



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



"DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO
PARA LA CUANTIFICACION DE ISONIAZIDA EN ORINA
POR UN METODO ESPECTROFOTOMETRICO"

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :
MARTIN AGUILAR VELAZQUEZ
VELIA TORRES ARCE

DIRECTORES DE TESIS: BEATRIZ RAMIREZ MORA
JOSE ANTONIO GARDUÑO ROSAS

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1992



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.

I N D I C E

	Pag.
AGRADECIMIENTOS	i
Lista de figuras	ii
lista de tablas	iii
Lista de apéndice	iv
1. INTRODUCCION	1
2. GENERALIDADES DE ISONIAZIDA	
2.1. Historia y síntesis	2
2.2. Nombre y fórmula	2-3
2.3. Propiedades	3-5
2.4. Tratamiento de corta duración de la tuberculosis ..	5-7
3. GENERALIDADES DEL PROCESO DE EXTRACCION PARA FARMACOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS	8-9
-Métodos espectrofotométricos empleados en la cuantificación de isoniazida	9-10
4. IMPORTANCIA DE METODOS ANALITICOS EN ESTUDIOS DE FARMACOCINETICA	11-12
5. GENERALIDADES DE VALIDACION	13-14
6. FUNDAMENTACION DEL TEMA Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .	15-16
7. OBJETIVOS	17
8. PARTE EXPERIMENTAL	
8.1.0. Etapa de desarrollo	19
8.1.1. Factores que influyen en el método	19
8.1.2. Efecto del pH	19
8.1.3. Efecto del volumen del agente complejante	20
8.1.4. Efecto del tipo de solvente sobre la extracción .	20
8.1.5. Efecto de la proporción de solventes en la mezcla de extracción de isoniazida	21
8.1.6. Determinación de isoniazida en orina	21
8.1.7. Ensayo preliminar del método modificado para la cuantificación de isoniazida en orina	22
8.2.0. Etapa de validación (protocolo de validación) ..	23
8.2.1. Parámetros estadísticos de validación	24-25

9. RESULTADOS	26-45
10. DISCUSION	46-48
11. CONCLUSIONES	49
12. BIBLIOGRAFIA	57-60

LISTA DE FIGURAS

1. Curva de calibración de isoniazida en agua.
2. Influencia del pH sobre la constante de reparto de isoniazida en el sistema cloroformo/agua.
3. Influencia del pH sobre la constante de reparto de isoniazida en el sistema diclorometano/agua.
4. Influencia del % de la mezcla alcohol isoamílico-éter etílico sobre el % de recuperación de isoniazida.
5. Influencia del pH sobre la constante de reparto de isoniazida en el sistema isoamílico-éter (85:15) (v/v).
6. Determinación de isoniazida en orina.
7. Curva de calibración de isoniazida en orina.
8. Curva de la cantidad recuperada en función de la adicionada.

LISTA DE TABLAS

1. Datos de la curva de calibración de isoniazida en agua.
2. Datos de la constante de reparto (cloroformo/agua) Vs pH.
3. Datos de la constante de reparto (diclorometano/agua) Vs pH.
4. Datos del % de isoniazida recuperada Vs el % de la mezcla alcohol isoamílico-éter etílico (v/v).
5. Datos de la influencia del pH sobre la constante de reparto de isoniazida en el sistema isoamílico-éter (85:15) / agua.
6. Datos de la curva de calibración de isoniazida en orina.
7. Efecto del volumen del agente complejante.
8. Efecto del tipo de solvente sobre la extracción de isoniazida.
9. Ensayo preliminar del método modificado.
10. Linealidad del sistema.
11. Linealidad del método.
12. Exactitud y precisión.
13. Reproducibilidad.
14. Límite de cuantificación.
15. Especificidad.

LISTA DE APENDICES

1. Síntesis de acetilisoniazida y espectros de absorción al infrarrojo de isoniazida y acetilisoniazida.
2. Método de prodrómos.
3. Fórmulas estadísticas para la evaluación de los parámetros de validación.

1. INTRODUCCION

El siguiente trabajo forma parte de un proyecto muy amplio. Su objetivo general es establecer las bases de la terapia antituberculosa, que permitan optimizar el régimen de dosificación de corta duración usado actualmente en el país.

Debido a que existen escasos métodos citados en la bibliografía para cuantificar isoniazida, surge la necesidad de contar con procedimientos de análisis que sean de utilidad para cuantificarla en muestras biológicas. En la mayoría de los estudios farmacocinéticos se determina la concentración de fármaco en sangre, sin embargo es deseable contar con métodos para cuantificarla en otros fluidos biológicos como orina y saliva que pueden obtenerse fácilmente y no provocan stress en el paciente.

En el presente trabajo se utilizó una técnica espectrofotométrica debido a que el espectrofotómetro forma parte del equipo básico de laboratorios de salud pública, así como de escuelas de enseñanza superior.

La primera fase necesaria en esta investigación fue desarrollar y validar un método analítico sencillo y de bajo costo que permita cuantificar isoniazida en orina, contribuyendo de esta manera a alcanzar el objetivo del proyecto.

Las etapas previas importantes a la validación que se desarrollaron fueron: la etapa de diseño que consistió en la revisión bibliográfica, con la finalidad de conocer las propiedades físicas, químicas, estabilidad e interacciones del analito, así como referencias para la cuantificación por el método analítico adecuado y la etapa de desarrollo en donde se tomó como referencia la adaptación parcial de un método analítico.

2.- GENERALIDADES DE ISONIAZIDA

2.1. Historia y síntesis.

La síntesis de isoniazida fue reportada en 1921 por Meyer y Mally (3); pero fue hasta 1945, que Chorine anunció que la nicotinamida posee una acción tuberculostática (4).

El material básico para su síntesis fue el éster metílico del ácido isonicotínico, y el primer intermediario fue la isonicotinilhidrazida (isoniazida) (4).

La actividad antituberculosa de la isoniazida fue descubierta simultáneamente en norte América y Alemania, en 1952 (Chorine y Huan; Domagk), de manera casual, ya que fue ensayado por tratarse de un paso intermedio en la obtención de la tioacetona (5).

La isoniazida fue introducida en el mercado en 1952, como el medicamento más activo en la quimioterapia de la tuberculosis (4, 6).

Su síntesis se basa en el calentamiento del ácido isonicotínico o su éster etílico con hidrazina anhidra. El ácido nicotínico puede sintetizarse con diversos procesos oxidativos comenzando con 4-metil-piridina (7).

2.2. Nombre y fórmula.

Su nombre genérico es: isoniazida (INH). isonicotilhidrazida, hidrazina del ácido isonicotínico (HAIN), isonicotinilhidrazina, tubazida, nidrazida (8, 9, 10, 11).

Nombre químico: 4-piridin hidrazina del ácido carboxílico.
 Piridin 4-carboxil hidrazina.
 Piridin-hidrazina del ácido carboxílico.

Fórmula condensada: $C_4H_7N_3O$

P.M. = 137.14 g/mol

Fórmula desarrollada:



2.3. Propiedades.

Descripción: Cristales incoloros o blancos, o polvo cristalino blanco inodoro que se altera lentamente por exposición al aire o la luz; sus soluciones son prácticamente neutras al tornasol; funde entre 170-174 °C (7, 10, 11).

Solubilidad en solventes (7, 9, 10):

<u>Solvente</u>	<u>Solubilidad</u>
Agua (25 °C)	14 g/100 ml.
Agua (40 °C)	26 g/100 ml.
Etolanol (25 °C)	2 g/100 ml.
Etolanol (hirviendo)	10 g/100 ml.
Cloroformo	0.1 g/100 ml
Eter etílico	Muy ligeramente soluble.
Benceno	Insoluble.

El pH de una solución (1 en 10) : es de 6 a 7.5

Constantes de disociación: pKa 1.8, 3.5, 10.8 (20 °C).

Potenciales de oxidación:

Los siguientes potenciales de oxidación para isoniazida en diferentes soluciones fueron determinados por Vulterrin (11).

Solución Ef

HCl 1 N	0.78
Na ₂ B ₄ O ₇ 0.025 M	0.25
NaOH 3 N	-0.22

Complejos con metales:

La isoniazida forma complejos con muchos iones divalentes. Estos compuestos pueden ser usados en la determinación de isoniazida: Cd(II), Cu(II), Co(II) v Mn(II) (11).

Espectro al ultravioleta: Soluciones acuosas ácidas v alcalinas de isoniazida, presentan máximos de absorción a 266 y 298 nm respectivamente.

Espectro de infrarrojo: Los principales picos son a las longitudes de onda de 1653, 1541, 1621, 992, 845, 676 cm^{-1} (en KBr) (10).

Espectro de fluorescencia: La isoniazida muestra una intensa fluorescencia cuando es oxidada con peróxido o después de romper el anillo de piridina con bromocianógeno. Una solución tratada con peróxido diluido a pH de 6.5 a 7.5 (a 100 °C) durante 30 minutos establece un máximo de excitación a 333 nm y un pico emitido a 415 nm (11).

La estabilidad de isoniazida ha sido estudiada extensamente en solución y en varias preparaciones farmacéuticas. De particular interés en la reacción de su grupo hidrazino con aldehidos y cetonas tales como azúcares y cetoácidos y la complejación de isoniazida con iones metálicos.

Lewin y Hirsch mencionan que el Cu(II) y Mn(II) aceleran la degradación de isoniazida en la presencia de peróxido de hidrógeno (11).

La isoniazida es estable por varias semanas en solución amortiguadora de pH = 8 (12).

Hald establece que la isoniazida se pierde lentamente con la oxidación en soluciones acuosas, pero en presencia de sacarosa la isoniazida reacciona con la aldohexosa formada por inversión. La reacción con sacarosa puede ser inhibida por la adición de citrato de sodio al 0.3 % (11).

Pawelczvk establece que en condiciones anaerobias largas, la descomposición de isoniazida en valores de pH de 3 a 7 sigue una cinética de primer orden. El menciona que una solución al 1.0 % del fármaco es 37 veces más estable a pH = 6 que a pH = 3 (11).

Poolle y Meyer, mencionan que la isoniazida es inestable en plasma. Pero dicha inestabilidad puede ser retardada conservando las muestras a 5 °C (12).

La degradación de isoniazida en suero a partir de una concentración de 10 mcg/ml que se almacenó durante 6 meses a -20 °C fue de 4.0 % al mes (13).

En cuanto a la estabilidad de la isoniazida en suero y orina; una concentración de 10 mcg/ml a 25 °C. se degradó casi tres cuartas partes después de unas semanas de almacenamiento. Alrededor de un 10.0 % de isoniazida se transformó en ácido isonicotínico. La estabilidad fue considerablemente incrementada por medio de una extracción con 1-butanol y después de una semana fue de 65.0 v 82.0 % de la cantidad inicial para suero y orina respectivamente (13).

Se demostró que en la inestabilidad de la isoniazida en orina puede contribuir la contaminación bacteriana, la cual puede ser eliminada por la adición de timol como conservador (13).

Peters concluye que la isoniazida es estable en suero y en orina por un periodo de 56 días, cuando se almacena en congelación a -18 °C (13).

2.4. Tratamiento de corta duración de la Tuberculosis.

La tuberculosis es una infección crónica de origen bacteriano y de distribución mundial, que puede adoptar tres formas: 1) infección primaria, 2) tuberculosis pulmonar y 3) tuberculosis extrapulmonar.

Generalmente la primoinfección tuberculosa (a veces llamada tuberculosis de tipo infantil) pasa inadvertida, aunque en ocasiones puede haber fiebre, síntomas constitucionales vagos o comprobación (mediante examen de rayos X) de un filtrado en los pulmones y de crecimiento de los ganglios linfáticos traqueobronquiales. Por lo general las lesiones curan espontáneamente, dejando sensibilidad a la tuberculina. En los adultos jóvenes semeja o puede dar lugar a tuberculosis pulmonar. A menudo la tuberculosis pulmonar tiene una evolución crónica y variable, pero es capaz de recurrir en cualquier estadio. Los síntomas son: tos, fatiga, fiebre, pérdida de peso, irritación de la garganta y dolor torácico. La tuberculosis extrapulmonar, es rara, y en ésta el bacilo tuberculoso invade otros órganos, en vez de los pulmones.

-Agente infeccioso: El báculo de la tuberculosis es el *Mycobacterium tuberculosis* y se ha comprobado que el tipo humano es el que causa casi todos los casos de tuberculosis pulmonar; el tipo bovino causa una gran parte de los casos de tuberculosis extrapulmonar, variando las proporciones según la oportunidad de infección con uno u otro tipo.

-Reservorio y fuente de infección: El reservorio es principalmente el hombre y, en algunas zonas también el ganado vacuno enfermo. La fuente de infección son las secreciones del aparato respiratorio de las personas con tuberculosis pulmonar "abierta" (con baciloscopia positiva) y leche de vacas tuberculosas. Los enfermos de tuberculosis extrapulmonar no pueden ser los causantes de la infección en otras personas.

-Modo de transmisión: La tos o el estornudo de enfermos con tuberculosis pulmonar "abierta" forma un aerosol de materia infecciosa: las diminutas partículas pueden ser inhaladas directamente o después de asentadas y resuspendidas junto con el polvo. El contacto directo o indirecto son modos importantes de transmisión, por otro lado la infección causada por los alimentos debido a la contaminación de los cubiertos y vajillas, es menos importante.

Los tratamientos antituberculosos en México, recomendados por la Secretaría de Salud (17, 15) son:

1) Tratamiento primario autoadministrado (12 meses).

- Fase intensiva: 60 dosis (2 meses) isoniazida 300 mg, etambutol 1200 mg y estreptomycinina 1 g (dosis diaria).
- Fase de sostén: 300 dosis (10 meses) de isoniazida 300 mg y etambutol 1200 mg (dosis diaria).

2) Tratamiento primario de corta duración, supervisado (hasta 7 meses de duración).

-Fase intensiva: 60 dosis , diario de lunes a sábado hasta 3 meses.

Isoniazida 300 mg, rifampicina 600 mg,
estreptomina 1 g v pirazinamida 2 g azinamida
2 g.

-Fase de sostén: 30 dosis intermitentes. 2 veces por semana,
hasta 4 meses.

Isoniazida 800 mg y rifampicina 600 mg.

Un problema que se presenta durante el tratamiento es que puede surgir resistencia rápidamente y es función de la magnitud de la población bacteriana presente en la lesión. La importancia clínica de la resistencia a la isoniazida depende del tipo de enfermedad tuberculosa. Es significativa tal resistencia si hay un foco de infección persistente, pero no lo es tanto si la enfermedad es mínima. La adición de un segundo o tercer antituberculoso retarda el comienzo de la resistencia. En raras ocasiones se observa resistencia cruzada con otros antituberculosos.

3.- GENERALIDADES DEL PROCESO DE EXTRACCION PARA FARMACOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.

Existen diversos métodos analíticos utilizados para la cuantificación de isoniazida y sus metabolitos en suero, sangre y orina; sin embargo la extracción es requerida únicamente para los ensayos de tipo cromatográfico y algunos espectrofotométricos. La técnica de extracción más comúnmente usada es la líquido-líquido y usualmente esta no se requiere para métodos inmunológicos o enzimáticos.

La extracción de fármacos de suero, plasma y orina (fase acuosa), involucra la interacción de estos con un solvente orgánico inmiscible con agua. Durante la extracción el fármaco se distribuye entre las fases orgánica y acuosa; cuando las propiedades de solubilidad del fármaco son favorables, mayor cantidad de fármaco es extraída de la fase acuosa en el solvente de extracción. Con frecuencia el extracto es concentrado por evaporación a sequedad, y el residuo es reconstituido con un pequeño volumen del solvente. Esta es la llamada extracción directa y sus ventajas son velocidad y alta eficiencia (recobro), pero una de sus principales desventajas es la falta de especificidad debido a que una multitud de otros materiales son co-extraídos con el fármaco de interés, por lo cual se necesita una alta especificidad en la subsecuente cuantificación. La extracción selectiva puede ser lograda por una selección adecuada del solvente y ajuste apropiado del pH de extracción para la especie. Cuando el pH de la orina ha sido optimizado para la extracción del fármaco, otras substancias de diferentes propiedades ácido-base quedan en la fase acuosa. Esta selectividad permite una especificidad en la medición menos rigurosa, con una menor probabilidad de interferencia por otros fármacos o constituyentes del fluido biológico. Los cambios de solventes se basan en el conocimiento de sus polaridades y pueden incrementar la selectividad de la extracción de un fármaco. La mayoría de compuestos no polares

son más solubles en solventes de baja polaridad y entre mayor polaridad tenga el compuesto, más soluble es en los solventes polares. La mayoría de los fármacos de interés dentro de los ensayos de laboratorio son de polaridad intermedia, y pueden ser disueltos en una extensa cantidad de solventes. Los solventes de baja polaridad pueden ser utilizados en la extracción de componentes que interfieren en la cuantificación de la sustancia de interés.

Frecuentemente las sustancias del fluido biológico que interfieren en la cuantificación del fármaco pueden ser removidas por cambios en las propiedades del solvente; tal es el caso de las sustancias no polares presentes en la orina que pueden ser removidas con solventes de baja polaridad como hexano y diclorometano, para que así la muestra pueda ser subsecuentemente extraída con un solvente más polar obteniendo el extracto del fármaco libre de la mayor cantidad de impurezas (18).

Metodos espectrofotométricos empleados en la cuantificación de isoniazida.

Algunos de los métodos espectrofotométricos empleados para la cuantificación de isoniazida en formas farmacéuticas, sugieren por estudios preliminares que adaptando este tipo de procedimientos pueden ser utilizados para la determinación de isoniazida libre en muestras de orina y suero; tal es el caso del método descrito por James T. (19) que se basa en la interacción entre isoniazida y la 9-cloroacridina para formar un complejo de tipo colorido, pero tiene el inconveniente de que su mecanismo no está completamente establecido; lo mismo sucede con el método descrito por Michael E. (20) que se basa en la reacción de un producto de condensación producido por la reacción entre isoniazida y 6,7-dicloroquinolina-5,8-diona en una solución acuosa etanólica en medio alcalino y cuya absorción máxima es a una longitud de onda de 645 nm.

Otros métodos como el descrito por Russell D.W. (21) que de un método específico para la determinación de isoniazida en sangre utilizando ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico. ha sido modificado para la determinación de isoniazida en orina; sin embargo involucra un procedimiento demasiado complicado y extenso. Este método modificado determina únicamente en forma semicuantitativa a la isoniazida, y se basa en la oxidación específica de isoniazida por medio de la 9-cloroacridina. Un método colorimétrico para la determinación de isoniazida en soluciones acuosas se encuentra descrito por Prodromos B. (22) y presenta un alto grado de sensibilidad en comparación con los descritos a la fecha; dicho método puede ser comparable en sensibilidad al descrito en la USP XVIII el cual es iodométrico (23). y además tiene un procedimiento sencillo que se basa en la reducción, bajo condiciones óptimas de Fe(III) hasta Fe(II) por isoniazida, y el Fe(II) resultante se hace reaccionar con orto-fenantrolina (o-Phen) hasta formar el complejo rojo-naranja $[Fe(II)-(o-Phen)_3]^{2+}$ cuya absorción máxima es a una longitud de onda de 510 nm.

4.- IMPORTANCIA DE LOS METODOS ANALITICOS EN ESTUDIOS DE FARMACOCINETICA.

Por lo general el estudio del destino de los farmacos en organismos vivos es primero un problema de analisis quimico que abarca su separación, identificación y ensayo cuantitativo. Cuando una pequeña cantidad de farmaco es introducida al organismo, es transportado por el sistema circulatorio, diluido en varios fluidos biológicos, enlazado reversible o irreversiblemente a varios tejidos, transformado y excretado. La transformación puede ser sutil, principalmente dando lugar a derivados similares al farmaco administrado, o puede ser extensa resultando en una completa degradación de la molécula. La pequeña cantidad de compuestos relacionados estructuralmente deben de ser recobrados de los tejidos y órganos, separados de los componentes biológicos normales, y liberados de estructuras que los absorben o los complejan. Por ello se hace necesario que dichas estructuras sean definidas, e idear métodos cuantitativos hasta elucidar la estequiometria y secuencia de la farmacocinetica y procesos metabólicos (24), similares al farmaco administrado, o puede ser extensa resultando en una completa degradación de la molécula.

La individualización de los regimenes de dosificación, uno de los objetivos principales de la monitorización de niveles séricos de farmacos, consigue mejorar significativamente la eficacia y seguridad de muchos tratamientos farmacológicos. El error analítico cuando la monitorización trata de establecer el comportamiento cinético del farmaco en el paciente va a dar lugar a la estimación errónea de los parámetros farmacocinéticos básicos y en consecuencia a la programación de pautas posológicas probablemente incorrectas. Así mismo cuando se utilizan datos poblacionales, se deberá considerar no solo los factores que perturban la predicción correcta de la dosis en el estado de equilibrio, sino además el error analítico máximo permitido a la técnica. Es evidente pues que la

fiabilidad de los datos analíticos en la monitorización tiene gran importancia, ya que su ausencia llegaría a comprometer la eficacia clínica de un tratamiento. El control de calidad de monitorización cumple su cometido final cuando asegura la fiabilidad de la información que ofrece al paciente. Esta información no solo incluye los resultados analíticos del laboratorio, sino también datos fundamentales para interpretarlos correctamente: márgenes terapéuticos, posología recomendada, precauciones. Uno de los principales aspectos de un programa de control de calidad es el establecimiento e información de los límites de exactitud y precisión de las determinaciones analíticas realizadas (25).

5.- GENERALIDADES DE VALIDACION

Hoy en día uno de los principales objetivos de la industria farmacéutica, alimenticia y química, es asegurar un adecuado control de la calidad tanto de la materia prima, producto en proceso, como del producto terminado. Es por esto que la validación retrospectiva y prospectiva ha tomado gran importancia en estas áreas.

La etapa de validación comprende una serie de pruebas sistemáticas por las cuales queda establecido de manera clara y objetiva, que el método de estudio reúne los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. De tal manera que el proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos de medición.

Se ha mencionado que el método analítico es una de las principales fuentes de variabilidad que no ha permitido poner en claro la utilidad del monitoreo de fármacos en muchos casos. En la actualidad se ha progresado mucho en ésta área al introducir conceptos tan importantes como la "validación", con el cual la información empieza a uniformizarse permitiendo así la comparación de datos en experimentación clínica. Sin embargo antes de entrar en detalles sobre la importancia de un método analítico, el cual es uno de los principales objetivos, es de sumo interés conocer las implicaciones de la validación ya que cuando un término se pone de moda, se llega a emplear como una simple herramienta sin considerar la complejidad de tal método y su verdadera aportación.

Para empezar existen muchas definiciones del término "validar", si se considera como base el proceso de medición. La validación puede tener dos acepciones temporales, una "la determinación del grado de validez de un proceso de medida" lo que significa una actividad a posteriori del proceso de medición; la otra "hacer válido" en el sentido de obtener el resultado deseado, indica que se tiene a priori metas sobre criterios de

evaluación y que es necesario desarrollar las actividades pertinentes durante el proceso de medición para alcanzarlas.

El desarrollo de un proceso de medida puede implicar tres etapas: obtener una respuesta, mejorarla y entenderla; para lo cual es necesario identificar los factores más importantes de la variabilidad y manejar un nivel de tolerancia en ellos, basándose en la precisión y exactitud requerida del método.

La primera etapa en el desarrollo de métodos analíticos es establecer que se desea medir y como se desea hacerlo. Entonces tomando como base la bibliografía se hace una investigación con criterio químico, eligiendo dentro de los métodos disponibles o decidiendo si se requiere de otro nuevo. Si esta es la elección se procede a desarrollar el método básico, inicialmente de manera rudimentaria, con lo cual posiblemente sea necesario perfeccionar alguna etapa para mejorar la repetibilidad y probar la tolerancia, en este momento puede desarrollarse un estándar de referencia, si no existe. hasta entonces se está en posición de escribir el procedimiento. una vez que este está definido, se deben realizar una serie de experimentos para validarlo, incluyendo factores tales como la exactitud en términos de selectividad, especificidad, precisión, recuperación, linealidad y algunos otros aspectos prácticos como rapidez, costo, tolerancia, estabilidad, etc.

Desafortunadamente, no hay un acuerdo completo entre los autores sobre el significado y definiciones de estos términos, aún en el mismo laboratorio los analistas difieren en como expresar las características que debe cumplir el método (26).

6.- FUNDAMENTACION DEL TEMA Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Anteriormente en México, algunos fabricantes de medicamentos analizaban sus productos con métodos poco confiables, ya que no había autoridad que legislara al respecto; en la actualidad existen instituciones que obligan a los fabricantes a utilizar métodos farmacopéicos o si se utilizan métodos analíticos alternativos se deben presentar estudios que garanticen la confiabilidad de ellos, lo que se conoce como estudios de validación.

Validación y validar se ha convertido hoy en una expresión común en nuestro lenguaje técnico, pues validar significa "dar fuerza o firmeza a una cosa". La validación consiste en reunir un conjunto de datos suficientes que permitan asegurar con una confianza razonable que el proceso o método estudiado realiza y realizará aquello que tiene como fin o aquello para lo que está destinado por medio de una evidencia documentada y comprobar con esto que el proceso se desarrollará tal como se ha previsto (27, 28).

Algunos de los diferentes métodos citados para cuantificar isoniazida en formas farmacéuticas y en fluidos biológicos son colorimétricos (19, 22, 29); espectrofotométricos (20, 21, 30, 31, 32, 33); fluorométricos (34, 13); por cromatografía de líquidos de alta resolución (35, 36, 37, 38) y por cromatografía de gases (39, 40, 41, 42, 43).

Aun cuando existen varios métodos espectrofotométricos citados para la cuantificación de isoniazida en fluidos biológicos; en la actualidad carecemos de información referida a métodos analíticos específicos para la cuantificación de isoniazida en orina. Es por ello que surge la necesidad de implementar un método espectrofotométrico sencillo, sensible y de preferencia de bajo costo, que sea lo suficientemente confiable para emplearlo con fines terapéuticos y que sea factible de realizar en los laboratorios con reactivos y equipo de uso común.

n la actualidad el espectrofotometro forma parte del equipo fundamental de la mayoria de los laboratorios, por lo cual el proposito primordial de este proyecto fue la de desarrollar y validar un metodo analitico confiable y de bajo costo que permitiera cuantificar isoniazida en orina de una manera rápida y sencilla.

7.- OBJETIVOS

.Desarrollar un método espectrofotométrico que permita el análisis cuantitativo de isoniazida en muestras urinarias.

.Determinar la influencia que tienen factores como pH, volumen de agente complejante, efecto del tipo de solvente en la extracción y proporción de una mezcla de solventes de extracción en la cuantificación de isoniazida.

. Llevar acabo la validación del método analítico propuesto.

B.O. PARTE EXPERIMENTAL

-Material:

Pipetas volumétricas 0.5 l. 2. 3. 5 ml.
 Matraz volumétrico 10. 25. 50. 100 ml.
 Tubos de centrifuga de 16 x 100 ml.
 Gradilla para tubos de ensave.
 Vasos de precipitado 10. 50. 100 ml.
 Celdas para espectrofotómetro.

-Reactivos:

Orto-fenantrolina . H₂O R.A.
 Sulfato de amonio férrico . 12 h₂O R.A. Merck.
 Diclorometano R.A. Baker.
 Hidróxido de sodio R.A. Merck.
 Ácido clorhídrico R.A. Merck.
 Alcohol isoamílico R.A. Baker.
 Sulfato de amonio R.A. Baker.
 Eter etílico R.A. Merck.
 Isoniazida (materia prima).
 Acetilsioniazida (sintetizada en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N.). Ver apéndice I. dice I.

-Soluciones:

Solución patrón de isoniazida de 20. 160 y 200 mcg/ml.
 Solución patrón de isoniazida de 20 mg/ml.
 Solución de sulfato de amonio al 15 %.
 Solución de ácido clorhídrico 0.1 y 1 M.
 Solución de hidróxido de sodio 0.1 y 1 M.
 Solución de mezcla de reactivos (Agente complejante).

0.5 g de orto-fenantrolina monohidratada. 5.0 ml de solución 1 M de HCl v 0.4 g de sulfato ferrico de amonio dodecahidratado son disueltos v diluidos con agua desionizada hasta 250 ml. La solución es estable por 4 semanas. si esta es almacenada en un frasco oscuro protegido de la luz v en refrigeración.

-Equipos:

Balanza analítica.	Espectrofotómetro.
Agitador vortex Mixer.	Potenciómetro.
	Agitador automático.

8.1.0. ETAPA DE DESARROLLO

8.1.1. Factores que influyen en el método.

Con el propósito de poder adaptar el método descrito por Prodromos (22) en la cuantificación de isoniazida en orina, se estudió el efecto que pueden ejercer factores como: pH, volumen de agente complejante, tipo de solvente en la extracción, proporción de una mezcla de solventes para la extracción de isoniazida.

8.1.2. Efecto del pH.

Para poder determinar la influencia que ejercen los cambios de pH en la extracción de soluciones acuosas de isoniazida empleando los solventes cloroformo y diclorometano (ver fig.3 y 4), se probaron los pH s siguientes: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, para cada uno de los solventes mencionados.

Esto se hizo con el propósito de poder encontrar el pH óptimo en el cual se pudieran hacer extracciones de limpieza de componentes de la orina que interfieren en la reacción de cuantificación de isoniazida; asegurándonos también que a dicho pH no se extraiga isoniazida lo cual representaría una pérdida que se vería reflejada en el recobro.

De una solución de 160 mcg/ml de isoniazida, tomar 1 ml en un tubo de centrifuga, ajustarle el pH correspondiente empleando HCl ó NaOH 0.1 N y se extrae con un volumen de 3 ml (empleando por separado los solventes antes mencionados). Se agita durante dos minutos en vortex, los extractos orgánicos se transfieren a un matraz de 25 ml, se evaporan a sequedad y se diluyen en 20 ml de agua continuando con el método de Prodromos desde el ajuste de pH en adelante (ver apéndice II).

Los extractos acuosos se colocan también en un matraz de 25 ml, se les agrega 20 ml de agua y se continua con el método mencionado desde el ajuste de pH.

Las absorbancias en ambas fases son transformadas a concentración por medio de una curva de calibración de isoniazida (fig. No 1), para así poder calcular la constante de reparto a cada uno de los pH s.

B.1.3. Efecto del volumen de agente complejante.

Para poder determinar el volumen apropiado de agente complejante se realizaron curvas estándar de isoniazida en agua. Se prepararon 3 soluciones patrón de concentraciones (A) 20, (B) 160 y (C) 200 mcg/ml. a partir de las cuales se hicieron diluciones para obtener las concentraciones finales de la curva estándar. Los volúmenes tomados de las soluciones son: Solución A: 1, 2, 6 y 7 ml; solución B: 0.5, 1.0, y 1.5 ml; solución C: 0.5 y 1.0 ml.

Dichos volúmenes son colocados en matraces de 25 ml adicionando 20 ml de agua (método de Prodromos), posteriormente a esto se le adiciona 1, 2 y 3 ml según sea el caso de la mezcla de reactivos (agente complejante) y se sigue con el método anteriormente mencionado desde el ajuste de pH. De esta manera se obtienen las concentraciones finales de la curva estándar de 0.8, 1.6, 3.2, 4.8, 6.4, 8.0 y 9.6 mcg/ml (ver tabla No. 7).

B.1.4. Efecto sobre el tipo de solvente sobre la extracción.

Con la finalidad de seleccionar la mezcla de solventes más adecuada para la extracción de isoniazida, se probaron las siguientes mezclas: cloroformo-butanol (70:30) (1B); cloroformo-metanol (60:40) (11); y alcohol isoamílico-éter etílico (85:15) (8), citados por algunos investigadores (ver tabla No. 8)..

En un tubo de centrifuga colocar 1 ml de una solución de isoniazida de 160 mcg/ml, ajustarle a 7 el pH con NaOH 0.1 N y adicionar 3 ml de la mezcla de extracción seleccionada, extraer por 3 veces agitando durante 2 minutos en vortex, la fase

orgánica es separada y transferida a un matraz volumétrico de 25 ml evaporando a sequedad, adicionar 20 ml de agua desionizada, agitar y continuar con el método de Prodromos desde el ajuste de pH (ver apéndice No. II).

8.1.5. Efecto de la proporción de solventes en la mezcla seleccionada para la extracción de isoniazida.

Una vez determinado que la mezcla de solventes más adecuada para la extracción de isoniazida es la del alcohol isomilico-éter etílico (ver tabla No. 8), se procedió a determinar cual era la proporción óptima de dicha mezcla y se realizó de la manera siguiente: Se prepararon las proporciones siguientes de la mezcla: 25:75, 50:50, 75:25, 80:20, 85:15 y 90:10 (v/v) (ver fig. No. 4).

En un tubo de centrifuga se coloca 1 ml de agua, 1 ml de solución de isoniazida (160 mcg/ml), y se realizan 3 extracciones sucesivas con cada una de las diferentes proporciones de la mezcla por separado, agitando durante 2 minutos en vortex, los extractos orgánicos se reúnen y se reextraen con 5 ml de ácido clorhídrico 0.1 N, se agitan automáticamente durante 20 minutos, las fases ácidas resultantes se transfieren a un matraz volumétrico de 25 ml, se agregan 20 ml de agua y se continúa desde el paso de ajuste de pH marcado por el método de Prodromos (ver apéndice II).

8.1.6. Determinación de isoniazida en orina (adaptación del método de prodromos).

Para la cuantificación de isoniazida en orina se utilizó el método modificado de Prodromos, en el cual se tomaron en cuenta los efectos anteriormente descritos (ver figura No 6).

-Método:

A 1 ml de orina (soluciones acuosas de 300, 250, 200, 150, 100 y 50 mcg/ml de isoniazida), ajustar el pH a 3.0 con HCl 0.1 N y

realizar 3 extracciones con diclorometano (de 3 ml c/u agitando durante 2 minutos en vortex). A la fase acuosa resultante adicionar 1 ml de sulfato de amonio al 15 % v y ajustar el pH a 7.0 con NaOH 0.1 N; en seguida se le realizan otras tres extracciones con la mezcla de alcohol isoamílico-éter etílico (85:15) (de 3 ml c/u con agitación en vortex durante 2 minutos). La fase orgánica producto de esta segunda extracción se reextrae con 5 ml de HCl 0.1 N en embudo de separación con tiempo de agitación de 20 minutos en un agitador automático. La fase ácida se ajusta a pH = 5.2 con NaOH 1 N y se le adicionan 2 ml de la mezcla de reactivos. La solución resultante se diluye hasta un volumen de 25 ml con agua desionizada. finalmente se mantiene por 25 minutos a baño maria a 50 ± 0.5 °C. Después de este tratamiento la solución es enfriada a temperatura ambiente utilizando un baño de agua. La absorbancia de esta solución (rojo-naranja) es medida a una longitud de onda de 510 nm, utilizando un blanco de reactivos preparado bajo las mismas condiciones. De esta manera se construye la curva de calibración de isoniazida en orina (ver figura No. 7).

8.1.7. Ensayo preliminar del método modificado para la cuantificación de isoniazida en orina.

Una vez establecidas las condiciones favorables para la determinación de isoniazida en agua se realizaron ensayos preliminares en muestras de orina, a las cuales se les adicionó isoniazida quedando en solución a una concentración de 160 mcg/ml (ver tabla No. 9).

8.2.0. ETAPA DE VALIDACION (Protocolo de validación)

El protocolo de validación se llevó a cabo de manera global en base a un diseño experimental completamente al azar.

Para esto se tomó en cuenta el porcentaje de excreción de isoniazida (85 % en forma inalterada en orina de 24 hrs), una dosis de 5 mg/kg de peso/día y un individuo de 70 kg de peso: de esta manera se determinó la cantidad máxima excretada (300 mg/24 hrs) la cual representa el 100 %.

Como el método modificado cuantifica en mcg, nuestro 100 % es 300 mcg/ml.

Los valores de isoniazida utilizados para la linealidad del método son: 300, 250, 200, 150, 100 y 50 mcg/ml (cada punto por triplicado y 3 días diferentes).

Para el caso de exactitud y precisión las concentraciones de isoniazida utilizadas fueron 300 y 150 mcg/ml (cada punto por sextuplicado en 3 días diferentes).

Para reproducibilidad se empleó un diseño factorial de 2×2 (dos analistas y dos días diferentes), con 6 replicaciones para cada tratamiento y empleando concentraciones de isoniazida de 150 y 300 mcg/ml.

El límite de cuantificación se determinó en base a un modelo estadístico, tomando concentraciones abajo del punto medio de la cantidad máxima excretada. Las concentraciones de isoniazida utilizadas son 150, 120, 90, 60, 30 y 15 mcg/ml (cada punto por triplicado en 3 días diferentes).

8.2.1. Resumen de parámetros estadísticos de validación.

PARAMETRO	DEFINICION	DETERMINACION	CALCULO	CRITERIO
LINEALIDAD DEL SISTEMA	La relación entre el tiempo de respuesta y la concentración de la muestra.	Analizar el gráfico de la curva de calibración para determinar la linealidad del sistema.	1) Calcular: Pendiente (m) Intercepto (b) Coeficiente de determinación (R^2) Coeficiente de regresión (r). 2) Comparar con los valores de referencia.	1) $R^2 > 0.98$ 2) $r > 0.99$ 3) $ b < b_{lab} $ No se acepta Mo Mo: El modelo lineal que mejor describe la relación entre la concentración y el tiempo de respuesta.
LINEALIDAD DEL METODO	La relación entre el tiempo de respuesta y la concentración de la muestra.	Analizar el gráfico de la curva de calibración para determinar la linealidad del método.	1) Calcular: Pendiente (m) Intercepto (b) Coeficiente de determinación (R^2) Coeficiente de regresión (r). 2) Comparar con los valores de referencia.	1) $R^2 > 0.99$ 2) $r > 0.98$
PRECISION	Es la concordancia entre los resultados obtenidos en un mismo día y en días consecutivos.	Analizar el gráfico de la curva de calibración para determinar la precisión del método.	1) Calcular la media. 2) Calcular la desviación estándar. 3) Calcular el coeficiente de variación en %.	1) C.V. en % 2) $\mu = 100$ mg - Cromatográfico - Químico y orgánico - Microbiológico - Fluidos biológicos hasta un 10 M
EXACTITUD	Es la concordancia entre el valor real y el valor obtenido.	Analizar el gráfico de la curva de calibración para determinar la exactitud del método.	1) Calcular: - La desviación estándar - El C.V. en % - El error relativo en % - El error absoluto en la media. 2) Prueba de la hipótesis para la media.	Mo: $\bar{x} = \mu$ $\mu = 100$ mg adicionado. $ t_c < t_{0.05}$ No se rechaza Mo y el método es exacto con un $\alpha = 0.05$.
REPETIBILIDAD.	Es la concordancia de los resultados obtenidos en un mismo día y en días consecutivos.	Analizar el gráfico de la curva de calibración para determinar la repetibilidad del método.	Lo mismo que para precisión.	Lo mismo que para precisión.

PARAMETRO	DEFINICION	DETERMINACION	CALCULO	CRITERIO
REPRODUCIBILIDAD.	Es la concordancia respectiva de los resultados obtenidos por el mismo método de laboratorio de diferentes analistas en el tiempo y en los laboratorios, etc.	1. Analizar 37 muestras de diferentes tipos de cemento con los métodos de ensayo en los laboratorios.	1. Tabular los resultados de acuerdo a un análisis de varianzas. Con la prueba de F.	1. Fcal < Ftab Mo: se rechaza 1) Analista Mo: No debe mostrarse dificultad en la recuperación para un método cuando se realizan dos análisis diferentes. 2) Día Mo: No debe mostrarse dificultad en la recuperación cuando el método analítico se realizó por diferentes analistas en días diferentes.
LIMITE DE DETECCION	Es la mínima concentración de un tipo de ruido que puede ser detectada por el método de operación de parámetros de ruido que debe ser empleado para el ruido del sistema.	Hacer diluciones seriadas de la muestra y determinar la respuesta para cada una de ellas. El punto de ruido del sistema.	Se determina en base a un modelo estadístico.	La señal obtenida debe ser mayor que el ruido del sistema.
LIMITE DE CUANTIFICACION.	Es la mínima concentración de un tipo de ruido que puede ser detectado y aceptado por el método de operación de parámetros de ruido del sistema.	Analizar muestras de concentración y establecer el nivel de aceptación y precisión.	Se determina en base a un modelo estadístico.	El mismo que para precisión.
ESPECIFICIDAD	Es la especificidad del método de análisis para el ruido del sistema de operación.	Completar muestras de concentración y determinar la especificidad y precisión de los métodos de análisis de ruido del sistema de operación.	No debe existir ningún ruido de fondo.	No debe existir ruido de fondo del método.

9.- RESULTADOS

-Etapas de desarrollo.

Despues de seguir el procedimiento marcado para el estudio del efecto del pH sobre la extracción de isoniazida a partir de soluciones acuosas empleando cloroformo y diclorometano, para poder optimizar el pH en el cual se pudieran realizar extracciones de componentes de la orina que interfieren en la reacción de cuantificación de isoniazida; y a la vez asegurándonos que a dicho pH no se extraiga isoniazida lo cual disminuiria el porciento de recuperación, esto se muestra en las figuras No 2 y 3.

De igual forma siguiendo las indicaciones para la determinación del volumen apropiado del agente complejante se muestran las absorbancias obtenidas despues de adicionar los diferentes volúmenes probados en la tabla No 7.

Con el procedimiento marcado para determinar el efecto de diferentes mezclas de solventes sobre la extracción de isoniazida, se determinaron las absorbancias con los extractos orgánicos y acuosos: estas absorbancias fueron interpoladas en la curva de calibración de isoniazida en agua. Las concentraciones respectivas representadas en porciento para cada una de las mezclas se muestran en la tabla No 8.

Siguiendo el procedimiento para el estudio del efecto de la proporción de mezcla de disolventes seleccionada para la extracción de isoniazida; las absorbancias obtenidas con los extractos orgánicos para cada proporción ensayada fueron interpolados en la curva estándar de isoniazida en agua y representadas en porciento recuperado. los datos se muestran en la tabla No 4 y figura No 4.

Una vez determinada la proporción más adecuada de la mezcla de alcohol isoamílico-éter etílico(85:15), se procedió a determinar la influencia del pH en la extracción de isoniazida para dicha mezcla; esto se muestra en la tabla No 5 y figura No 5.

Las condiciones finales del método adaptado para la cuantificación de isoniazida en orina se muestran en la figura No 6.

Los resultados del ensayo preliminar para la determinación de isoniazida en orina se muestran en la tabla No 9.

-Etapa de validación.

De acuerdo a un diseño experimental completamente al azar utilizado para la validación del método analítico, se obtuvieron las tablas y figuras correspondientes a: linealidad, exactitud, precisión, reproducibilidad, límite de cuantificación y especificidad.

De igual manera se realizó la gráfica de cantidad recuperada (mcg/ml) en función de la cantidad adicionada (mcg/ml) para determinar el % recuperado de isoniazida, en el intervalo de concentraciones de 50 - 300 mcg/ml; ver la tabla No 11 y figura No 8.

FIGURA No 1

CURVA DE CALIBRACION DE ISONIAZIDA EN AGUA

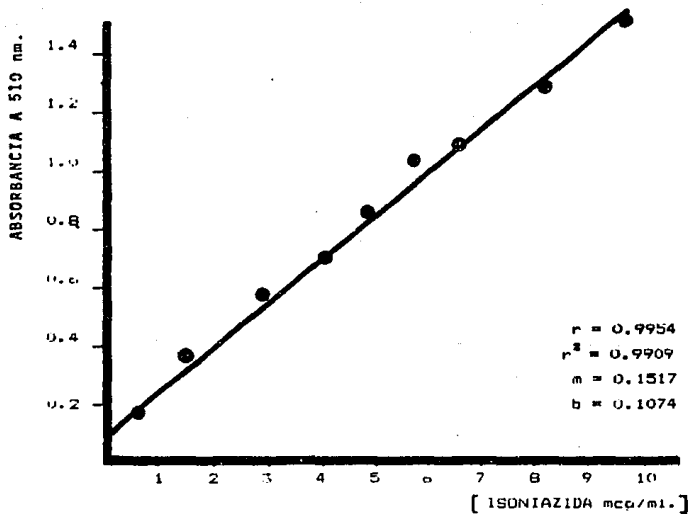


FIGURA No 2

INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA CONSTANTE DE REPARTO
DE ISONIAZIDA EN EL SISTEMA CLOROFORMO / AGUA

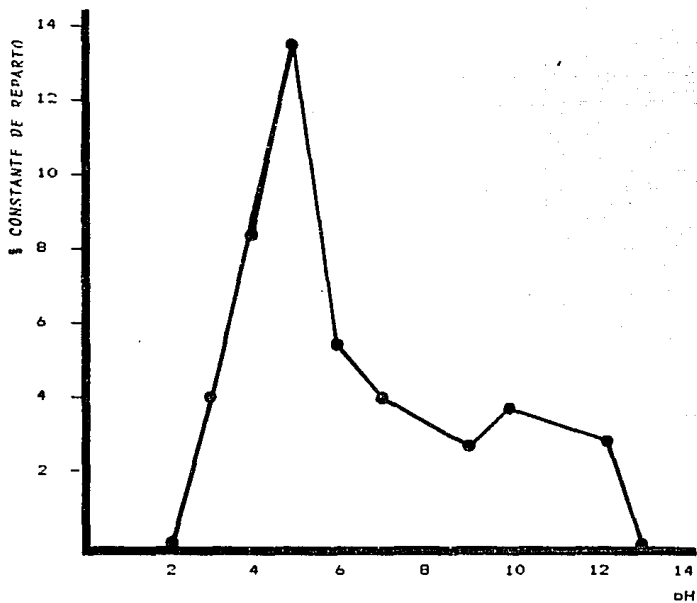


FIGURA No 3

INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA CONSTANTE DE REPARTO
DE ISONIAZIDA EN EL SISTEMA DICLOROMETANO / AGUA

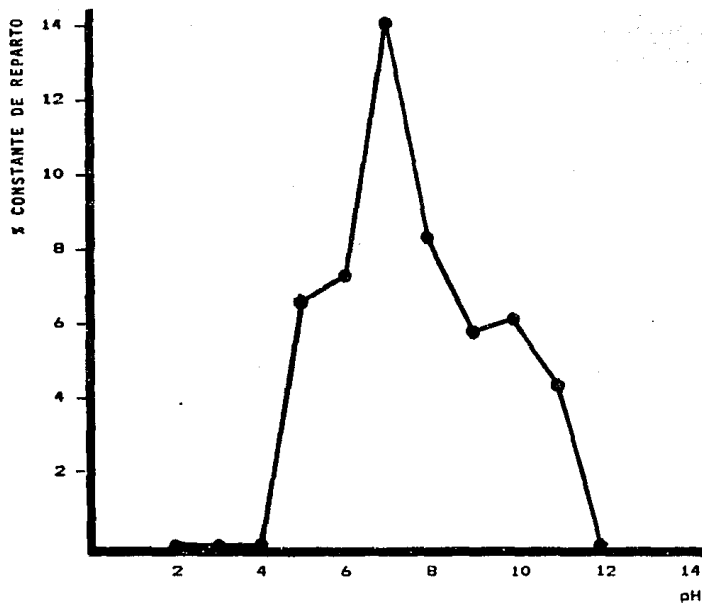


FIGURA No 4

INFLUENCIA DEL % DE LA MEZCLA ALCOHOL ISOAMILICO
ETER ETILICO SOBRE EL % DE RECUPERACION DE ISONIAZIDA

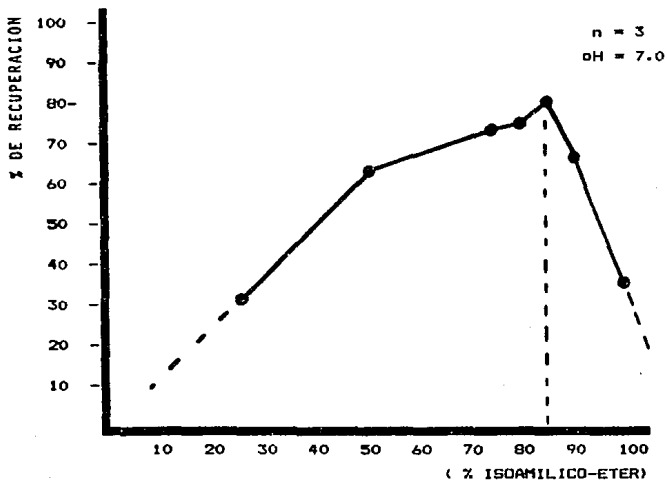


FIGURA No 5

INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA CONSTANTE DE REPARTO DE ISONIAZIDA
EN EL SISTEMA ALCOHOL ISOAMILICO-ETER ETILICO (89:15) / AGUA

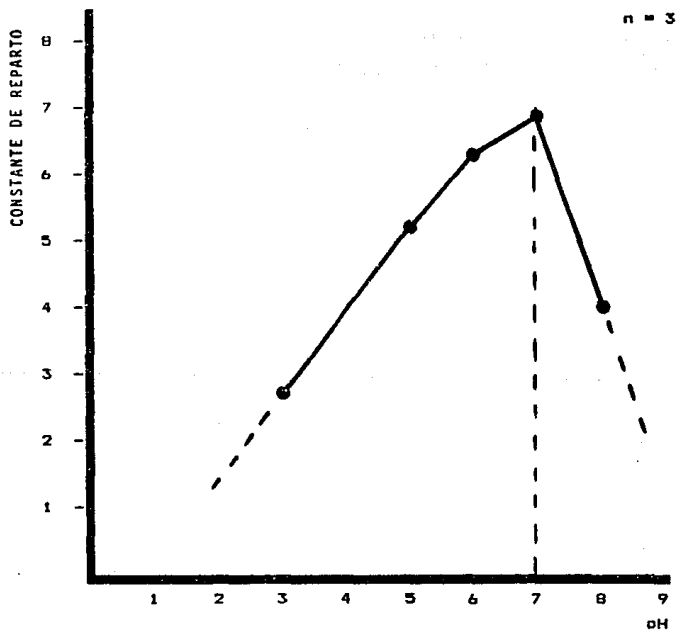


FIGURA No 6

DETERMINACION DE ISONIAZIDA EN ORINA (METODO DE PRODROMOS MODIFICADO)

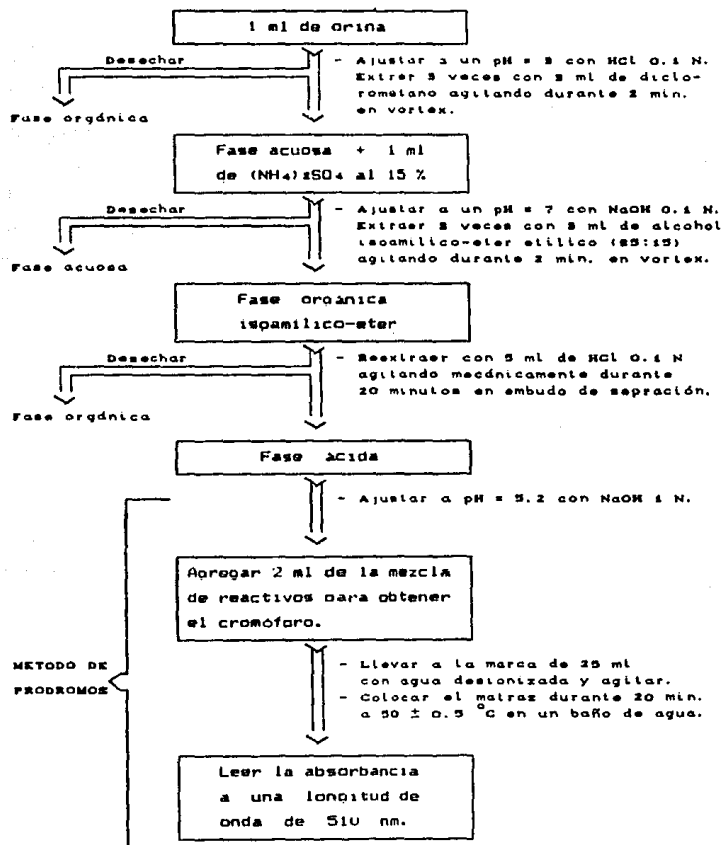


FIGURA No 7

CURVA DE CALIBRACION DE ISONIAZIDA EN ORINA

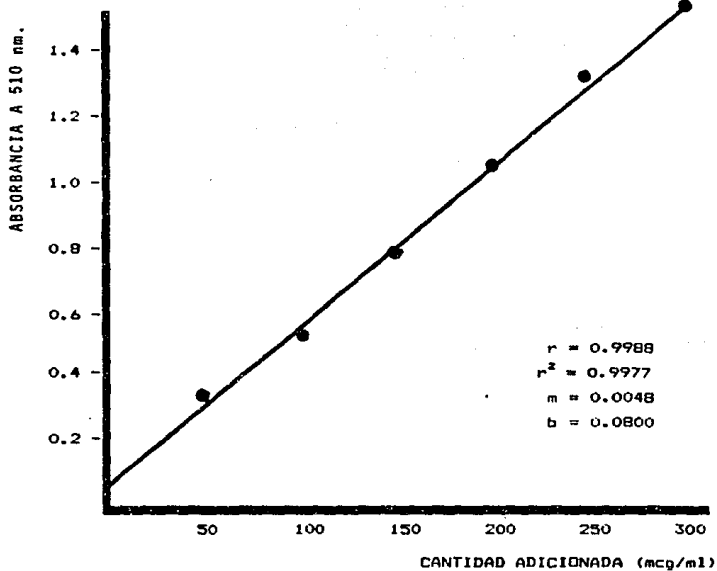


FIGURA No 8

CANTIDAD RECUPERADA DE ISONIAZIDA EN
FUNCION DE LA CANTIDAD ADICIONADA

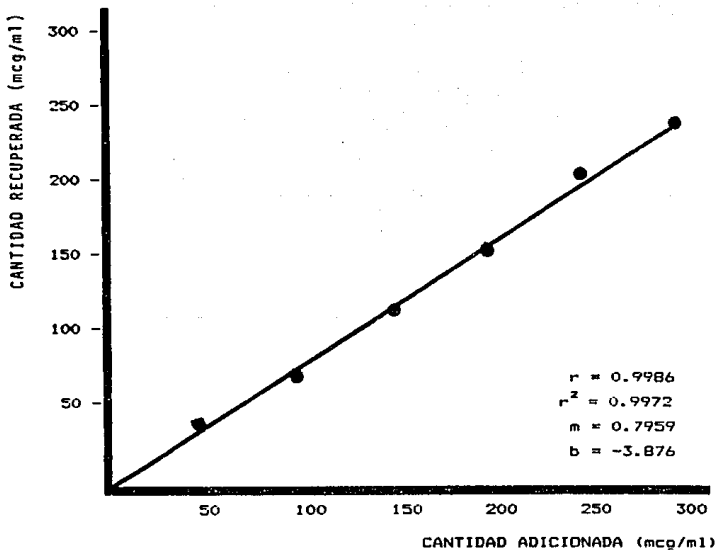


TABLA No 1

DATOS DE LA CURVA DE CALIBRACION DE ISONIAZIDA EN AGUA

ISONIAZIDA mcg/ml	ABSORBANCIAS A 510 nm			MEDIA	C.V.
0.8	0.175	0.177	0.177	0.1757	0.6573
1.6	0.359	0.359	0.360	0.3595	0.1606
3.2	0.587	0.583	0.582	0.5840	0.4530
4.0	0.715	0.709	0.707	0.7103	0.5861
4.8	0.861	0.869	0.864	0.8647	0.4674
5.6	1.045	1.038	1.051	1.0447	0.6228
6.4	1.080	1.086	1.086	1.0840	0.3196
8.0	1.295	1.295	1.300	1.2975	0.2226
9.6	1.521	1.520	1.523	1.5213	0.1004

 $r = 0.9954$ $r^2 = 0.9909$ $m = 0.1517$ $b = 0.1073$ $C.V. = 0.3989$

TABLA No 2

DATOS DE LA CONSTANTE DE REPARTO (CLOROFORMO/AGUA) Vs pH

pH	ABSORBANCIA (510 nm)		CONCENTRACION (mcg/ml)		K _D	% K _D
	F. orgánica	F. acuosa	F. orgánica	F. acuosa		
2	0.000	0.957	0.000	5.600	0.000	0.0
3	0.040	0.946	0.273	6.525	0.042	4.2
4	0.081	0.932	0.549	6.428	0.085	8.5
5	0.120	0.880	0.825	6.070	0.136	13.6
6	0.052	0.945	0.356	6.518	0.055	5.5
7	0.039	0.932	0.267	6.428	0.042	4.2
9	0.026	0.878	0.177	6.056	0.029	2.9
10	0.038	0.945	0.260	6.518	0.040	4.0
12	0.029	0.918	0.190	6.332	0.030	3.0
13	0.000	0.891	0.000	6.145	0.000	0.0

TABLA No 3

DATOS DE LA CONSTANTE DE REPARTO (DICLOROMETANO/AGUA) Vs pH

pH	ABSORBANCIA (510 nm)		CONCENTRACION (mcg/ml)		K _D	% K _D
	F. orgánica	F. acuosa	F. orgánica	F. acuosa		
2	0.000	0.916	0.000	6.318	0.000	0.0
3	0.000	0.916	0.000	6.318	0.000	0.0
4	0.000	0.916	0.000	6.318	0.000	0.0
5	0.062	0.944	0.428	6.511	0.066	6.6
6	0.069	0.916	0.474	6.318	0.075	7.5
7	0.125	0.888	0.860	6.125	0.140	14.0
8	0.069	0.833	0.474	6.745	0.083	8.3
9	0.055	0.944	0.377	6.511	0.058	5.8
10	0.055	0.888	0.377	6.125	0.061	6.1
11	0.041	0.944	0.280	6.511	0.043	4.3
12	0.000	0.944	0.000	6.511	0.000	0.0

TABLA No 4

DATOS DEL % DE ISONIAZIDA RECUPERADA Vs EL % DE LA MEZCLA ALCOHOL ISOAMILICO-ETER ETILICO

% DE MEZCLA ISOAMILICO-ETER	ABSORBANCIA A 510 nm.	% RECUPERADO
100 : 00	0.373	36.78
90 : 10	0.736	66.90
85 : 15	0.889	81.26
80 : 20	0.788	75.60
75 : 25	0.775	75.38
50 : 50	0.652	63.90
25 : 75	0.328	32.15

n = 3

pH = 7.0

TABLA No 5

DATOS DE LA INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA CONSTANTE DE REPARTO DE ISONIAZIDA EN EL SISTEMA ISOAMILICO-ETER (85:15) / AGUA

pH	ABSORBANCIA A 510 nm.		CONCENTRACION (mcg/ml)		K _D
	F. orgánica	F. acuosa	F. orgánica	F. acuosa	
3	0.630	0.296	3.444	1.243	2.75
5	0.752	0.227	4.250	0.788	5.40
6	0.775	0.213	4.400	0.696	6.35
7	0.790	0.205	4.490	0.643	6.98
8	0.701	0.251	3.912	0.946	4.10

n = 3

TABLA No 6

DATOS DE LA CURVA DE CALIBRACION DE ISONIAZIDA EN URINA

CANTIDAD ADICIONADA (mcg/ml)	ABSORBANCIA				CANTIDAD DETERMINADA (mcg/ml)			
	MEDIA				MEDIA			
50	0.367	0.348	0.340	0.3516	42.78	39.65	41.62	41.35
100	0.546	0.528	0.540	0.5380	72.27	69.31	71.29	70.96
150	0.790	0.792	0.800	0.7940	112.48	112.81	114.13	113.15
200	1.032	1.037	1.037	1.0360	152.37	153.19	153.52	153.03
250	1.322	1.327	1.288	1.3123	200.16	200.98	194.55	198.56
300	1.541	1.536	1.530	1.5336	236.12	235.42	234.43	235.33

TABLA No 7
EFFECTO DEL VOLUMEN DEL AGENTE COMPLEJANTE
 (valores de absorbancia promedio con $n = 3$)

ISONIAZIDA (mcg/ml)	VOLUMEN DE AGENTE COMPLEJANTE		
	1 ml	2 ml	3 ml
0.8	0.120	0.152	0.160
1.6	0.202	0.283	0.291
3.2	0.336	0.537	0.541
4.8	0.530	0.807	0.809
6.4	0.693	1.000	1.004
8.0	0.856	1.253	1.259
9.6	1.019	1.474	1.482

$r = 0.9994$	$r = 0.9992$	$r = 0.9994$
$r^2 = 0.9989$	$r^2 = 0.9985$	$r^2 = 0.9988$
$m = 0.1029$	$m = 0.1500$	$m = 0.1490$
$b = 0.0305$	$b = 0.0493$	$b = 0.0554$

TABLA No 8
EFFECTO DEL TIPO DE SOLVENTE SOBRE LA EXTRACCION
 (valores promedio de 4 observaciones en % a pH = 7)

% RECUPERADO	MEZCLAS DE SOLVENTES		
	CHCl ₃ -BUTANOL (70:30)	CHCl ₃ -METANOL (60:40)	ISOAMILICO-ETER (85:15)
FASE ORGANICA	46.61	27.31	81.26
FASE ACUOSA	51.39	72.69	18.74

TABLA No 9
 ENSAYO PRELIMINAR DEL METODO MODIFICADO PARA
 LA CUANTIFICACION DE ISONIAZIDA EN URINA

CANTIDAD ADICIONADA (mcg/ml)	ABSORBANCIA	% RECUPERADO
160	0.818	75.4612
160	0.814	75.0922
160	0.842	77.6752

n = 3

TABLA No 10
 LINEALIDAD DEL SISTEMA

ISONIAZIDA (mcg/ml)	ABSORBANCIAS		
	ANALISTA A	ANALISTA B	PROMEDIO
0.8	0.17567	0.14700	0.16100
1.6	0.35950	0.30450	0.33150
3.2	0.58400	0.55467	0.56900
4.0	0.71033	0.69650	0.70300
4.8	0.86467	0.83150	0.84800
5.6	1.04467	0.97083	1.00700
6.4	1.08400	1.05450	1.06866
8.0	1.29750	1.26567	1.28200
9.6	1.52133	1.47500	1.49800

$r = 0.9948$ $r^2 = 0.9896$ $m = 0.1572$ $b = 0.0891$

ANALISIS DE VARIANZA PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA

FUENTES DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Desviación de las medias debido a la regresión.	1	0.032575	0.032575	
Desviación de las medias dentro de los grupos.	24	7.3416×10^{-5}	0.001762	
TOTAL	25			F = 18.4874

$$F_{0.95}(1,24) = 4.26$$

Criterio de aceptación:

1. $r > 0.99$

2. $r^2 > 0.98$

3. Si $F_r > F_{tab}$, se acepta H_0 .

H_0 : El modelo lineal es correcto para describir la relación entre la cantidad adicionada y la respuesta obtenida.

TABLA No 11
LINEALIDAD DEL METODO

CANTIDAD ADICIONADA (mcg)	CANTIDAD RECUPERADA (mcg)	% RECUPERADO
50	41.3505	82.7010
100	70.9588	70.9958
150	113.1467	75.4311
200	153.0268	76.5134
250	198.5650	79.4260
300	235.3700	78.4567

$$r = 0.9986 \quad r^2 = 0.9973 \quad m = 0.7959 \quad b = -3.8767 \quad n = 3$$

Criterio de aceptación: 1. $r > 0.99$ 2. $r^2 > 0.98$

TABLA No 12
EXACTITUD Y PRECISION

150 mcg ADICIONADOS			300 mcg ADICIONADOS	
mcg	RECUPERADOS	% RECUPERADO	mcg RECUPERADOS	% RECUPERADO
D	144.5966	96.40	297.3529	99.12
I	141.8047	94.54	295.1593	98.39
A	142.8018	95.20	296.9541	98.98
	141.8047	94.54	296.9541	98.98
I	141.8047	94.54	294.9544	98.32
	144.5966	96.40	296.5552	98.85
	142.6023	95.07	294.7604	98.25
D	141.2064	95.47	294.1622	98.05
I	142.8018	95.20	293.3645	97.79
A	142.4029	94.94	294.1622	95.05
	143.0012	95.33	296.5552	98.85
2	143.4000	95.60	293.9627	97.99
	145.3942	96.93	293.9627	97.99
D	143.7989	95.87	288.9772	96.33
I	145.3942	96.93	294.5610	98.19
A	144.5966	96.40	292.7662	97.59
	145.7931	97.20	294.1622	98.05
3	144.7960	96.53	290.1738	96.72

PRECISION

MEDIA = 96.93.	Criterio : El coeficiente de
DESV. STD CONC. = 1.6528	variación debe ser de acuerdo
DESV. STD. DIA = 0.6855	al metodo.
DESV. STD. ERROR = 0.5729	-Cromatografico 2.0 %.
COEF. VAR. DIA = 0.7072 %	-Espectrofotométrico y
COEF. VAR. CONC. = 1.7051 %	químico 5.0 %.
INT. CONF. DIA = 95.5892 - 98.2764	-Microbiológico 5.0 %.
INT. CONF. CONC. = 93.6933 - 100.1723	-Fluidos biológicos 10 %.

EXACTITUD

t_{exp} (D₁₀) = 26.84t_{0.025} (25) = 2.301t_{exp} (conc.) = 11.13t_{0.075} (25) = 2.0301

Criterios:

H₀: El método es exacto para el día y la concentración.

Decisión: Si $t_{0.025} < t_{exp} < t_{0.075}$, se acepta H₀ y el método es exacto.

TABLA No 12
REPRODUCIBILIDAD
(% recuperados)

	150 mcg ADICIONADOS		300 mcg ADICIONADOS	
	ANALISTA A	ANALISTA B	ANALISTA A	ANALISTA B
D	93.03	93.56	98.70	98.84
I	92.61	93.96	96.47	98.57
A	93.31	96.69	98.90	98.37
	92.75	93.42	98.70	98.10
1	92.61	93.82	98.21	98.44
	92.89	94.10	98.49	98.30
	94.41	94.91	99.18	98.64
D	92.75	93.01	99.11	98.44
I	94.41	96.69	98.77	98.16
A	92.75	93.01	98.70	98.91
	94.69	93.01	98.90	98.37
2	94.00	94.91	99.04	98.71

ANALISIS DE VARIANZA PARA REPRODUCIBILIDAD

FUENTES DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F _{exp.}	F _{o.95}
ANALISTA	1	4.93227	4.93227	3.5067	18.50
DIA	2	2.81302	1.40651	1.2236	3.49
ERROR	20	22.99010	1.14950		

Criterios: Para Analistas.

H₀: No se modifica el porcentaje de recuperación cuando el método analítico lo realizan el analista uno y dos.

Para Días.

H₀: No se modifica el porcentaje de recuperación cuando el método analítico es realizado por los analistas en días diferentes.

Decisión: Si $F_{exp} < F_{o.95}$, se acepta H₀ y el método es reproducible.

TABLA No 14
LIMITE DE CUANTIFICACION

CANTIDAD ADICIONADA (mcg/ml)	ABSORBANCIA (nm)			MEDIA
150	0.7593	0.7570	0.7570	0.7578
120	0.5953	0.6107	0.5933	0.6011
90	0.4227	0.4673	0.4070	0.4323
60	0.2983	0.3243	0.2897	0.3041
30	0.1713	0.1720	0.1490	0.1641
15	0.0127	0.0430	0.0050	0.0202

$$r = 0.9966 \quad r^2 = 0.9932 \quad m = 0.0052 \quad b = -0.025$$

Límite de cuantificación: 13.8 mcg/ml.

TABLA No 15
LA ESPECIFICIDAD DEL METODO PARA ISONIAZIDA
PROBADO EN PRESENCIA DE SU PRINCIPAL METABOLITO
(ACETILISONIAZIDA)

CONCENTRACION (mcg/ml)	ABSORBANCIAS (nm)
160	ISONIAZIDA 1.00
160	ACEFILISONIAZIDA 0.02
160	ISONIAZIDA + ACETILISONIAZIDA 1.02

10. DISCUSIUN

Como ya se mencionó anteriormente, durante el desarrollo del método se probaron diferentes tipos de solventes con el fin de lograr la remoción de componentes de la muestra biológica, que pudieran interferir en la detección de isoniazida; determinando que para este propósito el solvente más adecuado es el diclorometano ya que por lo menos tenemos los pH's de 2, 3 y 4 en los cuales podemos hacer extracciones de limpieza y asegurar que sería mínima la cantidad de isoniazida extraída, esto se observa en la figura No 3.

Por otra parte, de acuerdo a las características de polaridad del cloroformo, se consideró como un posible solvente de limpieza para las muestra de orina, pero al realizar extracciones de isoniazida de soluciones acuosas a diferentes pH's, se consideró inadecuado debido a que en cualquier pH en el que se intentara la limpieza se extrae una cierta cantidad de isoniazida lo cual repercutiría en el % de recuperación (figura No 2). Sin embargo Hutchings (36), menciona una mezcla de cloroformo-butanol para realizar extracciones de isoniazida de muestras biológicas.

Al emplear el método modificado de Prodromos, se decidió trabajar con menores volúmenes para disminuir el consumo de reactivos. Considerando que la mezcla de reactivos para formar el cromóforo se agrega en exceso se disminuyó en proporción directa a la dilución deseada. Sin embargo se comprobó que la absorbancia obtenida era menor a las citadas por Prodromos, por lo que se procedió a probar cual era el volumen apropiado de la mezcla de reactivos para esta dilución. Se encontró que el volumen apropiado es de 2 ml y esto se observa en la tabla No 7, siendo este mismo volumen el señalado por el autor, pero para una dilución mayor.

Para probar la eficiencia de extracción de isoniazida, se trabajó con diferentes mezclas de solventes que se citan en la bibliografía; como son: alcohol isoamílico-éter etílico (21).

cloroformo-butanol (38) y cloroformo-metanol (11). Las dos últimas son empleadas en técnicas de HPLC y capa fina, y la primera es por espectrofotometría. Tomando como criterio el porcentaje extraído, se observa que es mucho mejor la mezcla de alcohol isoamílico-éter etílico ya que se obtuvo el mayor porcentaje de extracción de 81.26 %, con respecto a las de cloroformo-butanol y cloroformo-metanol que fueron de 48.61 % y 27.31 % respectivamente, estos datos se muestran en la tabla No 8.

La eficiencia de la extracción se mejoró con la adición de sulfato de amonio al sistema de solventes debido al efecto de "salting out" previamente descrito por otros autores (38, 31, 19), con la ventaja de que no interfiere en las etapas subsiguientes del método.

Con el propósito de poder determinar la mejor proporción de la mezcla de solventes seleccionada de alcohol isoamílico-éter etílico, se probaron varias proporciones de la mezcla, encontrando que la proporción más adecuada es la de 85:15 debido a que con ésta obtenemos el mayor % de recuperación (figura 4).

Habiendo obtenido la mejor proporción de la mezcla alcohol isoamílico-éter etílico, se procedió a determinar la influencia del pH en la extracción de isoniazida para dicha mezcla, encontrándose que el pH más favorable es 7.0 concordando con el empleado por Hutchings (36) (figura No 5).

Los resultados obtenidos en el ensayo preliminar con muestras de isoniazida en orina, corroboran que el método es funcional en cuanto a la repetibilidad y a la magnitud de las absorbancias (tabla 9).

Con lo que respecta a la validación del método empleado, éste resulta ser lineal en el intervalo de concentración de 0.5-10 mcg/ml, obteniendo un coeficiente de correlación 0.9983; además es adecuado para la determinación de microcantidades de isoniazida en orina estando en ventaja con respecto a otros métodos como el mencionado por Stewart: en el cual se deben

controlar algunos parámetros de manera estricta como son la temperatura, el tiempo de formación del complejo (cuya estabilidad máxima es de 90 minutos (19)) y tomar en cuenta que solo es aplicable a formas farmacéuticas.

Una de las ventajas que se le pueden atribuir al método modificado es la velocidad de formación del complejo (aprox. 15 min.) y su estabilidad que es por lo menos de 24 horas.

Los datos analíticos obtenidos para exactitud y precisión se muestran en la tabla No 12. en donde se observa que los resultados de C.V. del método propuesto son menores a un 3.0 % lo que indica la alta reproducibilidad de este; además a pesar de ser un método espectrofotométrico, el C.V. obtenido va de acuerdo a datos mencionados por otros autores en los que se emplea cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), como es el caso de Hutchings (36) que obtiene un C.V. de 3.7 % habiendo utilizado como fluido biológico orina; lo mismo sucede en el caso del método descrito por Lauterburg (40) en el que obtuvo un C.V. de 5.0 % utilizando plasma como fluido biológico.

En la determinación de isoniazida en orina esta puede ser satisfactoriamente cuantificada en presencia de su principal metabolito, la acetilisoniazida, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla No 15 consideramos que no es significativa la absorbancia del metabolito en comparación a la obtenida con isoniazida.

Con el método empleado en este estudio se obtuvo un porcentaje de extracción de 79.59 % debido a las etapas adicionales de limpieza de las muestras. Este dato es consistente como los mencionados por algunos autores que obtuvieron un 77 % y un 76 % empleando CLAR (35, 36). Es evidente que entre mayor sea el número de extracciones para la limpieza de las muestras, la eficiencia disminuye, pero mejora la separación de isoniazida del resto de los componentes de la matriz biológica que pudieran interferir en el método.

11. CONCLUSIONES

El método adaptado para la cuantificación de isoniazida en orina, se basa en la reducción de Fe(III) a Fe(II) por isoniazida bajo condiciones óptimas, y el Fe(II) reducido reacciona con la orto-fenatrolina para formar un complejo rojo-naranja altamente estable, cuya máxima absorción es a una longitud de onda de 510 nm. En la etapa de desarrollo las condiciones óptimas determinadas para la cuantificación de isoniazida son: extracciones a pH = 3 con el solvente diclorometano para llevar a cabo la limpieza de las muestras de orina, extracciones de isoniazida a pH = 7.0 con la mezcla alcohol isoamílico-éter etílico (85:15), reextracciones de isoniazida de la mezcla anterior con HCl 0.1 N y 2 ml del agente complejante para la formación del cromóforo.

El método resulta ser lineal dentro del intervalo de concentraciones de 0.5 - 10 mcg/ml; es preciso con coeficientes de variación menores a 5.0 % y es reproducible entre días y analistas de acuerdo a los criterios de validación empleados (por un análisis de varianza con prueba de F).

El límite de cuantificación es de 13.8 mcg/ml y el método puede ser considerado como específico para isoniazida en presencia de acetilisoniazida, la cual es su principal metabolito.

El método espectrofotométrico descrito para la determinación de isoniazida en orina, es de procedimiento largo pero sencillo y estadísticamente resulta ser exacto y confiable para los fines del estudio; los cuales fueron aportar un método que pudiera tener aplicaciones dentro la terapia antituberculosa cuantificando a isoniazida de una manera rápida y sencilla, y utilizando el espectrofotómetro como equipo básico.

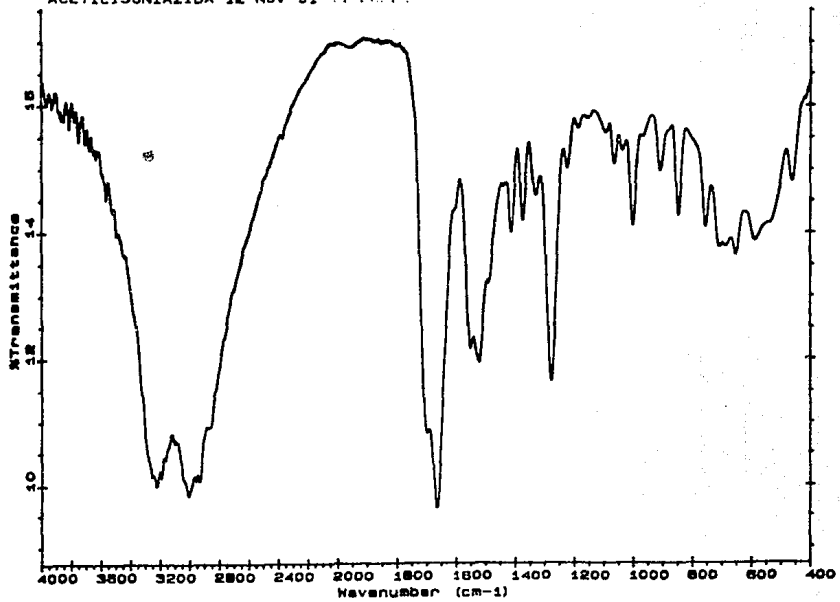
APENDICE No 1

Síntesis de acetilisoniazida (37)

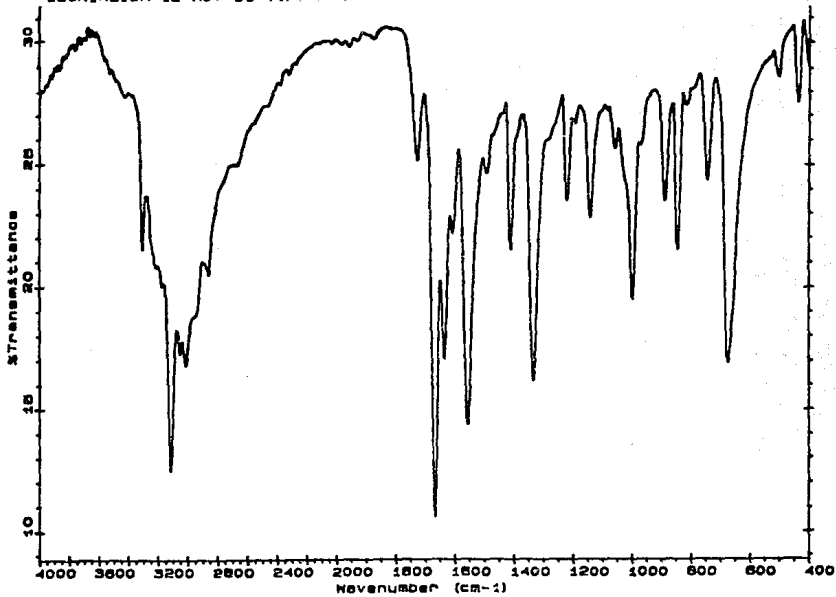
La acetilisoniazida fue sintetizada poniendo a reaccionar 1 gramo de isoniazida con 50 ml de anhídrido acético y 2 ml de piridina en un matraz de bola de 100 ml; se colocaron en agitación continua durante 12 horas a temperatura ambiente. El producto sintetizado fue recristalizado en una mezcla de metanol-dietil éter (1:4).

El punto de fusión del producto final fue entre 157 - 160 °C y el encontrado en la bibliografía es de 162 - 163 °C (10).

ACETILISONIAZIDA 12 Nov 81 11:00:00



ISONIAZIDA 12 Nov 91



APENDICE II

Determinación de isoniazida en agua (método Prodromos) (22).

Volúmenes de solución estándar de isoniazida correspondientes a 12 - 250 μg de isoniazida fueron transferidos cuantitativamente en un matraz volumétrico de 25 ml, y diluidos aproximadamente a 20 ml con agua desionizada. El pH de esta solución fue ajustada hasta 5.0 ± 0.2 con un volumen necesario de HCl ó NaOH 1 N. Posteriormente se le adicionan 2 ml de la mezcla de reactivos y se lleva a la marca con agua desionizada. se agita y se coloca durante 20 a 25 minutos en un baño de agua a 50 ± 0.5 °C. Finalmente la solución se deja enfriar hasta la temperatura ambiente en un baño de agua. La absorbancia de la solución rojo-naranja es leída a una longitud de onda de 510 nm, utilizando una solución blanco preparada bajo las mismas condiciones.

APENDICE No III

FORMULAS ESTADISTICAS EMPLEADAS EN LA VALIDACION

Linealidad del sistema.

Se realizó mediante un analisis de varianza.

Fórmulas:

$$\bar{v}_i = \frac{\sum y_{ij}}{n_i} = \frac{(v_{i1} + v_{i2} + \dots + v_{in})}{n_i}$$

$$q_1 = \sum n_i (\bar{y}_i - \bar{y})^2$$

$$\bar{y} = \frac{\sum \sum v_{ij}}{n} = \frac{\sum n_i \bar{v}_i}{n}$$

$$q_2 = \sum \sum (y_{ij} - \bar{v}_i)^2$$

$$n_i = \bar{v} + b (x_i - \bar{x})$$

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

Fuentes de variación	Grados de libertad	suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada
Desviación de las medias debido a la regresión.	r - 2	q ₁	q ₁ / (r - 2)	$\frac{q_1 (r - 2)}{q_2 (n - r)}$
Desviación dentro de grupos.	n - r	q ₂	q ₂ / (n - r)	
TOTAL	n - 2	q _T		

En donde:

\bar{v}_i = Valor promedio de absorbancia para cada concentración.

$\sum y_{ij}$ = Sumatoria de absorbancias para cada concentración.

\bar{v} = Promedio de absorbancias para todas las concentraciones.

\bar{x} = Promedio de concentraciones.

x_i = Valores individuales de concentración.

q_1 = Suma de cuadrados de la desviación de las medias debido a la regresión.

q_2 = Suma de cuadrados de la desviación de las medias dentro de grupos.

r = Número de réplicas.

n = Número total de réplicas para todas las concentraciones.

Linealidad del método:

Se determinó por medio de una regresión lineal de tipo:

$v = b + mx$. En donde:

v = Respuesta obtenida.

b = Ordenada al origen.

m = Es la pendiente.

x = Cantidades adicionadas de principio activo.

r = Coeficiente de regresión lineal.

r^2 = Coeficiente de correlación.

Exactitud y precisión:

Se llevó a cabo en base a un análisis de varianza utilizando 2 concentraciones diferentes, cada una por sextuplicado en tres días diferentes.

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado
Concentrac.	$a - 1$	$\frac{\sum v_{i..}^2}{br} - \frac{v_{...}^2}{abr}$	$\frac{S.C.c}{G.L.c}$	$\frac{C.M.c}{C.M.d}$
Día	$(b - 1)a$	$\frac{\sum \sum v_{ij.}^2}{r} - \frac{\sum v_{i..}^2}{br}$	$\frac{S.C.d}{G.L.d}$	$\frac{C.M.d}{C.M.e}$
Error	$(r - 1)ab$	$\sum \sum \sum v_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum v_{ij.}^2}{r}$	$\frac{S.C.e}{G.L.e}$	

En donde:

a = Número de concentraciones.

b = Número de días.

r = Número de repeticiones.

C.M.c. C.M.d. C.M.e = Cuadrado medio de la concentración, el día y error respectivamente.

S.C.c. S.C.d. S.C.e = Suma de cuadrados de la concentración, día y error respectivamente.

G.L.c. G.L.d. G.L.e = Grados de libertad de la concentración, día y error respectivamente.

Reproducibilidad:

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada
Analista	$a - 1$	$\frac{\sum v_{i..}^2}{b} - \frac{v_{...}^2}{abr}$	$\frac{S.C.a}{G.L.a}$	$\frac{C.M.a}{C.M.e}$
Día	$(b - 1)a$	$\frac{\sum \sum v_{ij.}^2}{r} - \frac{\sum v_{i..}^2}{br}$	$\frac{S.C.b}{G.L.b}$	$\frac{C.M.b}{C.M.e}$
Error	$(r - 1)ab$	$\sum \sum \sum v_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum v_{ij.}^2}{r}$	$\frac{S.C.e}{S.C.e}$	

En donde:

a = Numero de analistas.

b = Numero de días.

r = Numero de repeticiones.

C.M.a, C.M.b, C.M.e = Cuadrado medio del analista, día y error respectivamente.

S.C.a, S.C.b, S.C.e = Suma de cuadrados del analista, día y error respectivamente.

G.L.a, G.L.b, G.L.e = Grados de libertad del analista, día y error respectivamente.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Hernán de San Martín. " Salud y enfermedad " , 4^a edición. Ediciones científicas " La Prensa Médica Mexicana, S.A. " México 1985. págs.345-48.
- 2.- Teixeira. G. " Aspectos prioritarios para evaluar el tratamiento de la tuberculosis " , México, 1988 -Washington, D.C. Publicación científica de la OPS/OMS. No.511.
- 3.- Boxenbaum, G.H. and Riegelman, S. " Determination of isoniazid and metabolites in biological fluids " . J. Pharm. Sci. 63, 1191-97, 1974.
- 4.- Goodman-Gilman. " Bases farmacológicas de la terapéutica " , Ed. Médica Panamericana. México, 1982. 5^a edición, págs. 1177-79.
- 5.- García Valdecasas, F. " Farmacología " . 7^a edición. Librería ESPAX Barcelona, España. 1978. págs. 485-89.
- 6.- Hans R. Held and Landi S. " Bindino of toxic metabolites of isoniazid by aconiazide " . J. Pharm. Sci. 1980, págs.420-24.
- 7.- Remington's " Pharmaceutical Sciences " , 17^a ed. Ed. Médica panamericana, S.A., Argentina, 1987. págs. 1648-49.
- 8.- Dumont F. Elmendorf and jr. William. "The absorption, distribution excretion and short-term toxicity of isonicotinic acid hydrazide (nvdrazid) in man " . The Pharm. Press. 1952. 429-42.
- 9.- Martindale. " The extra pharmacopoeia " 27 th ed. staf. Great Britain. 1977. págs. 1581-1604.
- 10.- Clarke's. " Isolation and identification of drugs " . 2^a ed. Gran Bretaña. 1986. 688-89.
- 11.- Klaus. Florev; et al. " Analytical profiles of drugs substances " . U.S.A., 1977. 183-258.
- 12.- Brewer, A.G., " Isoniazid in florev. Analytical of drugs substances " . Ed. Academic. N.Y., 1974. 183-257.
- 13.- Ellard, G.A.and Wallace, M.S. "The determination of isoniazid and its metabolites acetvlisoniazid, monoacetvlhydrazine, diacetvlhydvdrazine, isonicotinic acid

- and isonicotinic glycolic acid in serum and urine ". Biochem. J. 126, 1972, 449-58. 14.- Turner, C.E. " Higiene del individuo y de la comunidad ". 2^a ed. Ed. La Prensa Medica Mexicana. México, 1976. pag.415-17.
- 15.- Organización Panamericana de la Salud. 3^{er} seminario regional sobre tuberculosis: Quimioterapia, Publicación No. 418, 1981.
- 16.- Hayes, E. " La tuberculosis pulmonar y sus complicaciones ". Ed. La Prensa Medica Mexicana, 1959, pag. 434.
- 17.- Control y tratamiento de la tuberculosis pulmonar. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Secretaria de Salud, México, 1987.
- 18.- Sumner, M. Kalman, M.D and Rh D.. " Drug assay the strategy of therapeutic drug monitoring ". Masson Publishing, U.S.A. Inc. 1979. 97-120.
- 19.- James T. Stewart and Settle, David. " Colorimetric determination of isoniazid with 9-chloroacridine ". J. of Pharm. Sci. 64, 1975, 1403-05.
- 20.- Michael E. El-Koosmos, Anal. B. Yanni. " Spectrophotometric determination of isoniazid using 6,7-dichloroquinoline-5,8-dione ". Analyst, 113, 1988, 1091-95.
- 21.- Russell, D.W. " Determination of isonicotinic acid hydrazide in urine " Clin. Chim. A., 31, 1971, 367-75.
- 22.- Issopoulou, B. Prodromos and Pantelis T., Economou. " A sensitive colorimetric determination of microquantities of isonicotinic acid hydrazine (isoniazid) ". Internatinal J. of Pharm. 57, 1989, 235-39.
- 23.- U.S. Pharmacopeia, 19 st. rev.: 1974 Eaton Company. Pag. 273, 671, 648.
- 24.- Hirtz, J. " Importance of analytical methods in pharmacokinetic and drug metabolism studies ". Biopharmaceutic and drug disposition. 7, 1986, 315-26.
- 25.- Montojo C. Garcia M.J. y Dominguez-Gil A " Monitorizacion de farmacos: importancia del error analitico ". Revista

A.E.F.H., 10, 1986, 257-62.

26.- Uinod P. Shah, Ph. D. " Analytical methods used in bioavailability studies a regulatory viewpoint ". Clin. Res. Practices and Drug Reg. Affairs. 5, 1987, 51-60.

27.- Industria Farmaceutica. C.I.F. 2 (2^a ep.), 25-28 (1983). La Validación: Un reto actual, normas para la práctica de una correcta validación.

28.- Secretaria de salud. " Control y tratamiento de la tuberculosis pulmonar ", Instituto Nacional de Enfermedades respiratorias, Mexico, 1987.

29.- Hashimi, M. H., Adil, A. S. " Colorimetric determination of isonicotinic acid hidrazide ". Microchim. Acta, 4, 1969, 772-77.

30.- Russell, D. W. " Simple method for determining isoniazid acetylator phenotipe ". British Medical J., 3, 1970, 324-25.

31.- Hornino, M. G.; et al. " Isolation of drug and drug metabolites from biological fluids by use of salt-solvent pairs ". Clin. Chem., 20, 1974, 282-87.

32.- Kumar K and Bimal Roy . aplicacionn of the least-squares method in the matrix form: simultaneous spectrophotometric determination of rifampicin and isoniazid in binary pharmaceutical formulations ". Analvt., 114, 1989, 1311-13.

33.- Sued, S. Mc. Gilverav. J.A. and Beavdoin. " Bioavailability of three isoniazid formulations ". J. Pharm. Sci., 66, 1977, 1761-64.

34.- Pinielopi C. Ioannou. " A more simple, rapid and sensitive flourometric method for the determination of isoniazid and acetylisoniazid in serum. Application for acetylator phenotyping ". Clin. chem. acta. 175, 1988, 175-82.

35.- Bailev, Leonard L. and Hamed-Abdeu. " High-performance liquid chromatographic analysis of isoniazid and its dosage forms ". J. pharm. Sci. 66, 1977, 564-68.

36.- Hutchings A., Monie K.D., et al. " High-performance liquid cromatographic analysis of isoniazid and acetylisoniazid in biological fluids ". J. of chormatography, 277, 1983, 385-300.

- 37.- Von sasson W., Castro-Parra M. Musch E. and eichelbaum M. " Determination of isoniazid, acetylisoniazid, acetylhydrazine and diacetylhydrazine in biological fluids by high-performance liquid chromatography ". J. of chromatography, 338, 1985, 113-122.
- 38.- Jan-olof Svensson; Armen Muchtar and orjar E. " Ion-pair high-performance liquid chromatographic. Determination of isoniazid and acetylisoniazid in plasma and urine ". J. of chromat. 341. 1985, 193-97.
- 39.- John A. Timbrell, Wright J.M. and Smith Clare M. " Determination of hydrazine metabolites of isoniazid in human urine by gas chromatography" J. of Chromatography, 138, 1977, 165-72.
- 40.- Lauterburg, B.H., Smith Charles V. and Mitchell J.K. " Determination of isoniazid and its hydrazino metabolites acetylisoniazid, acetylhydrazine and diacetylhydrazine in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry ". J. of chromatography, 224, 1981, 431-38.
- 41.- Matsui F. Robertson D.L. and lowering E.G. " Determination of hydrazine in pharmaceuticals III: hydralazine and isoniazid using G.L.C. ". J. of pharm. Sci., 72, 1983.
- 42.- D. Pankouw, P. Hoffmann. " Dichloromethane metabolite to carbon monoxide can be induced by isoniazid, acetona and fasting ". Arch. Toxicol. Suppl. 13, 1989, 302-303.
- 43.- Timbrel, J.A., Ph. D. and Thomas A.B. " Monoacetylhydrazine as a metabolite of isoniazid in man ". Clin. Pharmacol. Ther., 22, 1977, 602-08.