10). Alcebo de 8 mg fue de 4.0 y 3.4% respectivamente. | Fluido: <u>Saliva</u> . Uso: estudios farmacocinéticos. Técnica: B-C-D- (yadura de heptilo e hidróxido de trimetilamonio). pH regulado, efecto salino. | 3.14 3.15 | 46 |

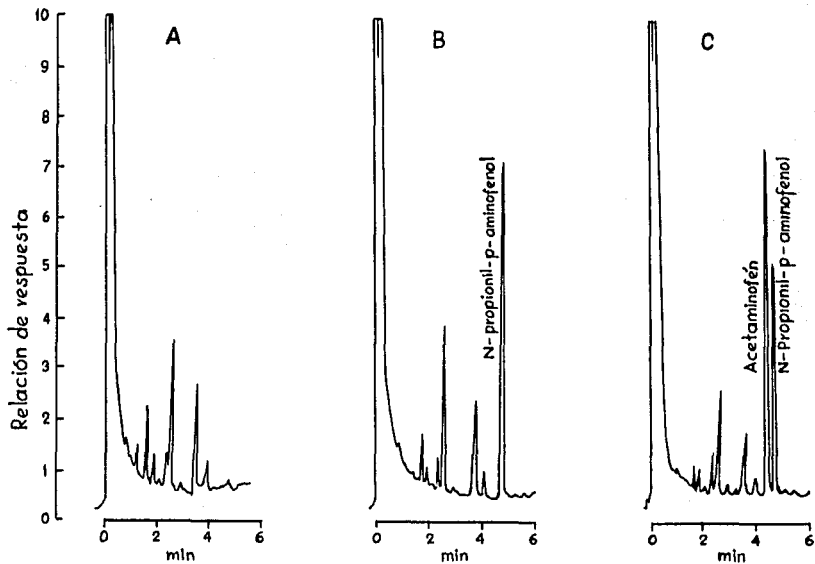


Fig. 3.14 Cromatogramas de extractos séricos derivados de acuerdo al procedimiento. A= blanco, B= estándar interno, C= muestra. Dechtiaruk y col. Ref. 46.

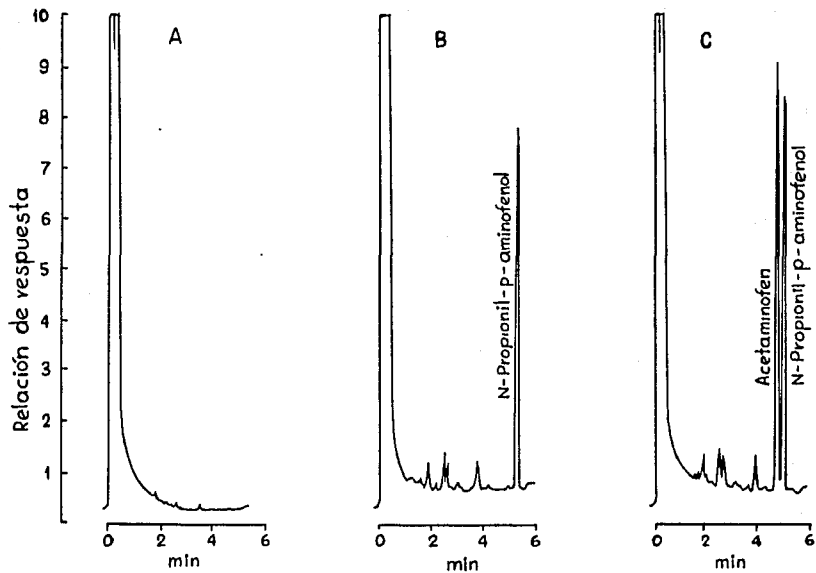


Fig. 3.15 Cromatogramas de extractos salivarios derivados de acuerdo al procedimiento. A= blanco, B= estándar interno C= muestra. Dechtiaruk y col. Ref. 46.

CAPTULO 4

CUANTIFICACION POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.

Se presentan las técnicas de CLAR usadas para determinar paracetamol en fluidos biológicos.

4.1 Determinación en suero.

Khalil y Gonnert proponen como método de separación para análisis toxicológicos la cromatografía de líquidos. Estudian efectos del compuesto, fase móvil, pH, fase estacionaria y tipo de detección usado (47).

Se usó como muestra el sobrenadante de suero desproteinizado con varios reactivos. El factor más importante fue el pH. La mejor separación se obtuvo con " μ -Bondapak C₁₈" (octadeciltrichlorosilano químicamente unida a microesferas de sílice), fase móvil: MeOH-H₂O (50:50, pH=3.5) y detección por UV. El tiempo total de análisis fue aproximadamente 20 minutos, fig. 4.1.

Los compuestos presentados son: ACET = acetaminofén, AS = ácido salicílico, ASP = aspirina, FEN = fenacetina.

Otro método similar para determinación de acetaminofén y fenacetina por CLAR en fase inversa y detector de UV (254 nm), mostró linealidad desde 0.5 mg/l a 100 mg/l para acetaminofén y hasta 40 mg/l para fenacetina (48).

La recuperación varió en el intervalo de 94-109% de paracetamol y de 90-110% para fenacetina.

Tanto las recuperaciones absolutas que excedieron 80%, como la variación día a día y la desviación fueron $< 6\%$ para ambos fármacos.

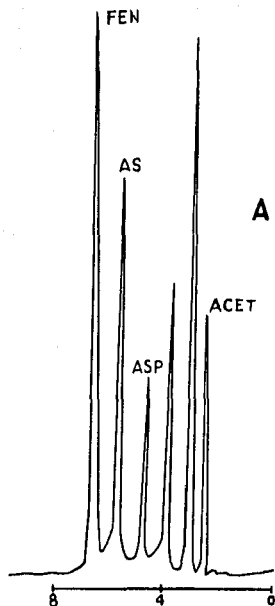


Fig. 4.1A. Cromatograma de la separación de seis compuestos sobre sílica gel unida C18, 5 μ m. Fase móvil metanol/ agua (50/50) (V/V). pH= 3.5 (H_3PO_4).

Khalil y Gonnet Ref. : 47

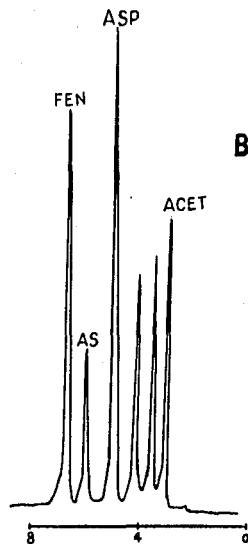


Fig. 4.1B. Cromatograma para la separación de seis compuestos sobre sílica gel unida a C8, 5 μ m. Fase móvil metanol/agua (50/50) (V/V). pH = 3.3 (H_3PO_4).

El tratamiento de la muestra consiste en extraer con acetato de etilo el paracetamol, la fenacetina y el estándar interno (acetacetanilida en MeOH) de un suero amortiguado. Después de centrifugar, decantar y evaporar el acetato de etilo, el residuo se redissuelve en MeOH y se inyecta una alícuota de esta solución al cromatógrafo.

Columna: octadecilsilano o "Whatman ODS", fase móvil: MeCN-regulador de fosfatos (19:81), pH= 7.4.

Un método general describe la determinación simultánea de ácido salicílico, paracetamol y fenacetina en suero. Otros analgésicos como: aminofenazona, fenazona y dipirona, pueden determinarse al mismo tiempo (49).

Cien microlitros de suero se mezclan con 600 μ l de MeOH y se centrifuga, se toma una alícuota y se inyecta al cromatógrafo.

Columna empacada con RP-5C₁₈, fase móvil: solución reguladora y MeOH (10+50) a pH = 3.0.

La salicilamida se puede usar como estándar interno.

Se encontraron los coeficientes de variación de 3.4% para ácido salicílico y fenacetina, 1.9% para acetaminofén.

Las recuperaciones en suero de ganado son 98-101%.

En neonatos el volumen de la muestra puede reducirse de 100 a 10 μ l. Este método es conveniente y seguro en farmacia clínica y toxicológica.

Otro método de cromatografía líquida que se describe preciso, sensible y lineal de 1 a 400 mg/l para la cuantificación de paracetamol en suero utiliza 20 a 50 μ l de este último. La precisión o coeficiente de variación fué 6.5% a 24 mg/l, día a día. El pro

cedimiento fue más específico para acetaminofén y sólo el salicilato tiene un tiempo de retención similar al mismo, pero fué resuelto satisfactoriamente (50).

0.05 ml de muestra se extraen con 1 ml de una mezcla de isopropanol: CH_2Cl_2 : Et_2O (1:5:2). La fase orgánica se evapora a sequedad. El residuo es disuelto en 50 μl de MeOH y se inyectan 5-10 μl de muestra. La columna de fase inversa se empacó con "ODS-SIL-X-I". Fase móvil: acetonitrilo al 5% V/V, en ácido acético 3.5 mM. Velocidad de flujo: 1.5 ml/min y la temperatura del horno fue de 50°C.

Los picos de los compuesto son detectados espectrofotométricamente a 325 nm.

Miceli y col. midieron acetaminofén y salicilatos simultáneamente en suero y plasma; el método sirve para determinar concentraciones terapéuticas y tóxicas en muestras pequeñas (50 μl) que lo hacen útil para infantes. El ensayo sólo requiere una extracción simple y la cromatografía se completa en 6 min (51).

Cromatógrafo: Perkin-Elmer mod. 601 HP, detector LC55 de longitud de onda variable, integrador $\Sigma 10$ Data Sistem.

Columna: fase inversa empacada con ODS-Sil-X-1 y μ -Bondapak C_{18} (Waters Assoc.), con esta columna los resultados fueron los mismos excepto que todos los picos eluyen 0.5 min más tarde.

Fase móvil: 2-propanol en ácido fosfórico 0.02 M (pH =2.9), 3:97. Flujo 1.5 ml/min. Temperatura de la columna 40°C, efluente monitoreado a 248 nm.

Procedimiento: se colocan 50 μl de suero o plasma en un tubo de centrifuga de 1.5 ml, se agregan 500 μl de CH_2Cl_2 -isopropanol (1:1) conteniendo el estándar interno 8-cloroteofilina, se agre-

gan 0.1-0.2 g de NaCl se mezclan con vortex por 2 min y se centrifuga por 5 min. Se aspira el sobrenadante, se pasa a un tubo de vidrio y se evapora a sequedad a 40°C bajo una corriente suave de N_2 . El residuo se disuelve en 50 μ l de metanol. Se cromatografía en 2-5 μ l.

Los tiempos de retención para acetaminofén (APAF), salicilato (SA) y estándar interno (EI), fueron 1.90, 2.15 y 4.16 min, respectivamente (fig. 4.2). La recuperación APAF y SA fue de 97 a 105% y 96 a 108%, respectivamente.

Los coeficiente de variación (CV) dentro de la misma corrida para acetaminofén y salicilato fueron 2.1 y 2.3% respectivamente. El CV día a día para APAF fue 3.3% y para SA 6.3%.

En un método similar al anterior por fase inversa unida químicamente, la estimación simultánea de acetaminofén no conjugado y fenacetina se investigó para posibles interferencias con 36 fármacos en suero o plasma. El procedimiento emplea 0.1 ml de muestra, la extracción es rápida y se usó acetoacetanilida como EI (52).

Columna: 30 cm x 4 mm DI, detector ajustado a 254 nm, fase móvil: acetonitrilo/regulador de fosfatos 19:81 (pH= 4.4). Flujo : 3 ml/min y temperatura del horno: 50°C.

Los estándares de paracetamol, fenacetina y acetoacetanilida se prepararon a 200, 200 y 400 mg/l respectivamente, en metanol.

La extracción se efectúa a pH regulado de 7.0 con acetato de etilo y evaporación del mismo a 70°C en forma similar al procedimiento anterior, con inyecciones de 20 μ l.

Los resultados son similares a los de Miceli y col. pero en menor tiempo (fig. 4.3). La detección y reproducibilidad se obtie

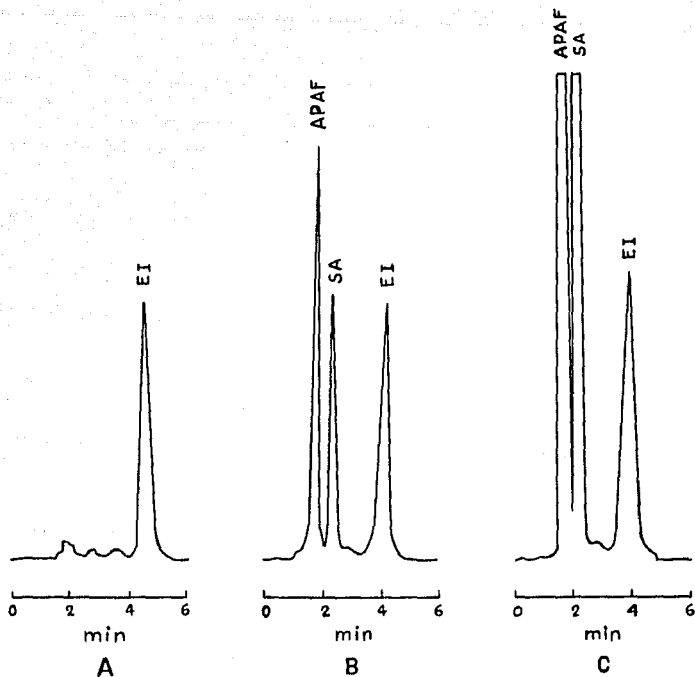


Fig. 4.2 . A, plasma sólo conteniendo estándar interno (8-cloro-teofilina, 20 mg/l); B, plasma con el fármaco libre conteniendo 50 mg de acetaminofén , 200 mg de salicilato por litro y estándar interno; C, muestra de paciente conteniendo 122 mg de acetaminofén , 777 mg de salicilato por litro y estándar interno.

Miceli y Cols. Ref.: 51

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

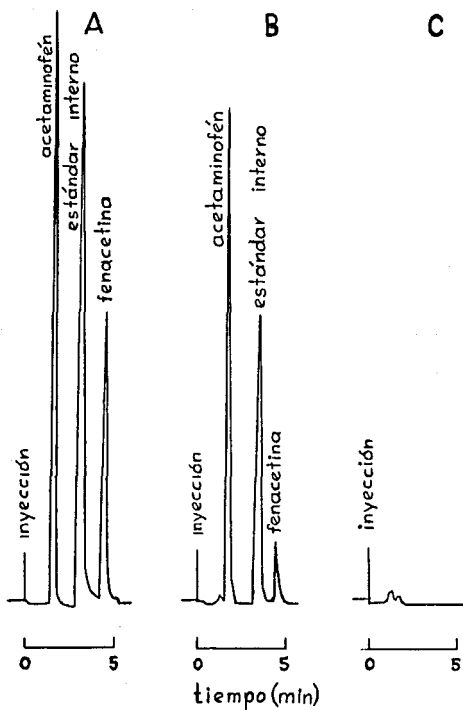


Fig. 4.3 Cromatogramas típicos.

A, estándares de referencia; B, muestra de plasma conteniendo 32 mg de acetaminofén y 3 mg de fenacetina por litro; C, muestra de plasma blanco. Gotelli y Cols. Ref.: 52

ne a concentración del fármaco ≥ 0.5 mg/l y la recuperación fue $> 80\%$ para ambos fármacos manteniéndose un CV día a día $\leq 5\%$.

En los métodos presentados, se observa que todos ellos operan por fase inversa químicamente unida (PIQU) y detección por UV. La temperatura de la columna usualmente es la ambiente y raras veces se aumenta a más de $40-50^{\circ}\text{C}$. Todos los autores indican recuperaciones $> 80\%$ y coeficientes de variación $\leq 6.5\%$, siendo prácticamente equivalentes en función de los fármacos resueltos, tiempo de análisis, nivel de detección y linealidad logradas.

Por lo anterior así como la cantidad excesivamente numerosa de referencias para la cuantificación de este analgésico y por presentar todas ellas variaciones mínimas, el resto de fuentes de información consultadas se resumen tentativamente a manera de tabla, haciendo resaltar las diferencias que se consideraron como más relevantes para fines de comparación y visualización del perfil bibliográfico en el análisis de p-acetamidofenol en fluidos biológicos.

Los cromatogramas son incluidos en su casi totalidad por considerarlos de alta objetividad visual.

La operación preparativa más importante es la extracción selectiva del fármaco, el procedimiento general consta secuencialmente de las siguientes etapas: adición de solución amortiguadora y estándar interno (EI), extracción, agitación, centrifugación, decantación, evaporación a sequedad, reconstitución e inyección al cromatógrafo.

UV (nm)= detector de luz UV y fijación a la longitud de onda de operación. DET= detector. Elec= electroquímico. conc= concentra

ción. σ = desviación relativa estándar.

Fig. = figura que presenta el cromatograma correspondiente.

REF. = referencia consultada.

Tr. = tiempo de retención. t = temperatura.

d.n.i. = dato no informado en la referencia consultada.

Tabla 4.1. Determinación de acetaminofén en suero por CLAR en FIQU.

| COLUMNA | DET. | E.I. CONC. | EXTRACTANTE | FASE MOVIL | RESULTADOS | FIG. | REF. |
|---|--|--|---|---|--|------------|----------|
| Partisil-10 ODS t=400 C | UV 250 nm | N-propionil p-aminofenol 5mg/l. | Et ₂ O. Evap. c. aire t.omb.Inyec ción = 5 μl. | MeCN/H ₂ O, 0.1M, 5:95 pH=2.7; 1.0 ml/min. | Tr=5.1 min. Lineali- dad: 10-100 mg/l CV=1.2% (n=10) Uso: terapéutico y emergencias. | 4.4 | 53 |
| μL Bondapak C ₁₈ Dp=10 μl m.3.9x 300 mm. Separación de 28 fármacos, meta bolitos y relac. | UV 204 nm Schoe- ffel | B-hidroxietil- teofilina. | AcDET.Evap at ≤ 30°C/N ₂ Inyección: 10 μl (auto inyector WISP). | MeCN/H ₂ O 1:11 más 0.05 y 0.07 % de AcOH y Et. N. pH=4.8 2.5 ml/min. | V.gráfica: 5mm/min. Tr=3.35 min. Linea- lidad: 1-180 mg/l. CV ≤ 5% (n = 2). Det.automatizada Uso: monitoreo tera- péutico. | 4.5 | 54 |
| Zorbax Sil Dp =5 μ m.2.1x250 mm. cromatógrafo: Dupont W-830 | UV 248 nm Dupont | 2-acetamido fenol y 3-a- cetamidofenol 10-100 mg/L. | AcDET.Evap a 65°C/N ₂ Inyección: 5 μl. | H ₂ O/C ₁₂ H ₁₆ / EtOH/AcOH; 540/360/100/ 0.72; 0.4 ml/min. | Tr=7.7 min. Linea- lidad: 0.5-300 mg/l. micrométodo sen- sible, preciso y se- lectivo. Uso: neo- natales y pediatria. | 4.6 4.7 | 55 |
| μL Bondapak C ₁₈ Adaptación del método de Druett y col. para teo- filina. | UV 254 nm; Sone. 0.20 mufa. | β -hidroxietil teofilina. (patrón = 400 mg/l)/MeCN | AcDET.Inyec ción = 1-5 μl | MeCN/H ₂ O/ AcOH, 3.0 ml/min | Tr=3.0 min. Linea- lidad: 25-400 mg/l. Uso: micrométodo rápido, concentra- ciones tóxicas. | | 56 57 |

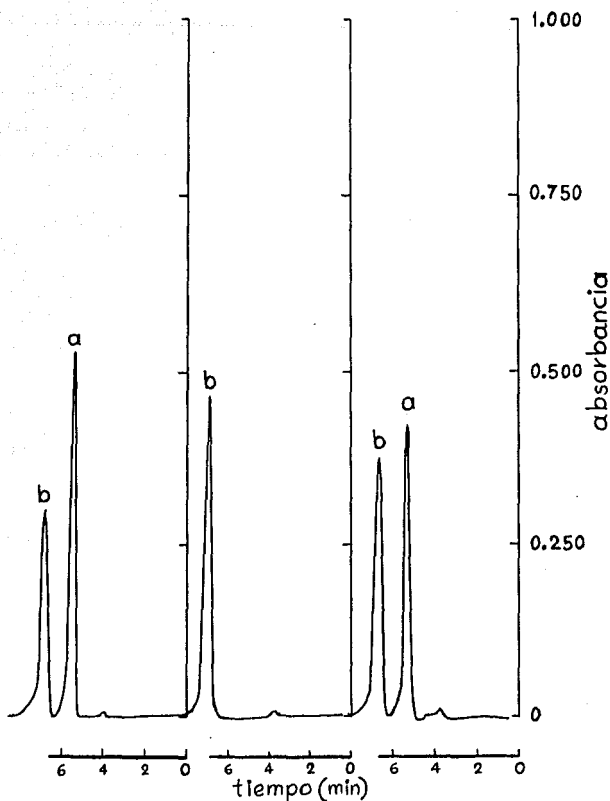


Fig. 4.4 Cromatogramas (de derecha a izquierda) de una muestra de plasma estándar (50 mg/l), una muestra de plasma blanco, y una muestra de suero de un paciente con sobredosis con una concentración de 85 mg/l (Horvitz y Jatlow, ref. 53). Acetaminofén (pico a). Estándar interno (pico b), N-propionil-p-aminofenol.

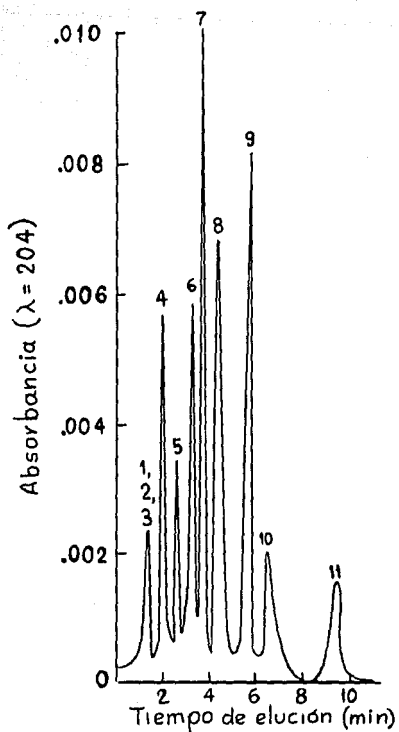


Fig. 4.5 Cromatograma de elución para: (1) ácido úrico, (2) ácido 1 y 3-metilúrico, (3) hipoxantina y xantina, (4) 1 y 3-metilxantina, (5) teobromina, (6) acetaminofén, (7) teofilina (8) β -hidroxietilteofilina, (9) etosuccimida, (10) cafeína y (11) 8-cloroteofilina. Según Quattro-ne y Putnam, ref: 54.

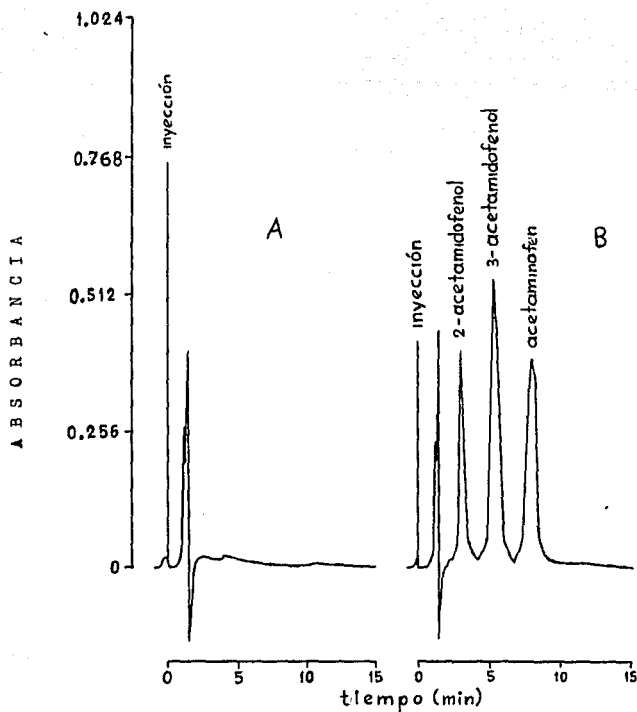


Fig. 4.6 Cromatogramas de una muestra de suero como blanco (A) y una muestra de suero fortificado con 100 mg de acetaminofén y estándar interno, por litro (B). Fletterick y col. ref: 55.

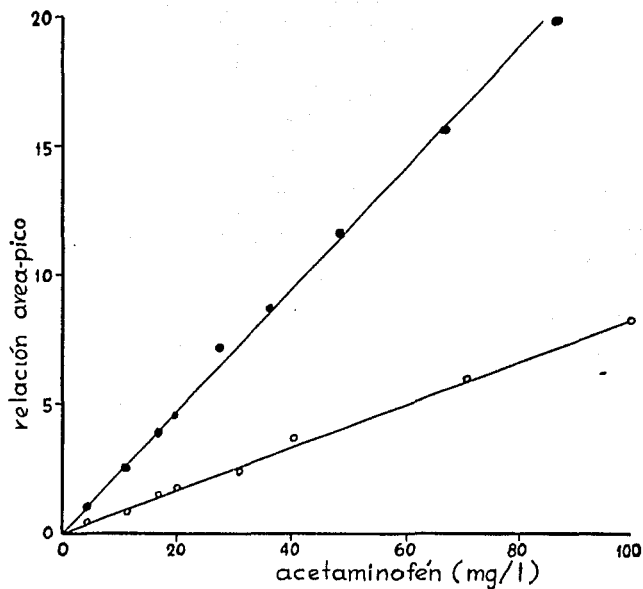


Fig. 4.7 Curvas estándares para acetaminofén, como estándares internos con 2-acetaminofenol (○) y 3-acetaminofenol (●). Pletterick y col. ref: 55.

| COLUMNA | DET. | E.I. CONC. | EXTRACTANTE | FASE MOVIL | RESULTADOS | FIG. | REF. |
|--|--------------------------------|---|--|---|---|------|------|
| μ Bondapak C ₁₈ El recibo de la fase móvil elimina desgasificación. | UV 250 nm | B-hidroxitil taofilina y B-cloro taofilina. | AcOEt. Recuperación: 95-101%. | MeCN/CH ₂ PO ₄ 0.1M, 91/9. pH=4.0. | Tr=4.3. Linealidad 0.3-1.0 g/l. CV < 6%. Uso: monitoreo, rutina, urgencias. | 4.8 | 58 |
| Aminex A-5(t=21°C). Suero o plasma. Intercambio catiónico previo a nept. con C ₁₈ , 1.4 mm x 50 cm. | UV 254 nm Waters 1205 | N-butiril-p-aminofenol, 50 mg/l | Muestreo capilar, Cromat: mod 6000, inyector UCK. Inyección = 3 μ l. | MH ₂ PO ₄ 0.45M, pH=3.0 0.2 ml/min. Reemplazo de precolumna cada 40 det. | Tr=32 min. Registrador mod: 627. CV=5% (n=2). Uso: estudios clínicos en neonatos e infantes. | 4.9 | 59 |
| μ Bondapak C ₁₈ (Waters), 4.6 mm x 15 cm. Cromat: Sigma Chem. Co. Mejora de un método previo | Elec +0.65 V vs Ag/AgCl | N-propionil-p-aminofenol, 1.2 μ g/ml | CH ₂ Cl ₂ /éter/ iPrOH : 5/- 2/1. En reg. de fofatos pH=7.0 ant. con NaCl. Evapn. a 40°C/N ₂ | H ₂ O /MeOH/AcO- MH ₂ IN/AcOHIM: 77.5/13.9/6.6/ 1.8; 1.17 ml/min. | Tr=6.0 min. Linealidad: 3 ng-20 μ g/l. micrométodo ultrasensible, uso: detección de trazas de acetaminofén. | 4.10 | 60 |
| Plastick C ₁₈ (Dp =10 μ m), 5mm x 10 cm. Cromat: Perkin-Elmer Σ 10 data station. | UV Waters 445. | B-cloroteofilina, 150 mg/l | CH ₂ Cl ₂ /iPrOH :9/1, en HCl IM. Evapn. a 50°C/N ₂ . Inyección = 20 μ l. | MeOH al 28% v/v en regulador de acetato pH = 3.6; 1.0 ml/min. Bomba mod. 45 (Waters). | Tr=3.2 min. Límite de detección 1 μ g/l. Uso: terapéutico e intoxicación (analgésicos, barbitúricos, antibióticos). | 4.11 | 61 |

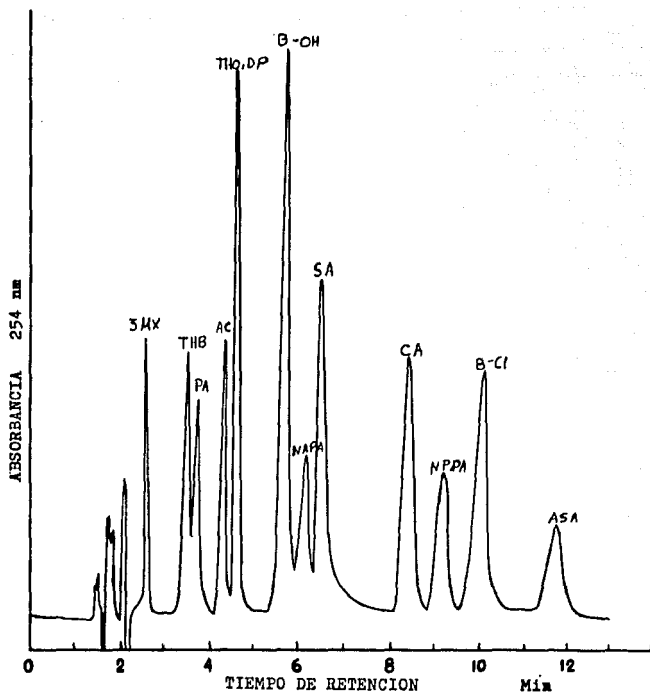


Fig. 4.8 Cromatograma de líquidos de una mezcla de estándares de 3-metilxantina (3-MX), teobromina (THB), procainamida (PA), teofilina (THO), difilina (DP), acetaminofén (AC), β -hidroxietilteofilina (β -OH), N-acetilprocainamida (NAPA), salicilato (SA), cafeína (CA), 8-cloroteofilina (8-Cl), N-propionilprocainamida (NPPA) y acetilsalicilato (ASA). Ou y Prawley, Ref: 58.

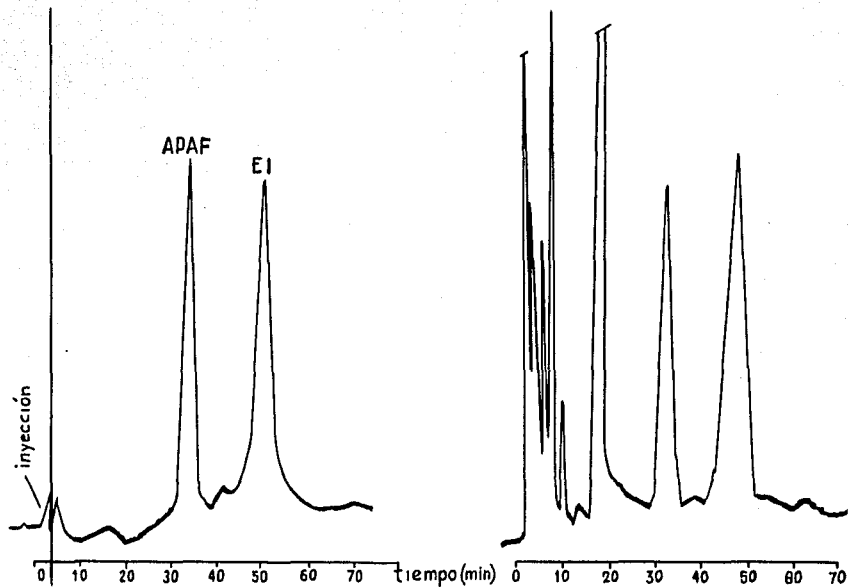


Fig. 4.9 Cromatogramas de: izquierda, una solución acuosa de 20 mg/l de acetaminofén (ADAF) y derecha, una muestra de plasma 0.5 horas después de una dosis de 1.0 g de paracetamol. Ambas muestras fueron mezcladas con un volumen igual de N-butilil-p-amino-fenol (50 mg/l) como estándar interno (EI). Blair y Rumack, Ref:59.

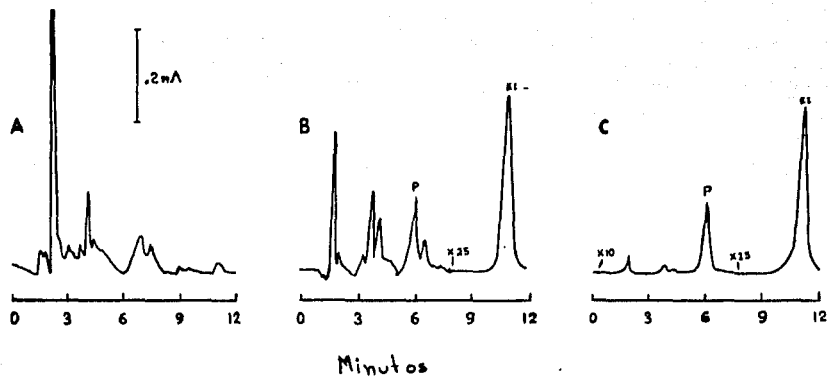


Fig. 4.10 Cromatogramas de extractos séricos que contienen: 20 mg de acetaminofén por ml (B), 200 ng de acetaminofén por ml (C), y sin acetaminofén (A). P, paracetamol; y EI, estándar interno. Micrométodo ultrasensible de Miner y Kissinger (60), DET = Elec.

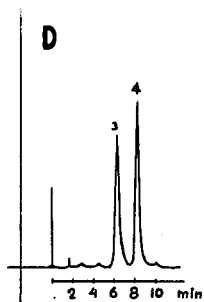
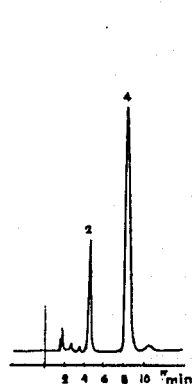
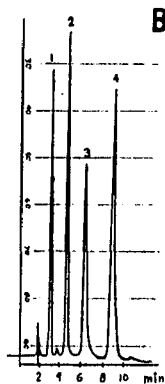
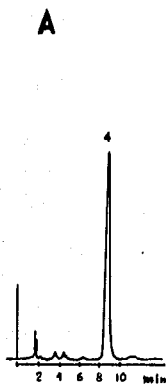


Fig.4.11. Cromatograma A: muestra de suero como blanco. Cromatograma B: muestra de suero estándar. 1 = acetaminofén ($100\mu\text{g/ml}$), 2 = teofilina ($20\mu\text{g/ml}$), 3 = salicilato ($200\mu\text{g/ml}$), y 4 = 8-cloroteofilina (estándar interno). Cromatograma C: muestra de un paciente con medicación de teofilina (concentración de teofilina = $8.1\mu\text{g/ml}$). Cromatograma D: muestra de un paciente con medicación de salicilatos (concentración de salicilato = $240\mu\text{g/ml}$). Ref:61

| COLUMNA | DET. | E.I. CONC. | EXTRACTANTE | FASE MOVIL | RESULTADOS | FIG. | REF. |
|---|--|--|---|---|--|------|------|
| FIGU. Cromat: Waters, sistema de datos 730. | UV 248 nm Waters 450 | N,N-Dietil- m - toluamida 80mg/l de CH ₃ CN. | CH ₃ CN. Un solo paso para preci- pitac. de protei- nas. Inyector: UGK (20 μ l). | MeOH/H ₂ O/AcOH: 60/34/6, bomba mod. 6000 A. | Tr=2.49 min. Linealidad 10-300 mg/l (hasta 700 para analitos). CV= 4.4%. Recuperación 96.3- 101.2%. Uso: Análisis de rutina. | 4.12 | 62 |
| FIGU, RP-8(7 μ m) 25 cm Perkin-Elmer 1220 | Foto- métrico. | d.n.i. | Un solo paso - (precipit. de - proteínas, sin coprecipitación de plasma). | MeOH/H ₂ O 85 proz. H ₃ PO ₄ 20/80/0.4 | Tr=5.6 min. Límite de - detección 100 ng/l. CV=3%. Recuperación=100% Uso: Terapéutico. | 4.13 | 63 |
| Column: Fast-LC-8, (Technicon Instr.) 150x0.46 mm. part. 5 μ m sílica unida con dimetiloctil cloro silano. Cromat: Fast-LC Análisis automáti- zado ultrarrápido. | Fast- LC Detecc. Long. de Onda variá- ble | MeOH/H ₂ O 15% Clorob- barbital 50 mg/l y β -hidroxio tiltoofilina 50 mg/l | Pretratamien- to "in situ" (or. Line) | MeOH/H ₂ O 14%, con fosfo- to sódico mono- básico 0.0025M y trietilamina 0.065% (pH 6.60; 4.0ml/min) | Tr=0.80 min. 0.3%. Recuperación: 96-99 % Uso: terapéutico (analgésicos, anticon- vulsantes, estimulantes, hipnóticos, etc). | 4.14 | 64 |

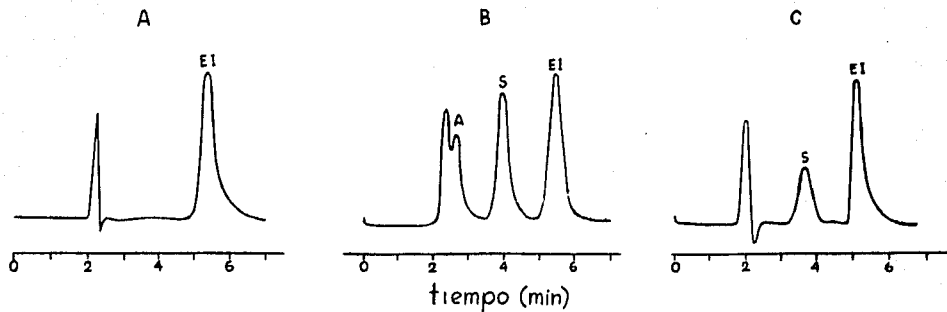
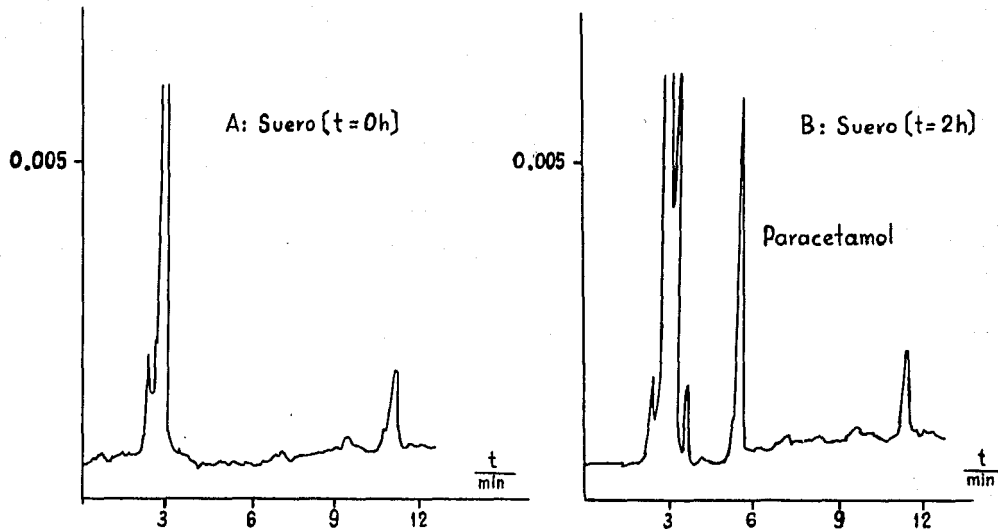


Fig. 4.12 Cromatogramas típicos obtenidos según procedimiento de Ferrel y Goyette. Tiempos de retención: acetaminofén, 2.49 min; salicilato, 3.84 min; estándar interno, 5.35 min. (A) muestra de suero con estándar interno; (B) control sérico conteniendo 30 mg/l de acetaminofén y 100 mg/l de salicilato; (C) muestra del paciente que no contiene acetaminofén, con una concentración de salicilato de 50 mg/l. Ref: 62.



Ph140.1

Fig. 4.13 Cromatograma por CLAR de una muestra de suero de un paciente después de una dosis de paracetamol. Ebel y col. Ref: 63

A: Muestra de suero a $t=0$

B: Muestra de suero a $t=2h$; con una concentración de acetaminofén de $3.31 \mu g/ml$.

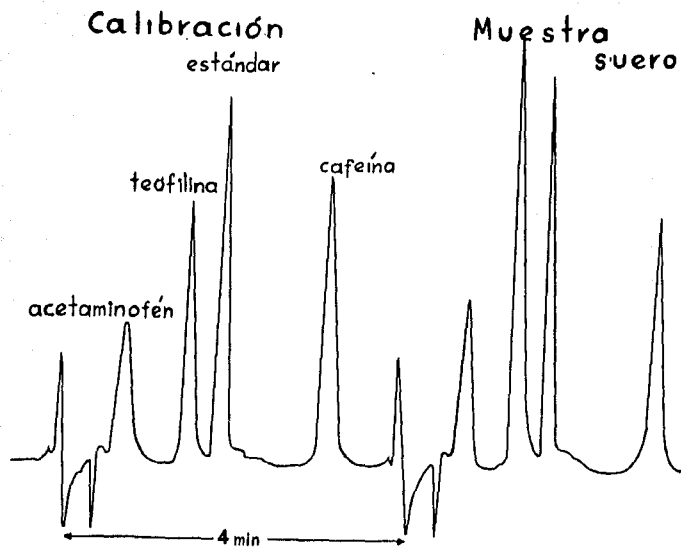


Fig. 4.14 Separación por cromatografía de líquidos de acetaminofén, teofilina y cafeína. Concentraciones séricas: acetaminofén, 79 mg/l; teofilina, 23.2 mg/l; cafeína, 23.2 mg/l (0.2 AUFS). Técnica automatizada ultrarápida de Van der Wal y col. Ref: 64.

4.2. Determinación en sangre (tabla 4.2.)

| COLUMNA | DET. | E.U. CONC. | EXTRACTANTE | FASE MOVIL | RESULTADOS | FIG. | REF. |
|--|----------------------------|--|---|---|--|--------|------|
| <p> μ Bondapak Ph C_{18}, 4.6 mm x 30 cm. t. emb. (separación de hidroclorotiazida con AcONa 0.01M/ MeCN: 93/7, pH=4.0). </p> | UV 250 nm. SMII | N-propionil-p-aminofenol y -prazepam, - 20 mg/l. | AcOEt. Evapor. a 45°C/N ₂ filtr. PH.P-013 5 μ l. (Septuleno UGK). | H ₂ O/MeOH/HCOOH 2 86/14/0.1; 2 ml/min. bomba mod. 6000 A (Matera) | Tr=4.4 min. linealidad: 1-100 mg/l. CV \leq 2.42%, σ \approx 0.60 (n=10). Recuperac. - 92.0-100.0%. Uso: analgésicos, benzodiazepinas y barbituratos. | 4.15 | 65 |
| <p> μ Bondapak C_{18} (método específico, exacto y simple). </p> | UV 250 nm | Salicilamida cuantificación por altura de picos. | AcOEt. (EtOH para formas comerciales). | MeOH/regulador de acetato. | Límite de detección: - 20 μ g/l. Recup. prom. 98.4%. Uso: dosificación de formas comerc. | -- | 66 |
| <p> Zorbax SIL. (comparación con CG). </p> | d.n.i. | carbamazepina y ácido 3-clorobenzoico. | éter etílico - - (dos extracciones). | C ₆ H ₁₄ /CH ₂ Cl ₂ / CHCl ₃ /iPrOH/ AcOH. | Límite de detección -- 400 mg/l. CV \leq 10% Uso: determ. de Benorilato y metabolitos. | d.n.i. | 67 |
| <p> FIGU. RP-8. (experim. prolongada). </p> | Elec. 1.2V | salicilamida (KCl3M). | MeCN/CH ₂ Cl ₂ / éter: 5/3.5/ 1.5. | H ₂ O/MeOH/ AcONa, 1.3 ml/min. | Tr=6.65 min. lim. de- tecc. 10 μ g/l; linealidad: 50-4500 μ g/l. | 4.16 | 68 |
| <p> μ Bondapak C_{18} 4x300 mm, Dp=10 280 μm. Micrométodo por marcaje isotópico. </p> | Dual 254, 280 nm. | [³ H] acetaminofén y [¹⁴ C] re-nacetina. | éter; Evapor/N ₂ . Inyecc=10 μ l (Iny.mod,UGK). | MeCN/H ₂ O/PIC 0-7:3/7/0.16; 1 ml/min. | Tr=4 min. Lim. de- tecc. 50 μ g/l. Linealidad: 0.1-5000 mg/l. CV \leq 5%. Uso: frazco -- radiactivo. | 4.17 | 69 |

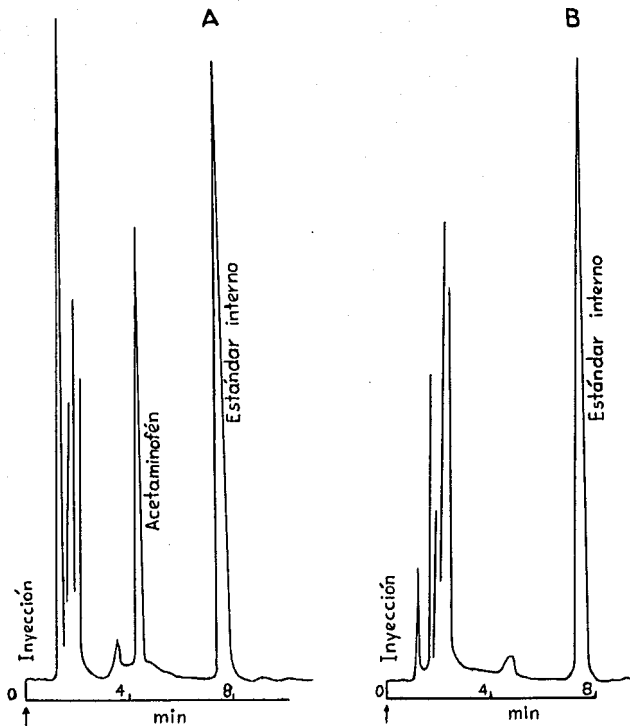


Fig. 4.15 Cromatogramas representativos de : A) Sangre estandarizada de acetaminofén conteniendo 10 mg/ml y B) muestra de sangre en un caso negativo de acetaminofén. Wong, Ref: 65.

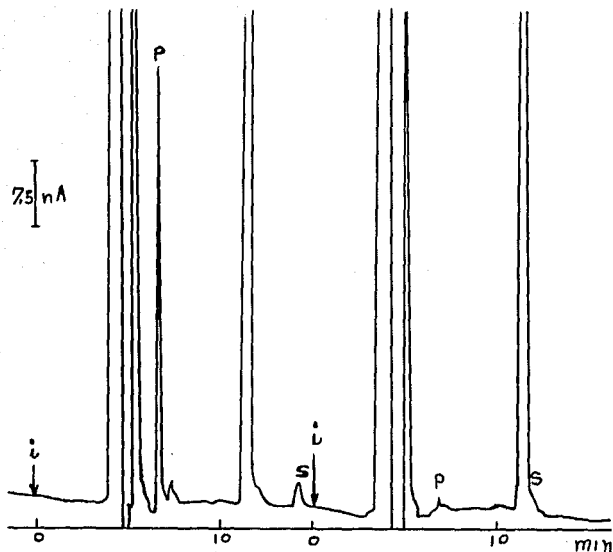


Fig. 4.16 Representa un cromatograma típico por CLAR para muestras de suero conteniendo Paracetamol (P) y Salicilamida (S). Velocidad de flujo 1.3 ml/min; con un potencial de 1.2 V contra Ag/AgCl//3MKCl. Surmann, Ref: 68.

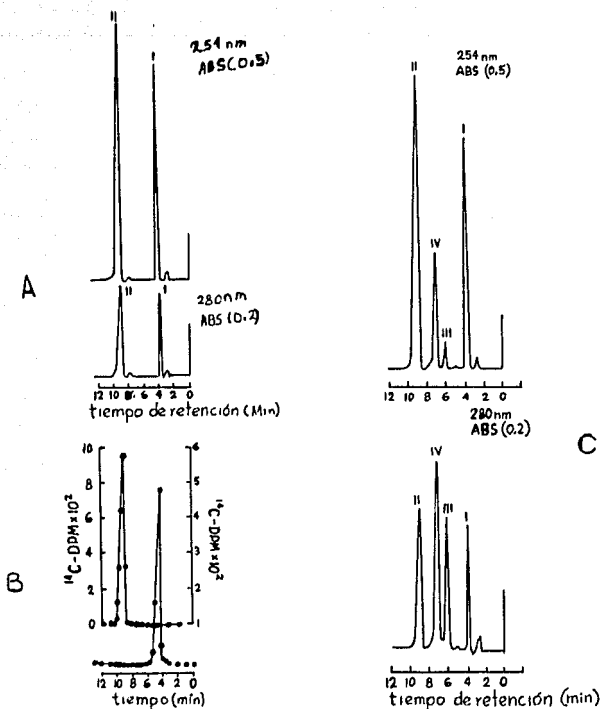


Fig. 4.17 Cromatogramas para acetaminofén (I), fenacetina (II) y estándares radiactivos. (A) absorbancia medida a 254 nm y 280 nm después de inyectar un extracto de la muestra conteniendo $10 \mu\text{g}$ de (I) y $25 \mu\text{g}$ de (II). Las fracciones eluidas de los estándares internos radiactivos, $[^3\text{H}]$ acetaminofén y $[^{14}\text{C}]$ fenacetina se muestran en (B), (C) absorbancia medida a 254 y 280 nm después de inyectar la muestra conteniendo $10 \mu\text{g}$ de (I), $25 \mu\text{g}$ de (II), $22.3 \mu\text{g}$ de fenetidina (III), $30 \mu\text{g}$ de 2-hidroxifenacetina (IV) y $55 \mu\text{g}$ de N-hidroxifenacetina, ésta no fue eluida de la columna. Según Pang y col. Ref: 69.

4.3. Determinación en plasma (Tabla 4.3.).

| COLUMNA | DET. | E.I. GDMC. | EXTRACTANTE | FASE MOVIL | RESULTADOS | FIG. | REF. |
|--|------------------------|---|--|--|---|----------------------|----------|
| FIQU | UV | d.n.i. | Et ₂ O | CHCl ₃ | Lim. detecc: 2mg/l | d.n.i. | 70 |
| FIQU | Elec +800 mV | N-propionil-p aminofenol | AcOEt.Eva. porac. Filtrac. Inyección | MeOH/NaClO ₄ /citrato de sodio. | Linealidad: 2-200 ng/ml. Recuperac: 87.2%. | d.n.i. | 71 |
| Lichrosorb RP-8 | UV 254 nm | d.n.i. | MeOH (CHCl ₃ pa- ra oxifenbutazo na: ofb). | H ₂ O/MeOH/HCO ₂ H 86/14/0.1 (para ofb: MeOH/H ₂ O 85/15). | Tr=4.3 min. Linealidad: 3-24 mg/L. (ofb Tr=2.0 min). uso: terapéutico. | d.n.i. | 72 |
| Hyperil-ODS 5 μ m (Shandon) | UV 250 nm. | N-propionil-p aminofenol | MeOH. Microcon trifuga Beckmann | KH ₂ PO ₄ 0.1M/ 1-PrOH/HCO ₂ H 100/1.7/0.1. | Tr=1.17 min. linealidad: 0.3-1.9 mmol/l Equiv UV=100%. | 4-18 4-19 4-20 | 73 74 |
| 4 Bondapak C ₁₈ 4x300 mm. Cro- mat. mod. 6000, (Waters). | UV 240 nm MSD | No se usa. (reproducibili- dad). Estime- ción rápida. | precolumna C ₁₈ /Corasil 45 μ m. Ba(OH) ₂ , 0.3N Zn SO ₄ , 5% | H ₂ O/MeOH:85/ 15, 1.0 ml/min. Inyección auto- matizada. | Tr=7.0 min. lim. detecc: < 1ng/l. Linealidad:0-32 mg/l Recup. prom. 94%. CV=2.7-3%. | 4-21 | 75 |
| dos col. en serie: 4 Bondapak Phenil (Waters). Det: plasm na, tejidos y orina (metabolitos). | UV 250 nm | [¹⁴ C] acetamino- fén. Marcado -- isotópico. Dosisificación tóxica. | AcOH 0.5%. Inyecc: 50 μ l (orina directa 10 μ l). | NaNO ₃ 0.01M en AcOH 0.5%, 1.5 ml/min. | Absorción rápida, altos niveles en plasma, hígado y riñones, pero no en ce- rebro. Vida media=1 h. Uso: trazado radiactivo. | 4-22 | 76 |

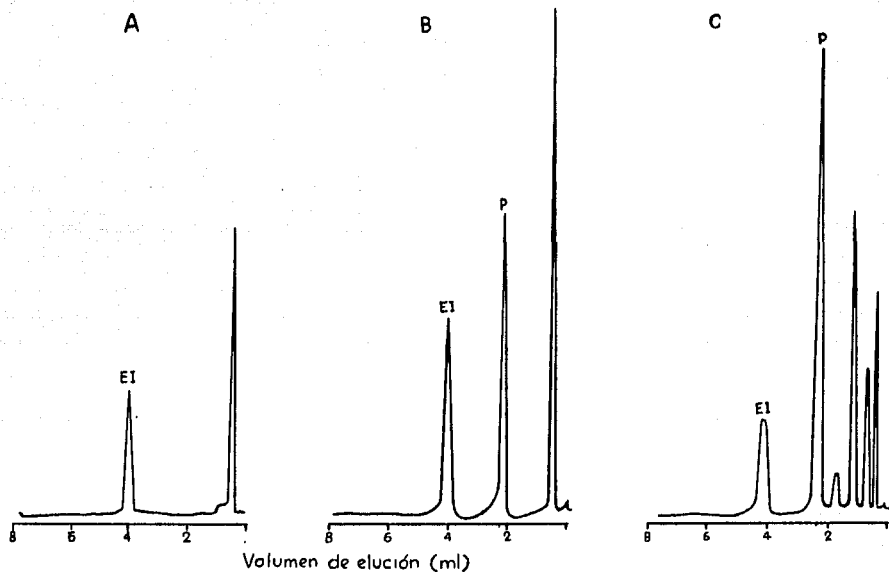


Fig. 4.18 Gráfica obtenida usando el método por CLAR. A -Una solución con estándar interno solo; B -extracto de una muestra como control; C -extracto de una muestra de un paciente con una sobredosis de paracetamol; P -paracetamol; EI -estándar interno (n-propionil-p-aminofenol). Picos que aparecen sin marcar en C son metabolitos de paracetamol. Buchanan y col. Ref:73

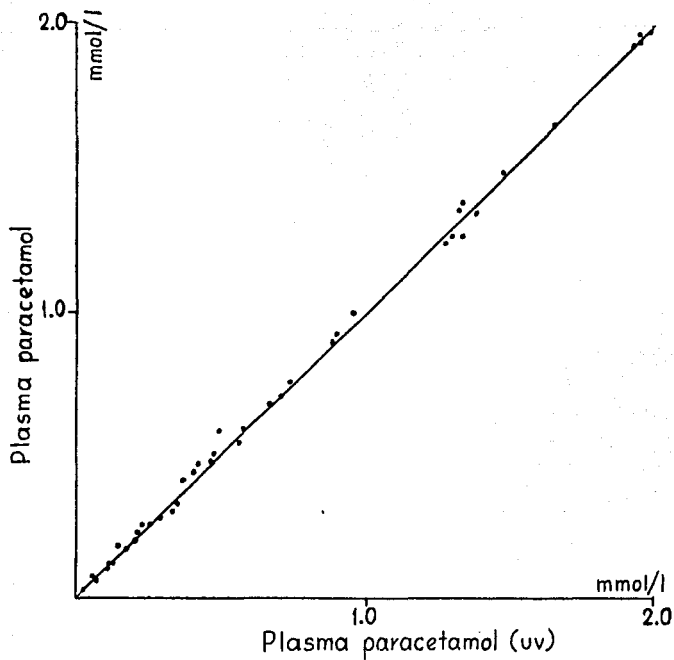


Fig. 4.19 Regresión lineal para los dos métodos CLAR y UV
Buchanan y col. Ref: 73.

El método colorimétrico lleva a una falsa vida media en plasma a concentración $50 \mu\text{g/ml}$. La CLAR es más específica. Variación entre ambos significativa.

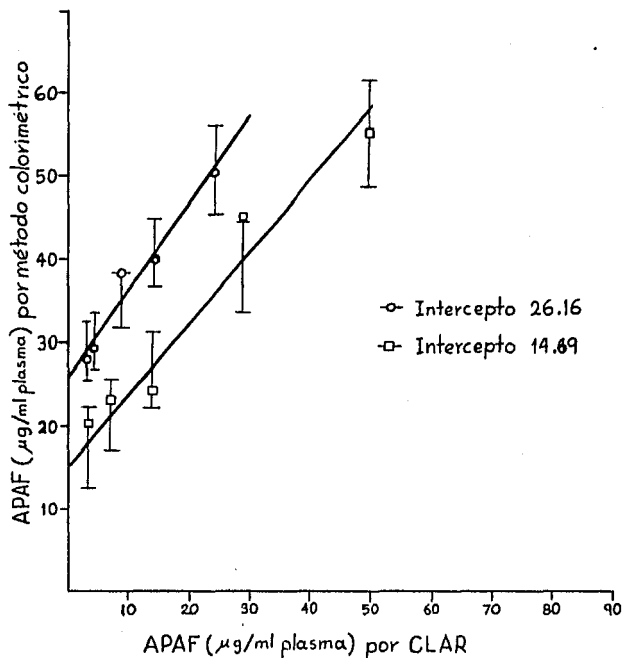


Fig. 4.20 Comparación de los resultados obtenidos de analizar plasma por CLAR para acetaminofén (APAF) contra el método colorimétrico. Las muestras de plasma corresponden a dos pacientes A (-○-) y B (-■-). Cromóforo: ácido nitroso.

Según Duffy y Bybers, Ref: 74.

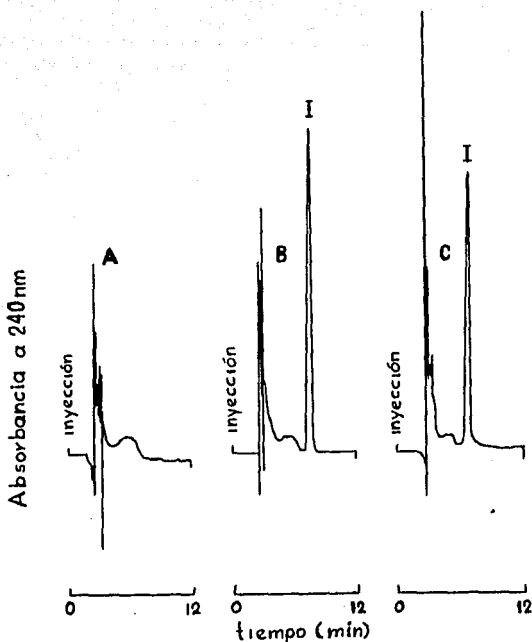


Fig. 4.21 Cromatogramas de un paciente típico con medicación de acetaminofén. (A) muestra de plasma antes de administrar acetaminofén (I). (B) muestra de plasma tomada después de 20 min de la dosificación oral de dos tabletas de 325 mg. (C) muestra de plasma con 40 min después de la dosificación. O'Connell y Zurzola, Ref: 75.

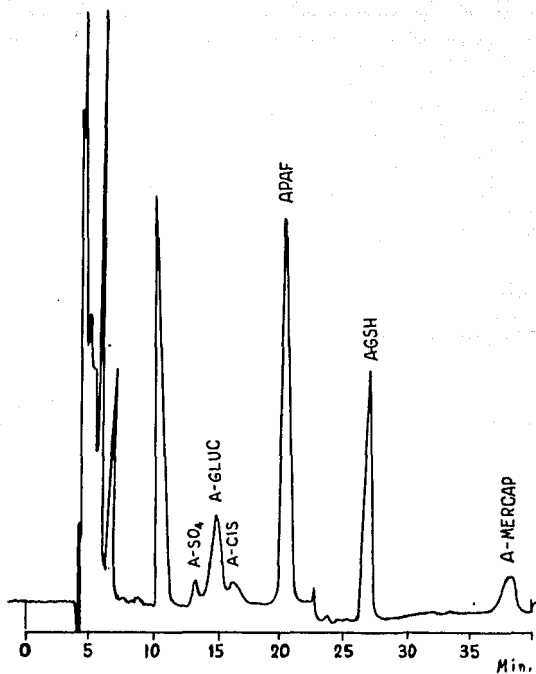


Fig. 4.22 Cromatograma representativo de CLAR de acetaminofén radiactivo (APAF) y sus metabolitos conjugados extraídos de tejido hepático obtenido 2h después de una dosis de 500 mg/kg. Los metabolitos determinados fueron: sulfato conjugado (A-SO₄), ácido glucurónico conjugado (A-GLUC), cisteína conjugado (A-CIS), glutatión conjugado (A-GSH) y ácido mercaptúrico conjugado (A-MERCAP). Fischer y col. Ref: 76.

| COLUMNA | DET. | E.I.COMC. | EXTRACTANTE | FASE MOVIL | RESULTADOS | FIG. | REF. |
|--|--|--|--|---|---|--------------|------|
| Spherisorb ODS (5 μ m), 0.46 x 25 cm. t.amb. Monitoreo de - niveles plasma- ticos. | UV 254 nm | N-propionil p-aminofenol 1 μ g/ml (4 $^{\circ}$ C) en EtOH | MeCN, EtOH. Evap. a 40 $^{\circ}$ C con N ₂ . - Inyector o ínte- rador automat. | MeOH/H ₂ O:1/3 ml/min (150 atm). | Tr=5.44 min. Lim. detección: 8 ng/mL, CV \leq 3.8%, n=6-11. Recup: 99.8-101.5% Uso: neonatos, bio-diap. sobredosis. | 4.23 | 77 |
| μ Bondapak C ₁₈ (10 μ m) 4 x 300 mm. Método ultramicro, - inyección di- recta. | UV 254 nm W440 | B-hidroxitou- filina:100 μ g/ml de NaCl 1N. Iny: 7120 (Rhodine). | No se usa, solo centrifug. sin pre o post colum- nas. Inyec=2 μ L | AcONa 0.01M reg. apH=4; 2ml/min. Bomba mod.110 | Tr=5.1 min. Linealidad: 0-100 μ g/ml. Uso: rápido, simple, est. tóxico cardíaco, pediat- ría. | 4.24 | 78 |
| LiChrosorb Rp8 (10 μ m) 4.6x250 mm, t=40 $^{\circ}$ C Cromat:SP8000 | UV 254 nm | 3-acetamidofe- nol (Aldrich) 50 μ g/ml en MeOH. Inyección: 10 μ l. | AcOEt, evap: 60 $^{\circ}$ C/N ₂ . Reg. 50 μ g/ml en MeOH. Inyección: 10 μ l. | H ₂ O/MeCN:94/ 6; 2ml/min. | Tr=5.1 min. Linealidad: 0-20 μ g/ml, CV=1.7-6.2%. n=6. Uso: rutina a bajas concs. | 4.25 4.26 | 79 |
| μ Bondapak C ₁₈ 3.9x300 mm. Proc. aut: WISP 710B (100 muestr/24h) | UV 254 nm W440 | 2-acetamidofe- nol, 10 μ g: ml. | AcOEt, evap. 45 $^{\circ}$ C/vacío. Inyección: 10- 20 μ l. | a) MeCN/regul AcO 13.5/96.5 b) MeCN/MeOH/ H ₂ O: 6/6/88. 1.8-2.2ml/min | Sensibil: 0.1 μ g/ml. Linealidad: 0.25-15 μ g/ml, CV < 5%. Uso: est. farmacocinéticos; sobredosis. | 4.27 | 80 |
| Pellidon 37,4 m (poliamida pelicu- lar) 2.6 mmx50 cm. | Elec 0.7V C/pt/ HgCl ₂ | p-butoxifenol 5 μ g/ml de MeOH. | AcOEt/reg. pH 7.4, evap. 40 $^{\circ}$ C/vacío In- yección=3 μ l. | MeOH/NaH ₂ -- PO ₄ 0.04M, pH = 7.4); 5/95, 1 ml/min. | Tr=2 min. Sensibil: 0.2 μ g/ml. Uso: biodiapo- nibilidad de 3 formula- ciones. | 4.28 | 81 |

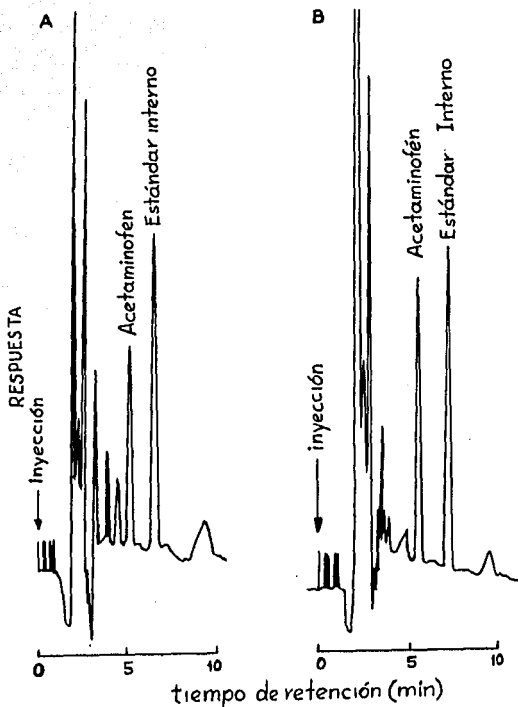


Fig. 4.23. Cromatograma de líquidos de alta resolución de un extracto de plasma humano. (A) plasma con fármaco libre al que se adicionó acetaminofén ($1\mu\text{g/ml}$) y (B) plasma obtenido de un paciente 9 h después de una dosificación de acetaminofén de 325 mg que fue dada a las 0 y 6 horas. Técnica: Korduba y Petruzzi, Ref: 77.

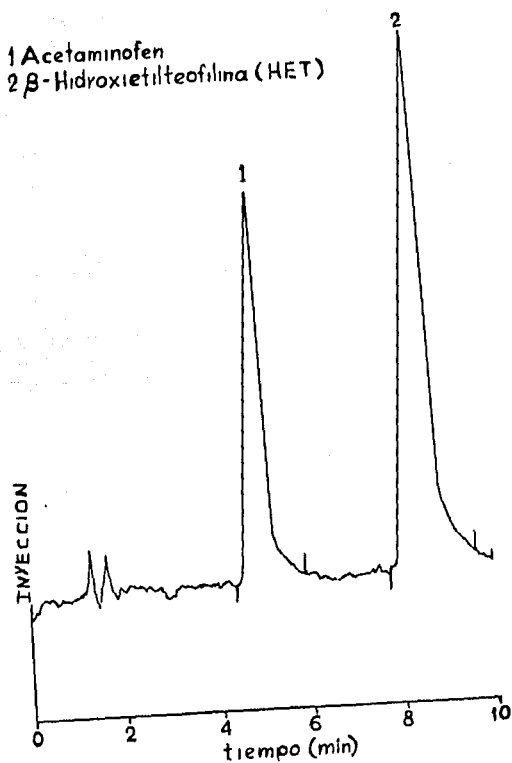


Fig. 4.24. Cromatograma de acetaminofén y β -hidroxi-etil-teofilina.
Aplicación: suero o plasma. Método ultramicro de inyección directa e integración aut. (Hewlett Packard mod. 3380 A).
Manno y col. Ref: 78.

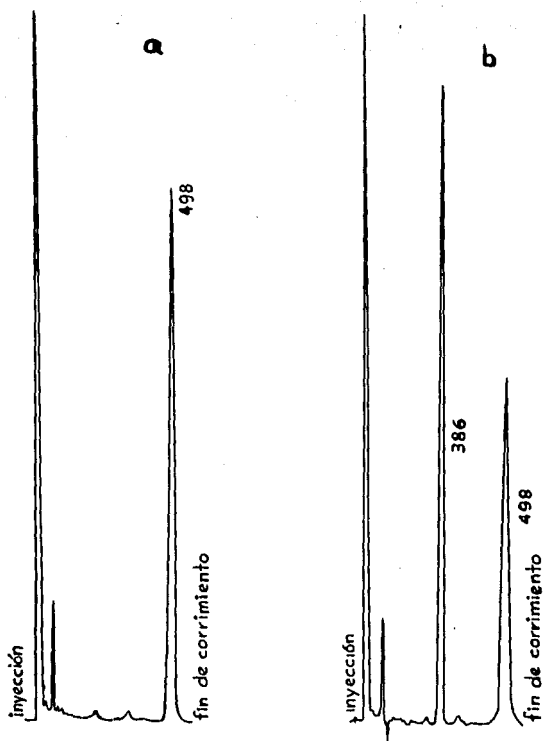


Fig. 4.25 Determinación por CLAR de paracetamol en plasma. (a) muestra de plasma conteniendo sólo estándar interno como blanco; (b) muestra de plasma estándar conteniendo paracetamol ($20\mu\text{g/ml}$) y estándar interno. Tiempo en segundos. Método rápido para análisis de rutina (con $\pm 0.2\mu\text{g/ml}$); Lo y Bye, Ref: 79.

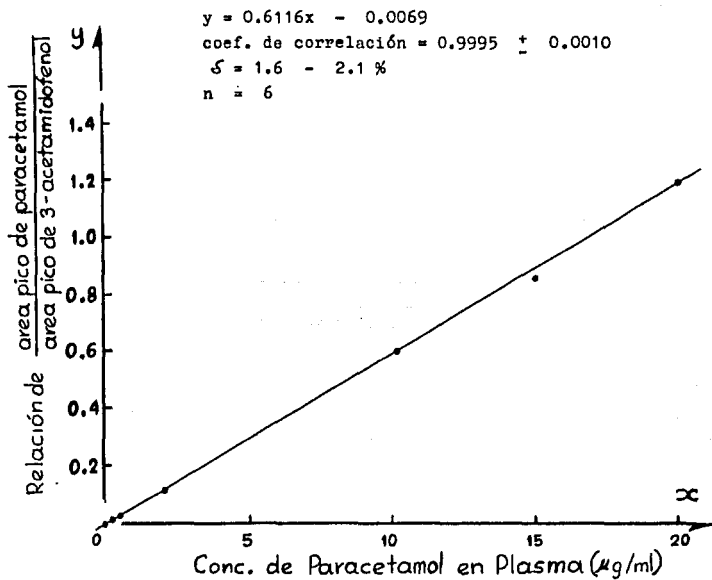


Fig. 4.26 Gráfica de calibración de paracetamol en plasma.
 Regresión lineal por mínimos cuadrados.
 Método rápido de rutina; Lo y Bye, Ref: 79.

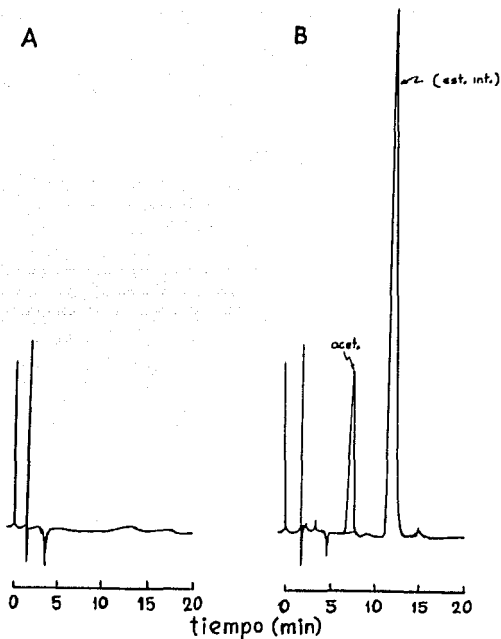


Fig. 4.27 Cromatogramas de un extracto plasmático de un paciente. (A) antes de la administración de acetaminofén; (B) 2.5 h después de una sólo dosis intravenosa de acetaminofén. Se señalan los picos correspondientes a acetaminofén (acet.) y estándar interno (est. int.) (2-acetaminofenol). Vida media $t_{1/2}$: 2.6 h, oral: 2.5 h. Método automatizado de Ammer y col. Ref: 80.

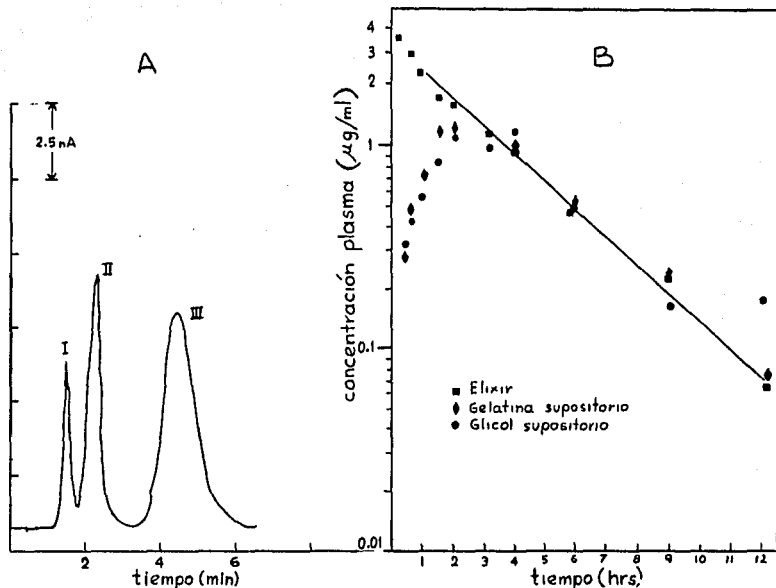


Fig. 4.28 A: Cromatograma típico para acetaminofén (II) y p-butoxifenol (EI), III • I = frente del solvente. B: Concentraciones promedio de II después de administrar 300 mg con: jarabe, supositorio base glicol o supositorio con gelatina encapsulada. Línea de la derecha = eliminación de acetaminofén, vida media = 2.2 h, según Muhson y col. Ref: 81.

| COLUMNA | DET. | E.I. CONC. | EXTRACTANTE | FASE MOVIL | RESULTADOS | FIG. | REF. |
|---|---------------------------|---------------------------------|---|---|---|--------------|----------|
| Spherisorb SI-5 4mm. 4.6 x 250 mm. Modificación del método de - Fletcherick | UV 248 nm Varian | 3-acetamido- fenol, 1-10mg/l | AcOEt, evap, 45°C/N ₂ Muestreo aut. Iny=25 µl. (Waters 710B) | H ₂ O (sat. con CHCl ₃ /C ₇ H ₁₆ / EtOH/AcOH: 225/700/75/1, 1,6 ml/min. | Aumento de sensibilidad dad=10 veces (0.05 µg/ml) Integr. out. (SP4100) Ir=8.8 min. Linealidad=0-50 µg/ml. Uso: farmacocinética. | 4.29 4.30 | 55 82 |

4.4. DETERMINACION EN ORINA, TABLA 4.4.

| COLUMNA | DET. | E.I. CONC. | EXTRAENTE | FASE MOVIL | RESULTADOS | FIG. | REF. |
|---|-----------------|---|------------------------------------|---|---|--------|------|
| FIQU. Acetami- nofén (APAF), - ác. salicílico y ác. salicílico. | UV 237 nm | Ingestión-650 mg de: Dh, aspi- rina; lh, ace- taminofén. | AcOEt. Inyec= 20 µl. | MeCN/regul. de fosfatos 4mM: 6/94, pH=5.7 | Estimación cuantitati- va de los 3 compuestos en orina y plasma. | d.n.i. | 83 |
| FIQU C ₁₈ . Fenaco- tina y metabolitos | UV 254 nm | 4-fluorofenol | d.n.i. | MeOH/KH ₂ PO ₄ 0.1M/AcOH(1%) | Límite detectable=20ng (señal/ruido \leq 2) orina y plasma. | d.n.i. | 84 |
| Nucleosil C ₁₈ - APAF, aspirina, - fenacetina y sus metabolitos | Elec +1.4V | d.n.i. | pH: factor más importan- te. | MeOH/H ₂ O: 1/1 | Menor interferencia para salicilatos con UV=313nm en orina y suero. | d.n.i. | 85 |
| Biophase DDS-5 4mm. 4.6x250 mm. | Elec +1.1V | no requerido, comparación de | no requerido, dilución x 10 | MeOH/AcONa 0.1M: 3.5/96.5 | Ir=24.4 min. Límites de detección = | 4.31 | 86 |

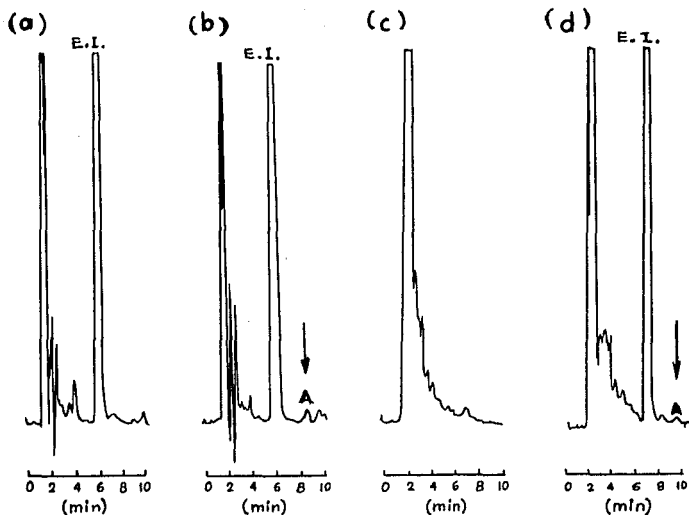


Fig. 4.29 Cromatogramas de un paciente (a): antes de dosificación. (b) 13 h después de la 2ª. dosis (cada seis horas) de 650 mg de acetaminofén (A), conc. = $0.17 \mu\text{g/ml}$. (c): plasma blanco sin estándar interno y (d): A estándar con una concentración de $0.02 \mu\text{g/ml}$. Buskin y col. Ref: 32.

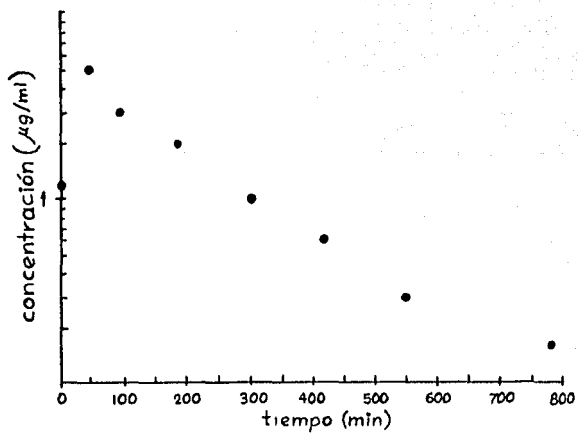


Fig. 4.30 Curso seguido por las concentraciones de acetaminofón en plasma. Dosis: 650 mg cada 6 h. No se efectuó la regresión lineal por mínimos cuadrados. Buskin y col. Ref: 82.

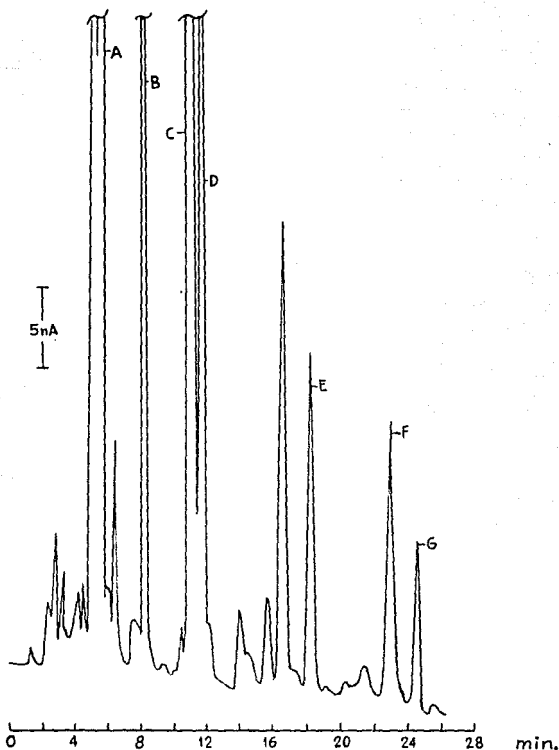


Fig. 4.31 Cromatograma de los metabolitos de paracetamol en orina. Fase móvil: metanol al 3.5% (V:V) en acetato de sodio 0.1M a pH = 4.0. Potencial del detector: ± 1.1 V. La muestra de orina se diluyó a un factor de 200 en acetato de sodio 0.1M, pH = 4.0 y 20 μ l de la solución resultante se inyectó. (A) Paracetamol-O-glucurónico, (B) Paracetamol-3(O)-SO₂, (C) Paracetamol-4(O)-SO₂, (D) 3-metoxi-paracetamol-O-glucurónico (E) 3-metoxi-paracetamol-O-SO₂, (F) 3(S)-cisteinil-paracetamol, (G) Paracetamol.
Hamilton y Kissinger, ref: 86.

| COLUMNA | DET. | E.I. CONC. | EXTRACTANTE | FASE MOVIL | RESULTADOS | FIG. | REF. |
|--|---|---|--|--|---|------------------------------|----------|
| Cromat: LC-154 (BSW Lafayette) | C/Ag/ AgCl | óreas Vs APAF estándar. | en sol. reg. y c.c.f. previa Iny. directa = 20 μ l. | (pH=4,0), 0.95 ml/min. | 100 pg (0.1 ng). $\sigma = 0.5-3\%$. | | |
| μ Bondapak C ₁₈ (10 μ m), 2.2x500 mm, t. neb. Cromat. Varian 4100, integr. aut. | UV 247 nm | no requerido exactitud con parada Va con- teo radioactivo pico (Shahidi) con [¹⁴ C] APAF. | Et ₂ O(n=2)/reg. fosf. 1M pH=7.4. Evap.t.amb/N ₂ . Inyec=2 μ l. | THF/CHCl ₃ / AcOH(5% en - MeOH):90/10/ 0.04, 0.67ml/ min(68 atm). | Tr=3.0 min. 11m. detecc=1 μ g/ml. $\sigma < 4\%$. CV(US Shahidi) < 6%. Uso ensayo simple, completo, sin E.I. -- Orina y plasma. | 4.32 4.33 | 87 88 |
| μ Bondapak C ₁₈ (10 μ m), 4.6x300 mm. Registrador LC-4, Integr. aut. H. Packard. Elec: RC-1, C=1L-3. | UV 248 nm Elec +0.6V C/Ag/ AgCl | no requerido hidrólisis en- zimática (β - glucuronidasa- sulfatasa) | no requerido, dilución con regul. pH=5.0 deacetato 2M Inyec=10-20 μ l. | MeOH/KH ₂ PO ₄ 0.1M/AcOH: 7/92.25/0.75, 2ml/min (113 atm) | Mejor selectividad y sensibilidad: 1 ng (UV), 0.1 ng (E- lec). Uso: metabolitos 3(0) conjugados, hepa- tóxicos. | 4.34 | 89 |
| FIQU: ODS y ODS/ TMS (<HEIP, >h). Efecto de deter- gentes cutidínicos y aniúnicos+KNO ₃ | UV 254 nm | no requerido verificación de identidad por E.M. | no requerido, inyección di- recta=1-5 μ l. | H ₂ O/KcOH/ HCO ₂ H: 86/14/ 0.1. | Uso: terapéutica y sobredosis. Metaboli- tos hepatotóxicos. | 4.35 4.36 4.37 4.38 | 90 91 |
| FIQU: ODS(5 μ m) 4.5x250 mm. Cro- mat. Beckman, - Orina y plasma. | UV 254 nm B160 | teofilina 20 mg/l en HClO ₄ al 6% | dilución con H ₂ O y E.I. In- yec=5 μ l. (B-210) | Na ₂ SO ₄ 0.05M/ MeCN:93/7 (pH=22, H ₃ PO ₄) 1.5 ml/min. | Tr=5.7 min. CV=2.7-9.0 %. Recup=92.6-100.3%. Uso: rutina, est.farma- cocinética, pediatría. | 4.39 | 92 |

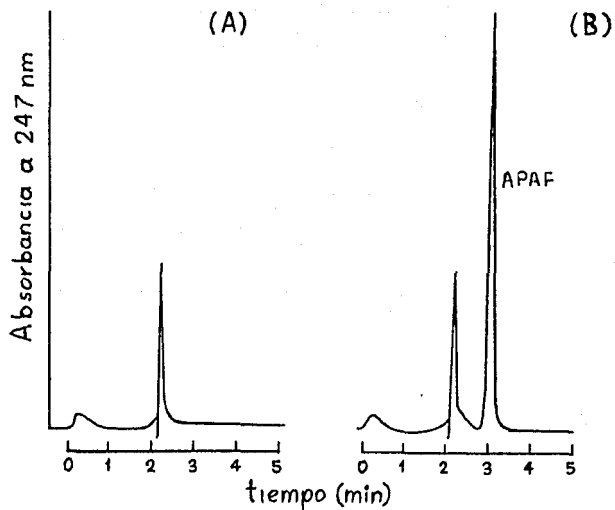


Fig. 4.32 Cromatograma líquido de alta presión de extracto urinario. (A) muestra de orina blanco y (B) orina con una concentración de acetaminofén ($10\mu\text{g/ml}$). Método simple sin E.I. Wong y col. Ref: 87.

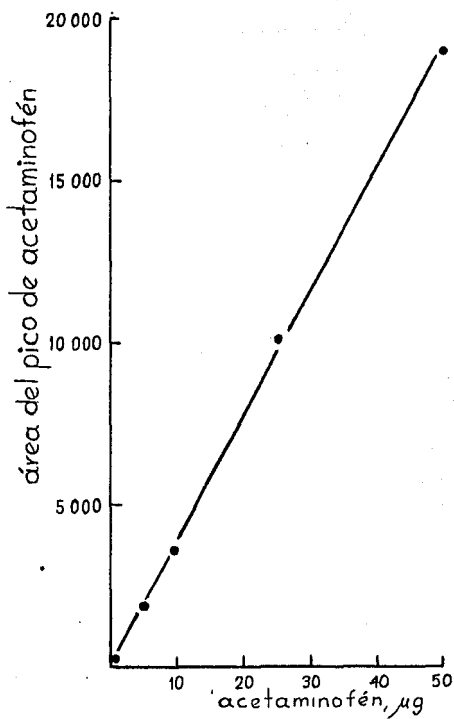


Fig. 4.33 Curva estándar de acetaminofén.

Método simple sin E.I. Wong y col. Ref: 87.

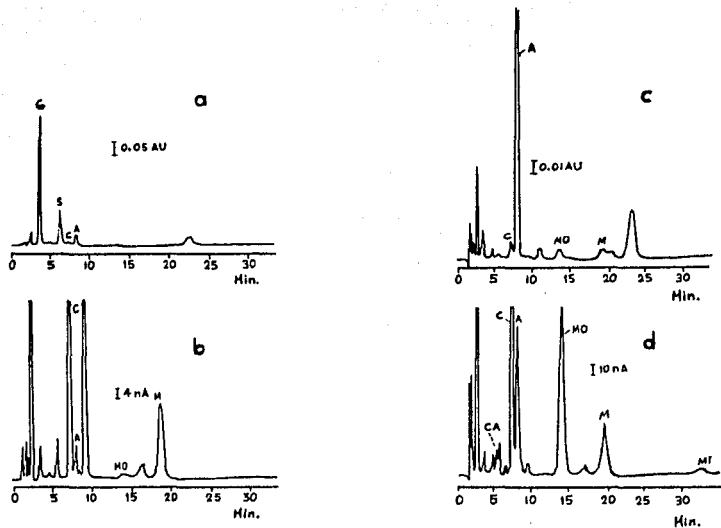


Fig. 4.34 (a) Cromatograma (detección UV, 248 nm) muestra de orina. Se estimaron las cantidades de acetaminofén glucuronido (G), acetaminofén sulfato (S), y acetaminofén libre (A). Conc.: = 304 $\mu\text{g/ml}$, 112 $\mu\text{g/ml}$, y 23 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. (b) Cromatograma (detección electroquímica + 0.55 V) con la presencia de cisteína conjugada (C), a acetaminofén libre (A), metoxiacetaminofén libre (MO) y acetaminofén-3-mercapturato (M). (c) Cromatograma (detección UV, 248 nm) muestra con hidrólisis de β -glucuronidasa sulfatasa. (d) Cromatograma (detección electroquímica + 0.55 V. Se encontró: 3-hidroxiacetaminofén (CA, 0.43 $\mu\text{g/ml}$), 3-cisteinilacetaminofén (C, 30 $\mu\text{g/ml}$), acetaminofén (A, > 400 $\mu\text{g/ml}$), 3-metiltioacetaminofén (MT, 11 $\mu\text{g/ml}$), 3-metoxiacetaminofén (MO, 78 $\mu\text{g/ml}$), acetaminofén-3-mercapturato (M, ca. 91 $\mu\text{g/ml}$). Wilson y col. Ref: 89

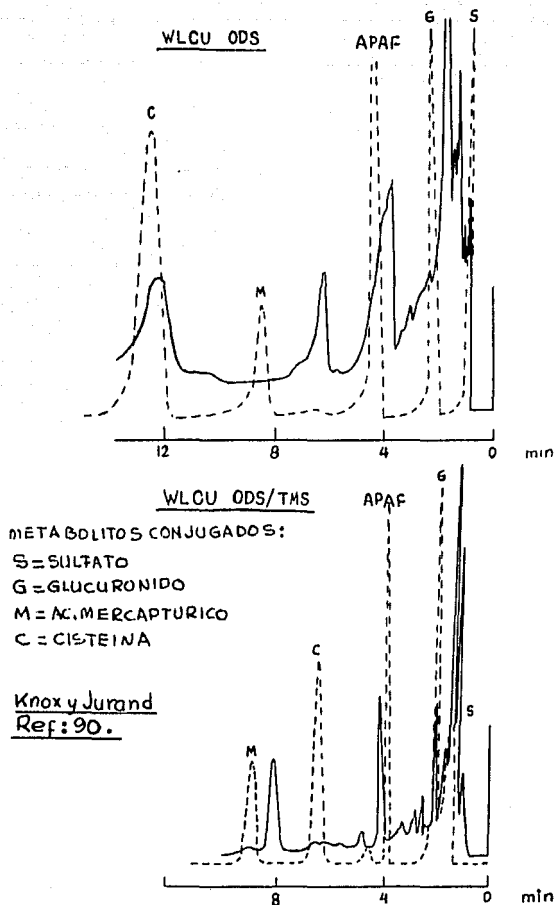


Fig. 4.35. Cromatogramas comparativos de muestras de orina normal usando silicas ODS/TMS y ODS (WLCU). Eluente: **agua**-metanol-ácido fórmico (86:14:0.1, v/v/v). Las líneas punteadas muestran los cromatogramas estándares.

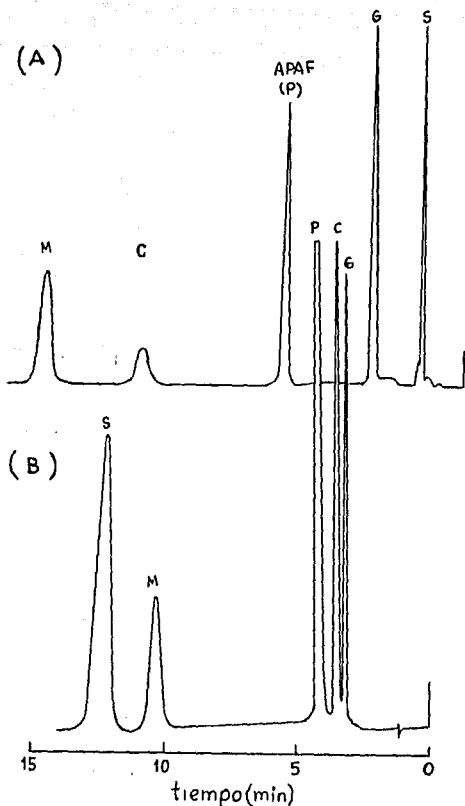


Fig. 4.36 : (A) Separación de una mezcla estándar de: S, P, G, C, y M por cromatografía de fase inversa sobre sílica ODS/TMS, usando como eluyente agua-metanol-ácido fórmico (86:14:0.1 v/v/v). (B) Separación por un detergente cromatográfico usando el mismo eluyente conteniendo 0.7 mg/l de dioctilamónio (DOA) y 3 g/l de KNO_3 . Detector UV, 242 nm. Knox y Jurand, ref: 91.

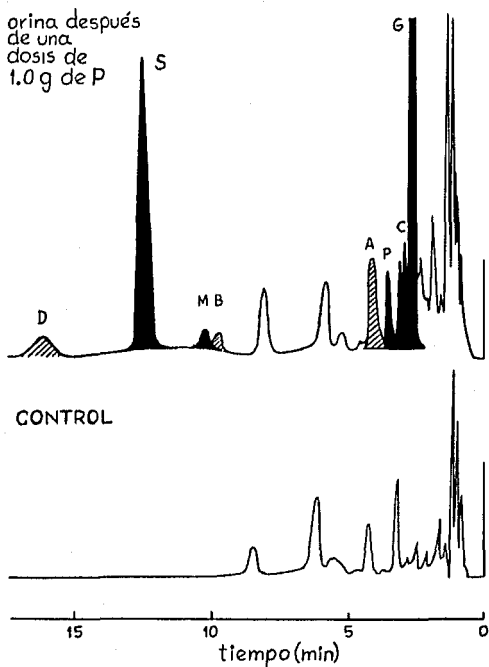


Fig. 4.37 Cromatograma de una muestra de orina tomada 4.5 h después de una dosis terapéutica de 1.0 g de paracetamol. El eluente estándar contiene 0.7 mg/l de DOA y 2.5 g/l de KNO_3 . Empaque de la columna, ODS/TMS sílica. Se inyectó 2.0 μl de orina. Detector: UV, 249 nm, 0.1 a.u.f.s. Los principales metabolitos se muestran de negro. A = 3-metoxiAPAP, B = 3-metoxi-mercaptúrico, D = metabolito sin identificar.

Knox y Jurand, Ref: 91.

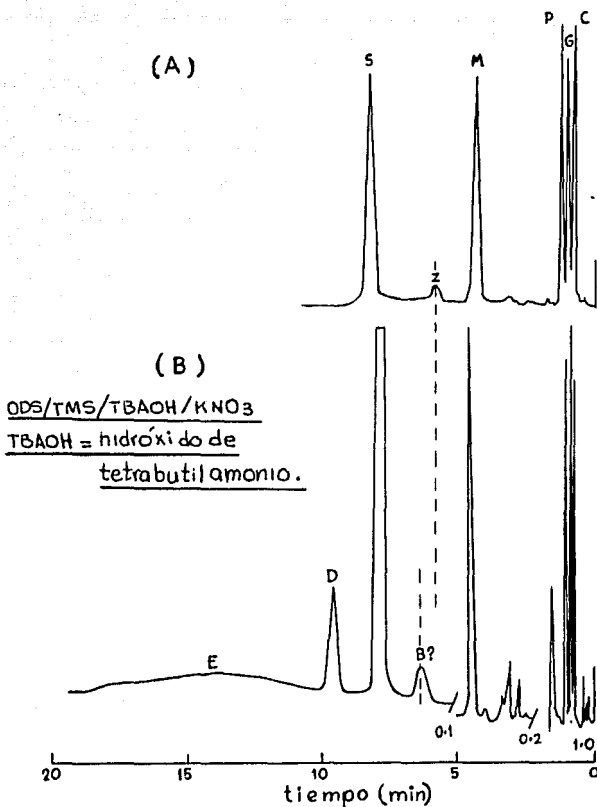


Fig. 4.38 Cromatogramas de una muestra de orina (B) y del estándar (A), tomados después de una severa sobredosis de paracetamol. Empaque de la columna silica ODS/TMS. Eluente estándar contiene 140 mg/l de TBAOH y 550 mg/l de KNO_3 . Detector: UV, 242 nm, sensibilidad ya antes marcada.

Knox y Jurand, Ref: 91.

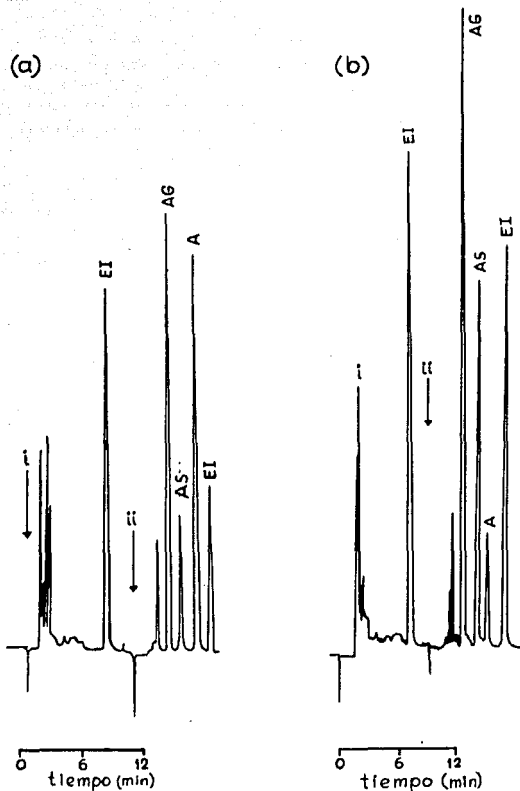


Fig. 4.39 (a) Cromatograma de acetaminofén (A) y sus metabolitos, acetaminofén-glucurónico (AG) y acetaminofén-sulfato (AS) en plasma de rata. (i) plasma blanco de rata conteniendo estándar interno (EI), teofilina; (ii) plasma de rata 2h después de una inyección intravenosa de 100 mg/kg de acetaminofén. (b) Cromatograma de A, AG, AS y EI en muestra de orina de rata, diluida 1 a 10 v. (i) muestra de orina blanco de rata. (ii) colección de orina de 24 h de rata. Jung y Zafar, ref.: 92.

| COLUMNA | DET. | E.I. CONC. | EXTRACTANTE | FASE MOVIL | RESULTADOS | FIG. | REF. |
|--|---------------------------------|--|---|---|--|--------------------------------------|----------|
| a) y b) μ Bondapak C ₁₈ (10 μ m), 3.9x300 mm, c) Rad-Pak A, 10 μ m, 8x100 mm, compr. radial (RCH), Cromat: Spectra-Phy sica 3500B | UV 254 nm M440 dual | no requerido, verificación por adición de los fármacos mismos. | no requerido, inyección directa. Inyector U6K (Waters). | a) supresión: H ₂ O -AcOH/MeOH/AcDEE: 90/15/0.1. b) par-tónicos: H ₂ O MeOH/TBA/C ₂ HCl ₃ /EDTA. c) a y b modifica-dos. | Estudio del metabo-lismo de APAF por: supresión de iones (a) para fármacos libres. Par iónico (b) metabolitos. Co-lumnas radiales (c) mejoramiento de ambos a) y b). | 4.40 4.41 4.42 4.43 4.44 | 93 94 |

4.5 DETERMINACION EN OTROS FLUIDOS BIOLÓGICOS, TABLA 4.5

| COLUMNA | DET. | E.I. CONC. | EXTRACTANTE | FASE MOVIL | RESULTADOS | FIG. | REF. |
|---|--------------------------------|--|--|--|--|--------|------|
| FIQU:C ₁₈ flui-do cerebro espi-nal | Elec. 0.75V | no requerido | no requerido, dilución e inyección direc-ta. | MeOH/K ₂ HPO ₄ / Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ * | cuantificación: 9-150 ng/ml. Uso: farmacocinetica del S.N.C. | d.n.i. | 95 |
| ccf de alta resp-lución. fluido: saliva. | UV 250 nm | d.n.i. | CHCl ₃ , (NH ₄) ₂ SO ₄ -H ₂ SO ₄ . Evap. c.vacio. | HCO ₂ H/C ₂ H ₄ Cl ₂ : 1/10. | Recuperación alta: 0.25-5 μ g/ml. Uso: terapéutico, biodis-ponibilidad. | d.n.i. | 96 |
| DOS-2/Partiail Pxo 10/25 (What-man, 4.6x250mm. Cromat: Allex - 100A. Mezcla de fárma-cos. | UV 275 nm Pye- LC3 | APAF=cafeína= 0.2mg/ml; fena-cetina=0.5mg/ml aspirina= ml ac salicílico= 1 mg/ml, en la fase móvil | no requerido dilución e inyección directa 20 μ l. Iny. Rheodyne 7120. | MeCN/AcOH/H ₂ O 25/5/70. 1.0 ml/min (109 atm) 5/5-1. MeCN/AcOH: 95/5=5/5-2 | MeOH/H ₂ O: 3/7 es si-milar a 5/5-1. MeOH 100% \approx 5/5-2 pero causa ensanchiamen-to. Uso: efectos del disolvente y selec-ción de E.I. | 4.45 | 97 |

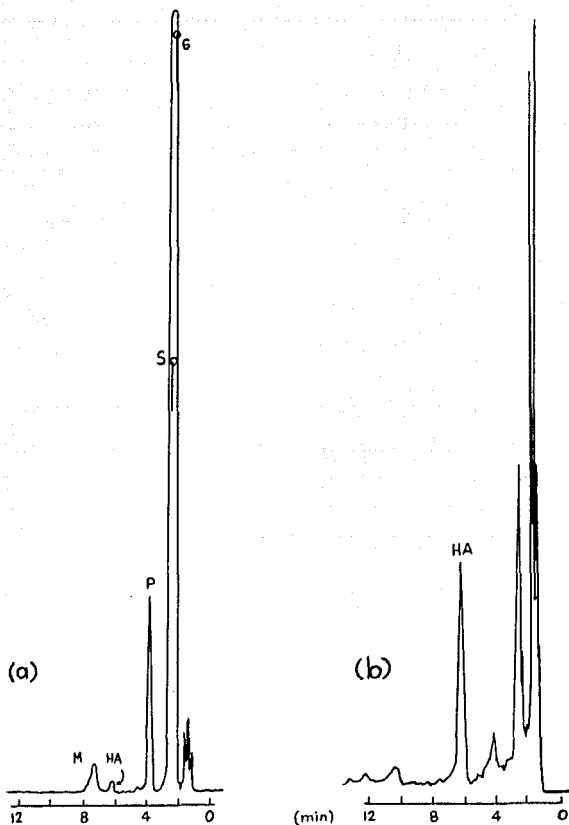


Fig. 4.40 CLAR por supresión de iones de (a) los metabolitos de para cetamol en orina de rata y (b) muestra control de orina de rata. Eluente: ácido acético acuoso metanol-acetato de etilo (90:15:0.1). Detector UV, 254 nm, 1.0 a.u.f.s.. El pico HA es un constituyente endógeno de orina: ácido hipúrico. Hart y col. Ref.: 93.

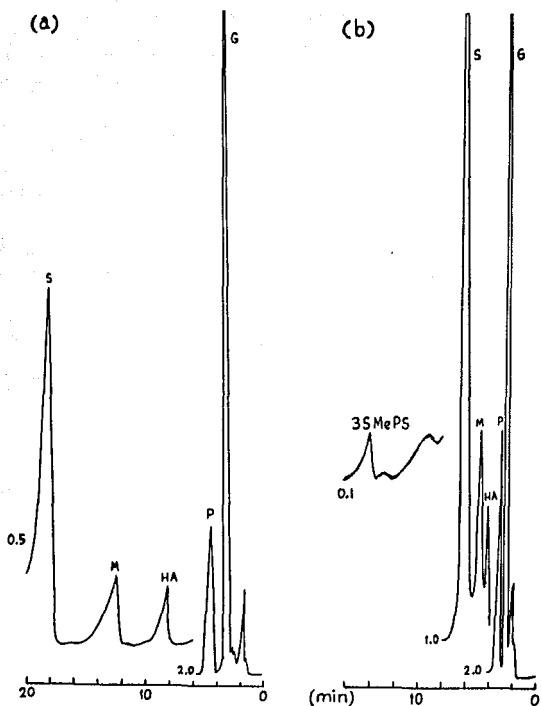


Fig. 4.41 Cromatograma isocrático de CLAR por par iónico de los meta**bolitos** de paracetamol. Eluente (a) metanol 10% y (b) metanol 20% en reactivo estándar par iónico, por ejemplo: TBA 0.005M-Tris 0.01M-EDTA 0.005M amortiguado a pH= 7.2 con ácido fosfórico, Detector UV, 254 nm. Hart y col. Ref:93

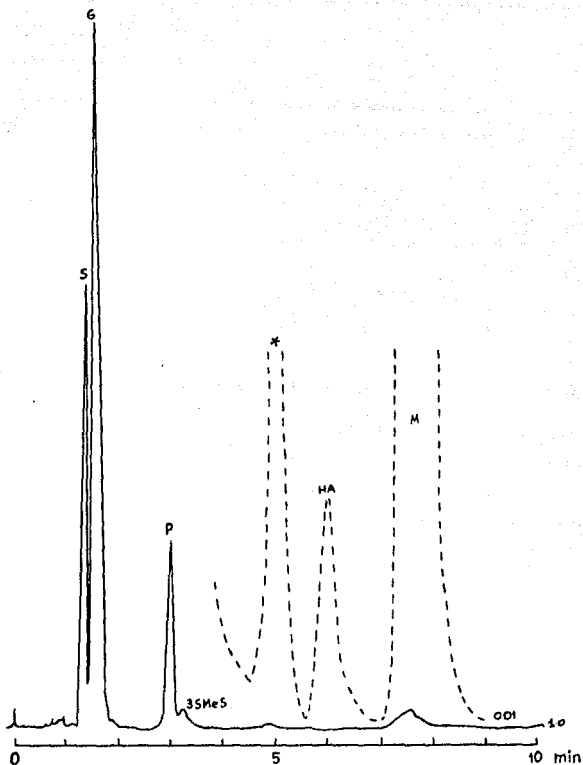


Fig. 4.42 CLAR por supresión iónica de los metabolitos de paracetamol sobre RAD-PAK A. Eluyente: metanol al 15% en un regulador de fosfatos 0.05M, a pH=2.3, 4ml/min. Detector a 254 nm, dos sensibilidades. Picos: S = paracetamol sulfato; G = paracetamol glucurónico; P = paracetamol; 35MeS = 3-tiometilparacetamol sulfato; HA = ácido hipúrico; M = paracetamol ácido mercaptúrico (*) pico compuesto de una mezcla de sulfóxido de 3-tiometilparacetamol y otros metabolitos, subsecuentemente identificados. Hart y col. Ref: 94.

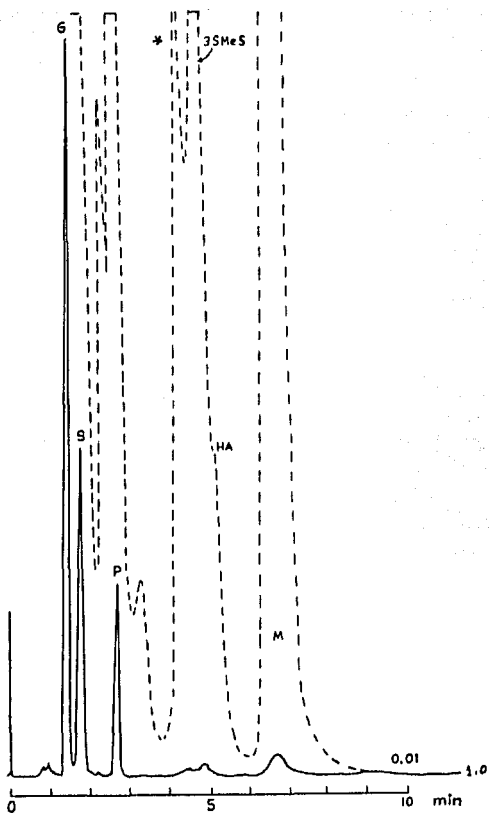


Fig. 4.43 Cromatograma que muestra el efecto de trietilamina (TEA) 0.005M sobre la supresión en CL'R para los metabolitos de paraceta mol. Eluente : TEA 0.005M, metanol 15% en un regulador de fosfatos de potasio 0.05M, pH = 2.3, velocidad de flujo 4ml/min, detector a 254 nm, dos sensibilidades. Para la identificación de los picos ver la figura 4.42. Hart y col. Ref: 94.

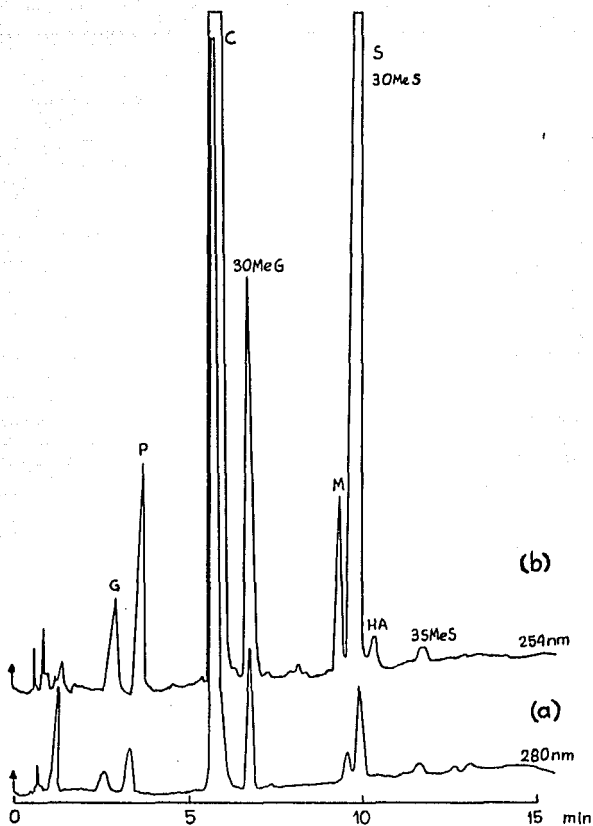


Fig. 4.44 Separación de los metabolitos urinarios de paracetamol. Condiciones: como en la figura 4.43. (a) muestra de orina tomada después de una medicación terapéutica de 1 g de paracetamol en un adulto sano. (b) muestra de orina tomada después de una sobre dosis grave de paracetamol. Se nota la alta concentración de derivados de 3-metoxiparacetamol en relación a M. Hart y col. Ref: 94

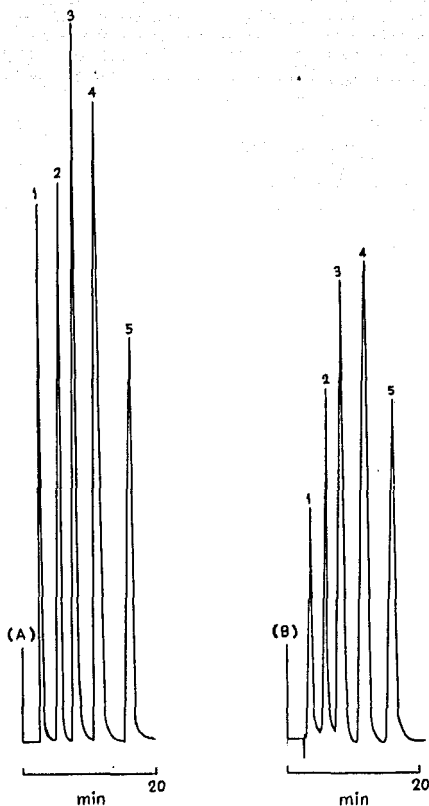


Fig. 4.45 Cromatogramas de una mezcla de paracetamol (1), cafeína (2), Aspirina (3), ácido salicílico (4) y fenacetina (5). El primer cromatograma (A) muestra la gráfica obtenida usando una fase móvil: acetonitrilo al 25% en ácido acético (5% en agua). La segunda gráfica (B) es para una mezcla de composición idéntica separada en acetonitrilo-ácido acético (95:5). William y col. Ref: 97.

CAPITULO 5

DISCUSION

El acetaminofén es el metabolito mayoritario de la fenacetina, ambos derivan del p-aminofenol.

Es un compuesto polar que se absorbe en mayor proporción en el intestino con biotransformación rápida, su vida media y la de sus metabolitos es < 4 horas, cuando es mayor es indicio de daño hepático. Se distribuye en todos los fluidos biológicos, en saliva y plasma llega a alcanzar la misma concentración.

El principal metabolito del p-acetamidofenol es el p-aminofenol productor de metahemoglobinemia pues se transforma en quinonimina y ambos forman un sistema redox en el que el oxígeno oxida a la hemoglobina.

La ingestión de 7-15 g en adelante produce daños hepáticos y renales, el mecanismo de su toxicidad se ha discutido ampliamente y se piensa que el metabolito tóxico es conjugado y detoxificado por glutatión, cuando las fuentes de éste son agotadas el metabolito tóxico se une a los tejidos (2). Para neutralizar los metabolitos tóxicos se ha investigado el tratamiento con grupos -SH, acetilcisteina, Mucomyst, etc.

Los métodos para su cuantificación utilizan gran variedad de técnicas analíticas que incluyen: colorimetría, espectrofotometría, cromatografía manual e instrumental; voltametría, etc.

Los fundamentos y divulgación teórico-práctica sobre cromatografía es muy extensa y variada en CG los parámetros más importantes parecen ser el detector y la columna, en CLAR: la columna y la fase móvil.

En la cromatografía de partición se recomienda para compuestos no polares una fase estacionaria normal (polar) y los compuestos polares se analizan por fase inversa no polar, que para CLAR necesariamente debe ser químicamente unida para evitar el sangrado típico de la CG (22, 24, 27).

En CG la preparación de la muestra es el paso que emplea más tiempo, se usan operaciones previas tales como: precolumna (32, 34), disolventes orgánicos (27, 30, 38) y derivación con hidróxido de trimetilamonio (29, 38), Ac_2O /piridina o N-metilimidazol (36, 37, 39), anhídrido trifluoroacético (30), pentafluorobenzilación (43), O-heptil-N-metilación (46).

Adsorción-desorción/C activado (31), Precipitación de proteínas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ácido sulfotúrgstico (39), etc.

El empaque de mayor incidencia es 3 % de OV-17 sobre chromosorb C o W y como gas portador N_2 con un flujo del orden de 40 ml/min (30, 31, 37, 38, 43).

El detector y estándar interno más usados son el de FID y N-butiril-p-aminofenol respectivamente (30, 33, 34, 37, 43, 46). El detector de captura de electrones es poco usado debido a su costo, mantenimiento y riesgo (uso de elementos radiactivos).

También hay métodos rápidos como el de Ehresman, sin derivación usando un programa de temperaturas de multinivel y la identificación del compuesto por el tiempo de retención relativo al del estándar interno, (41).

Murray y Boobis hacen estudios en tejido hepático por CG mediante un derivado 3,5-bistrifluorometilbenzoilo de paracetamol y espectro de masas usando $^2\text{H}_7$ paracetamol como estándar interno (45).

En cromatografía de líquidos la preparación de la muestra usualmente consiste en una extracción con AcOEt , Et_2O o CH_2Cl_2 su evaporación y secado en un medio inerte y baja temperatura (N_2 , a veces anhidro) se visualiza para evitar oxidación e hidrólisis. El residuo se reconstituye con MeOH o la fase móvil (46, 54, 55, 69, 77, 79, 80, 82).

En algunos casos se adiciona una sal ya sea para saturar la muestra o completar el factor de dilución (53, 59, 60, 87), en otros la inyección es directa previa dilución e incorporación del E.I. (neonatos y pediatría). El MeCN precipita las proteínas plasmáticas en forma similar al Ba(OH)_2 y ZnSO_4 .

La muestra por lo general es pequeña (5 ml máx. de sangre) del orden de 100 μl en los microprocedimientos se llega a requerir tan sólo 5 μl del fluido original (37, 38, 78) sin perder sensibilidad y reproducibilidad.

El factor más importante de la fase móvil se considera el pH (47).

La mayoría de los métodos usa detección UV aunque la electroquímica es más sensible (89), para cuantificar trazas se usan fármacos marcados para dosificación y compuestos no marcados como E.I. (69).

Algunos métodos sencillos sin extracción al ser comparados con CLAR muestran un error positivo de 40-700% (98), estos métodos inespecíficos no deben usarse para la determinación de paracetamol, sobre todo cuando se requiere una terapia en casos de envenenamiento.

Otras contribuciones para mejorar la determinación de acetaminofén incluyen: programación por gradiente de la fase móvil (93) uso de columnas radiales (94) y recientemente un método de bombardeo atómico rápido (FAB), (99).

COMPARANDO LOS INTERVALOS DE RESPUESTA LINEAL Y LA SENSIBILIDAD DE LOS METODOS REVISADOS, DESTACAN LAS SIGUIENTES TECNICAS:

TABLA 5.1 RESUMEN COMPARATIVO.

| FLUIDO | TECNICA | LINEALIDAD ($\mu\text{g}/\text{l}$) | LIMITE DE DETECCION ($\mu\text{g}/\text{l}$) | MUESTRA (μl) | Tr (min) | REF. |
|---------------------------------|---------|--|--|------------------------------|-------------|-------|
| SUERO | CG | 7.5-605 | 7.5 | 1 | 1.9 | 30 |
| | CLAR | 1 - 400 | ≤ 1 | 5 - 10 | - | 50 |
| | | 3×10^{-6} - 2×10^{-2} | trazas | - | 6.0 | 60 |
| PLASMA | CG | 10-400 | 10 | 5 | 1.5 | 37 |
| | CLAR | 0 - 100 | Ultramicro | 2 | 5.1 | 78 |
| | | 0.002 - 0.2 | Trazas | - | - | 71 |
| ORINA | CG | 50 - 1000 | 0.1 | - | 2.4 | 43 |
| | CLAR | 0.001 - 10 | 1×10^{-6} | 2 | 3.0 | 87,88 |
| SALIVA | CG | 05-100 | 0.5 | 1 | 4.9 | 46 |
| | CLAR | 0.25 - 5 | 0.5 | 2 | 3.6 | 96 |
| SANGRE | CLAR | 0.1 - 5000 | 0.05 | 10 | 4.0 | 69 |
| FLUIDO CF REBRO-ES- PINAL | | 0.009 - 015 | Trazas | 5 | 3.8 | 95 |

CAPITULO 7

C O N C L U S I O N E S

Se cumplieron los objetivos planteados.

La inocuidad del acetaminofén es discutible, es necesario que se estudie con más detalle.

Sus reacciones metabólicas ocurren en la posición tres de la molécula.

El paracetamol combinado con otros compuestos puede tener con secuencias mortales en especial con fenacetina produce necrosis hepática. La determinación de p-acetamidofenol en plasma ayuda a detectarla.

Los metabolitos de interés en sobredosis urinaria son: 3-hidroxiacetaminofén y 3-metoxiacetaminofén por ser hepatotóxicos.

La CG se usa en menor proporción para la detección de este analgésico.

La CLAR es a la fecha el método analítico más eficaz para cuantificar acetaminofén y fármacos comunes en fluidos biológicos a concentraciones terapéuticas y tóxicas.

La adaptación de detectores sensibles y la adición de columnas con alta resolución han convertido a la CLAR en un método altamente sensible, sofisticado y reproducible, aún susceptible de optimización.

Este método como todas las técnicas instrumentales modernas es costoso, su uso empieza apenas a difundirse.

Todas las técnicas presentadas constituyen alternativas viables de aplicación, según equipo disponible y necesidades en un momento dado.

Por su precisión, sensibilidad e intervalo de concentraciones aplicativas, se recomiendan las siguientes técnicas como las mejores; mismas cuyo uso final requeriría necesariamente su verificación experimental previa:

| <u>FLUIDO</u> | <u>TECNICA</u> | <u>AUTORES</u> | <u>REF. BIBL.</u> |
|---------------------|----------------|-------------------|-------------------|
| Suero | CLAR | Rosano y Cols. | 50 |
| Plasma | CLAR | Manno y Col. | 78 |
| Orina | CG | Chan y McCann | 43 |
| Saliva | CG | Dechtiaruk y Col. | 46 |
| Sangre | CLAR | Pang y Col. | 69 |
| Cerebro- espinal | CLAR | Walsh y Cols. | 55 |

BIBLIOGRAFIA

- 1) Goodman L. S. and Gilman A.- The Pharmacological Basis of Therapeutics. 4th. Ed. The-Mac Millan Co, U.S.A. 1970.
- 2) Meyers F. H. et al.- Farmacología clínica 3a. ed. Editorial El Manual Moderno S.A. México, 1977,
b) Idem; 5a. ed. 1982.
- 3) Litter M.- Farmacología Experimental y Clínica. 5a. ed., Ed. El Ateneo, Argentina, 1977.
- 4) Windholz M. (Ed).- The Merck Index 10th. Ed. Merck & Co. Inc. Rahway, N.J. 1983.
- 5) Martindale W.- The Extrapharmacopoeia 20th ed. Ed. Ainley Wade, The Pharmaceutical Press, London, 1977.
- 6) Clarck E.G.C. (Ed).- Isolation and Identification of Drugs The Pharmaceutical Press, London, 1977.
- 7) Martindale W.- The Extrapharmacopoeia 27th. Ed. The Pharmaceutical Press, London, 1981.
- 8) Dovabok Polim. Mater 1969 (2), 332. C.A. 76, 13982r (1972).
- 9) Korolkovas A. and Burckhalter J.H.- Compendio Esencial de Química Farmacéutica. Ed. Reverté, S.A. España México, 1979.
- 10) Romwell P. W. (Ed).- "The prostaglandins" Plenum Press, N.J. London, 1977.
- 11) Index Medicus 19 (1978) a 27 (1986).
- 12) The Pharmaceutical Codex, incorporating the B.P. Codex. 11th. Ed. The Pharmaceutical Press. Publ. by direction of the Society Council, Great Britain, 1979.
- 13) Indian J. Exp. Biol. 18 (12), 1498 (1980). C.A. 94, 114234a (1981).
- 14) Pharm. Ind. 45 (3), 307 (1983). C.A. 98, 185502e (1983).

- 15) Acta Pharm. Fern. 92 (3), 181 (1983); C.A. 100, 39527k (1984).
- 16) Eur. J. Clin. Pharmacol. 20 (2), 123 (1981).
- 17) Clin. Pharmacol. Ther. 30 (2), 232 (1981).
- 18) Int. J. Clin. Pharmacol., Ther. Toxicol. 18 (1), 26 (1980).
- 19) J. A. M. A. 236, 1874 (1976).
- 20) Lancet, ii/1360 (1966).
- 21) Q. J. Med.- 45 (178), 181 (1976); C.A. 85, 56481e (1976).
- 22) Ossorio A. P. R.- "Cromatografía de gases. 1a. ed. Ed. Alhambra, S.A. Madrid, España, 1971.
- 23) Nathan P. J.- Separaciones cromatográficas. Asoc. Nac. de Universidades de Ens. Sup. 1a. ed. México, 1975, Ed. Edicol, S.A.
- 24) McNair H. M.- "Cromatografía de gases". O.E.A. Washington, D.C. 1981.
- 25) Supina W. R.- The packed column in Gas chromatography, Supelco, Inc. Bellefonte, Pa. (1974).
- 26) Anal. Chem. 40, 210 (1968).
- 27) McNair H. M. y Esquivel B. H.- "Cromatografía líquida de alta presión". 2a. ed. Sría. Gral. de la O.E.A. Washington, D.C. 1980.
- 28) Chromatogr. Newsl. 5 (1), 1, (1977); C.A. 87, 161351b (1977).
- 29) J. Forensic Sci. 23 (1), 14 (1978).
- 30) J. Chromatogr. 221 (2), 414 (1980).
- 31) J. Anal. Toxicol. 4 (3), 124 (1980).
- 32) Clin. Chem. 25 (12), 2020 (1979).
- 33) J. Anal. Toxicol. 2 (5), 226 (1978).
- 34) Clin. Chim. Acta. 74 (2), 187, (1977).

- 35) Farmaco, Ed. Prat. 36 (6), 312 (1981), C.A. 95, 72983g (1981).
- 36) Anal. Lett. 10 (11), 845 (1977), C.A. 88, 68861d (1978).
- 37) J. Chromatogr. 209 (1), 67 (1981).
- 38) J. Pharm. Sci. 66 (11), 1628 (1977).
- 39) Anal. Chim. Acta. 130 (2), 405 (1981).
- 40) J. Pharm. Sci. 68 (3), 340 (1979).
- 41) J. Anal. Toxicol. 9 (2), 55 (1985).
- 42) Biomed. Mass. Spectrom. 3 (2), 60 (1976).
- 43) J. Chromatogr. 164, 394 (1979).
- 44) N.Z.J. Med. Lab. Technol. 32 (1), 17 (1978).
- 45) Biomed. Environ. Mass. Spectrom. 13 (2), 91 (1986).
- 46) Clin. Chem. 22(6), 879 (1976).
- 47) Analisis 11 (9), 463 (1983).
- 48) Clin. Liq. Chromatogr. 1, 1 (1984), C.A. 101, 65412j (1984).
- 49) Pharm. Weekbl. Sci. Ed. 3 (5), 1309 (1981), C.A. 96, 1539b (1982).
- 50) Chromatogr. Newsl. 6 (1), 1 (1978), C.A. 89, 36338t (1978).
- 51) Clin. Chem. 25 (6), 1002 (1979).
- 52) Clin. Chem. 23 (6), 957 (1977).
- 53) Clin. Chem. 23 (9), 1596 (1977).
- 54) Clin. Chem. 27 (1), 129 (1981).
- 55) Clin. Chem. 25 (3), 409 (1979).
- 56) Clin. Chem. 23 (3), 599 (1977).
- 57) Clin. Chem. 24 (7), 1288 (1978).

- 58) Clin. Chem. 28 (10), 2157 (1982).
- 59) Clin. Chem. 23 (4), 743 (1977).
- 60) J. Pharm. Sci. 68 (1), 96 (1979).
- 61) J. Chromatogr. 229 (2), 492 (1982).
- 62) J. Liq. Chromatogr. 5 (1), 93 (1982).
- 63) Arch. Pharm. 313 (4), 324 (1980).
- 64) J. Chromatogr. Sci. 20 (6), 260 (1982).
- 65) J. Anal. Toxicol. 7 (1), 33 (1983).
- 66) Pharm. Ind. 45 (4), 426 (1983).
- 67) Therapie 34 (1), 73 (1979). C.A. 91, 49194j (1979).
- 68) Arch. Pharm. 313 (5), 399 (1980).
- 69) J. Chromatogr. 174 (1), 165 (1979).
- 70) Medd. Nor. Farm. Selsk. 38 (4), 237 (1976). C.A. 87, 95289j(1977).
- 71) Clin. Liq. Chromatogr. 1, 5 (1984); C.A. 101, 65413k (1984).
- 72) Bull. Chim. Farm. 120 (3), 165 (1981); C.A. 92, 90691q (1981).
- 73) Clin. Chim. Acta. 99 (2), 161 (1979).
- 74) J. Clin. Toxicol. 15 (4), 427 (1979).
- 75) J. Pharm. Sci. 71 (11), 1291 (1982).
- 76) J. Pharmacol. Exp. Ther. 219 (2), 289 (1981).
- 77) J. Pharm. Sci. 73 (1), 117 (1984).
- 78) J. Anal. Toxicol. 5 (1), 24 (1981).
- 79) J. Chromatogr. 173 (1), 198 (1979).
- 80) J. Chromatogr. 226 (1), 224 (1981).

- 81) J. Chromatogr. 115 (2), 328 (1978).
- 82) J. Chromatogr. 230 (2), 443 (1982).
- 83) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20 (11), 791 (1982), C.A. 98,
46305e (1983).
- 84) Rinsho Yakuri, 14 (4), 613 (1983); C.A. 100, 131984e (1984).
- 85) Anal. Chem. Symp. Ser., 14 (2), 85 (1983); C.A. 99, 15963j
(1983).
- 86) Anal. Biochem. 125 (1), 143 (1982).
- 87) J. Pharm. Sci. 65 (7), 1064 (1976).
- 88) Ann. N.Y. Acad. Sci. 151, 822 (1968).
- 89) J. Chromatogr. 227 (2), 453 (1982).
- 90) J. Chromatogr. 142, 651 (1977).
- 91) J. Chromatogr. 149, 297 (1978).
- 92) J. Chromatogr. 339 (1), 198 (1985).
- 93) J. Chromatogr. 225 (2), 387 (1981).
- 94) J. Chromatogr. 306, 215 (1984).
- 95) Clin. Chem. 28 (2), 382 (1982).
- 96) J. Chromatogr. 223 (2), 479 (1981).
- 97) J. Chromatogr. 194 (2), 217 (1980).
- 98) Ann. Clin. Biochem. 16 (2), 89 (1979); C.A. 91, 69198e (1979).
- 99) Biomed. Mass. Spectrom. 11 (10), 502 (1984).