

00565 /



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

24

FACULTAD DE QUIMICA

ESTABLECIMIENTO DE UN METODO
ANALITICO PARA CUANTIFICAR
CLORTALIDONA EN ORINA

T E S I S

Que para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
FARMACIA (CONTROL DE MEDICAMENTOS)

p r e s e n t a

QFB. SALVADOR SALADO CARBAJAL

Asesor: Dra. Luz Elena Vera Avila



México, D. F.

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

00565



UNIVERSIDAD NACIONAL /
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

28j

ESTABLECIMIENTO DE UN METODO
ANALITICO PARA CUANTIFICAR
CLORTALIDONA EN ORINA

T E S I S

Que para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
FARMACIA (CONTROL DE MEDICAMENTOS)

p r e s e n t a

OFB. SALVADOR SALADO CARBAJAL



México, D. F.

1993

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: M. en C. Santiago Capella Vizcaino
PRIMER VOCAL: M. en C. Helgi Jung Cook.
SECRETARIO: Dr. José Luz González Chávez.
PRIMER SUPLENTE: M. en C. Carlos Ramos Mundo.
SEGUNDO SUPLENTE: M. en C. Juan Manuel Rodríguez.

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: CENTRO A. F. DE ESTUDIOS
TECNOLOGICOS S. A. (CAFET S.A.), MEXICO, D.F.**

SUSTENTANTE:



QFS. SALVADOR SALADO CARBAJAL

ASESOR:



DOCTORA LUZ ELENA VERA AVILA

**ESTABLECIMIENTO DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
CLORTALIDONA EN ORINA**

A DIOS

A MIS PADRES:
ENRIQUE SALADO ROMO Y AMPARO CARBAJAL GARCIA,
POR SU AMOR

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO,
POR LA OPORTUNIDAD QUE ME BRINDO

A DIOS

**A MIS PADRES:
ENRIQUE SALADO ROMO Y AMPARO CARBAJAL GARCIA,
POR SU AMOR**

**A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO,
POR LA OPORTUNIDAD QUE ME BRINDO**

Mi agradecimiento a mi asesora, la Doctora Luz Elena Vera y a los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones a este trabajo

Al Centro A. F. de Estudios Tecnológicos S.A., en especial a la Q.F.B. Araceli García, al Departamento de Análisis en Fluidos Biológicos y al Señor Jean Claude Savoir por las facilidades prestadas.

A mi maestra, la Q.F.B. Beatriz García con cariño.

A mis compañeros: Pedro Alonso, Rosa María López, Antonio Sierra y Raúl García, por todo lo que compartimos.

A mis hermanos, cuñadas y sobrinos.

A mis amigos, quienes me brindaron su ayuda incondicional

INDICE

RESUMEN/SUMMARY	1
INTRODUCCION	2
CAPITULO 1.	3
GENERALIDADES	
1.1 CLORTALIDONA	3
1.1.1 Monografía	3
1.1.2 Farmacología	14
1.1.3 Biodisponibilidad, Farmacocinética y Eliminación	15
1.1.4 Aspectos Comerciales y Regulatorios	16
1.1.5 Métodos Reportados Para el Análisis de Clortalidona en Fluidos Biológicos	18
1.2 METODOS ANALITICOS EN FLUIDOS BIOLOGICOS	26
1.2.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	26
1.2.2 Limpieza de Muestras	28
1.2.3 Validación	32
1.3 BIOEQUIVALENCIA	36
1.3.1 Generalidades	36
1.3.2 Requisitos en Canadá y en los Estados Unidos	37
1.3.3 Perspectivas en México	40
CAPITULO 2.	41
OBJETIVO	
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
2.2 OBJETIVO	41
CAPITULO 3.	42
PARTE EXPERIMENTAL	
3.1 Equipo, Material y Reactivos	42
3.2 Trabajo Previo	44
3.3 Desarrollo del Método	45
3.3.1 Sistema Cromatográfico	45
3.3.2 Obtención del Procedimiento de Limpieza de Muestras	47

3.4 Validación del Método	53
CAPITULO 4.	56
RESULTADOS	
4.1 Especificidad	56
4.2 Intervalo Lineal y Función Respuesta	56
4.3 Exactitud y Precisión	62
4.4 Sensibilidad	63
4.5 Eficiencia de la Extracción (Recobro Absoluto) ..	65
4.6 Estabilidad de la Muestra	66
CONCLUSIONES Y PROPUESTAS.	69
BIBLIOGRAFIA	70

RESUMEN

La Clortalidona es un diurético de baja toxicidad y acción prolongada usado en la terapia de hipertensión arterial. Se pretende realizar un estudio de bioequivalencia de comprimidos de Clortalidona administrando una dosis de 50.0 mg.

En este trabajo se desarrolló y validó un método analítico rápido, sencillo y barato para cuantificar Clortalidona en orina para ser usado en dicho estudio de bioequivalencia. Con el desarrollo se obtuvo un método por Cromatografía de líquidos de Alta Resolución usando una columna en fase reversa (C18) y una fase móvil compuesta por disolución amortiguadora de fosfatos 0.01M:Acetonitrilo (80:20, pH 7.0). La preparación de la muestra obtenida consiste en la extracción selectiva de la Clortalidona y su estándar interno (2,7-Dihidroxi-naftaleno) de la orina por medio de un cartucho de extracción en fase sólida con empaque químicamente enlazado CN, usando como disolvente de lavado agua. El análisis se hace en línea con ayuda de una válvula de conmutación de columnas, inyectando la muestra al cartucho de limpieza para su lavado y posterior conmutación a la columna analítica para su separación y monitoreo al UV a 214 nm.

La validación mostró que la Clortalidona se cuantifica de manera sensible, selectiva, lineal, exacta y precisa en el intervalo de 0.1 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con un recobro mayor al 88% y que es estable a diferentes condiciones de almacenamiento.

SUMMARY

Chlortalidone is a low toxicity and long action diuretic used in the high blood pressure therapy. A bioequivalence study of 50.0 mg Chlortalidone tablets is intended to conduct.

A fast, easy and unexpensable analytical method was developed and validated in this work to quantify Chlortalidone in urine, in order to be used in the bioequivalence study. The development resulted in a High performance Liquid Chromatography method using a reverse phase analytical column (C18) and a 0.01 M phosphate buffer:Acetonitrile (80:20, pH 7) mobile phase. The sample preparation consists in the selective extraction of the Chlortalidone and its internal Standard (2,7-Dihydroxynaphthalene) from the urine with a solid phase extraction cartridge filled with chemically bonded CN support, using water to wash the sample. The analysis is made on line with a column switching valve, injecting the sample into the cleaning cartridge to wash it and then switching to the analytical column to separate and to monitoring the analyte by UV absorbance at 214 nm.

The validation showed that the Chlortalidone is quantified in a sensible, selective, linear, accurate and precise manner in the range of 0.1 to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with a recovery higher than 88% and, that it is stable in different storage conditions.

INTRODUCCION

La Ley General de Salud, en su artículo 222, dispone que la Secretaría de Salud concederá la autorización para la venta de medicamentos cuando se demuestre que las sustancias que contengan reúnen las características de seguridad y eficacia exigidas.

Para el caso de productos farmacéuticos clasificados como genéricos una forma de demostrar la eficacia es con un estudio de bioequivalencia, en el cual se comparan dos productos, una formulación de prueba y una formulación referencia, administrados a un grupo de sujetos sanos voluntarios, y se miden las concentraciones del fármaco o uno de sus metabolitos en un fluido biológico tal como sangre total, suero, plasma u orina.

La cuantificación del fármaco y/o su metabolito debe llevarse a cabo con un método analítico bien caracterizado, el cual aporte la información de las concentraciones obtenidas de manera exacta, precisa y específica.

La Clortalidona es un producto genérico clasificado dentro de la categoría terapéutica como diurético de acción prolongada y baja toxicidad. Para obtener la autorización de venta en países desarrollados de un producto con este principio activo se le debe realizar, entre otras pruebas, un estudio de bioequivalencia.

Con base en lo anteriormente mencionado se hizo necesario contar con un método analítico que cuantificara de manera confiable a la Clortalidona en orina. El propósito de este trabajo fué el de desarrollar un método que fuera sencillo y rápido y validarlo de acuerdo a los criterios requeridos por organismos mundialmente reconocidos.

CAPITULO 1**GENERALIDADES****1.1 CLORTALIDONA****1.1.1. Monografía****- Nombre Genérico:**

Clortalidona

- Nombre Químico ⁽¹⁾ :2-Cloro-5-(2,3-dihidro-1-hidroxi-3-oxo-1H-isoindol-1-il)-
Bencensulfonamida.

2-Cloro-5-(1-hidroxi-3-oxo-1-isoindolinil) bencensulfonamida.

- Nombres Comerciales ⁽²⁾ :

Higrotón, Regrotón, Higro-long e Hidrotón.

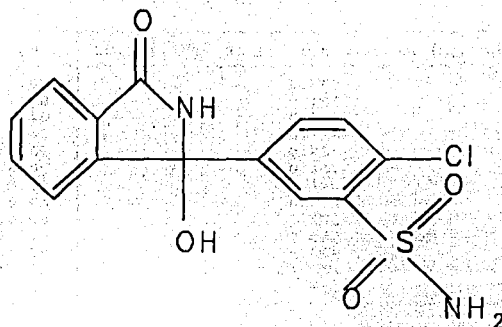
- Peso Molecular ⁽¹⁾ :

338.76

- Fórmula Condensada ⁽¹⁾ : $C_{14}H_{11}ClN_2O_4S$

- Fórmula Desarrollada ^(1,2) :

Figura 1.1. Clortalidona



- Análisis Elemental ⁽²⁾ :

El análisis elemental para la Clortalidona se muestra en la Tabla 1.1

Tabla 1.1

Elemento	Porcentaje
Carbono	49.59
Hidrógeno	3.28
Cloro	10.46
Azufre	9.46
Nitrógeno	8.31
Oxígeno	18.89

- Descripción ⁽¹⁾ :

La Clortalidona es un polvo blanco o blanco amarillento.

- Solubilidad ⁽²⁾ :

La clortalidona se considera prácticamente insoluble en agua, sin embargo su solubilidad varía de acuerdo al pH debido a la formación de la sal, como se muestra en la Tabla 1.2. Es muy soluble en disolventes tales como dimetilformamida, dimetil sulfóxido y metanol, soluble en alcohol e insoluble en cloroformo y éter.

Tabla 1.2. Solubilidad de la Clortalidona en agua en función del pH a temperatura ambiente.

pH	Solubilidad de la Clortalidona (mg/mL)
4.90	0.167
7.00	0.180
7.70	0.183
8.40	0.210
8.65	0.230
8.95	0.300
9.40	0.390
9.60	0.597
10.00	1.201
10.10	2.958
10.30	4.698
10.50	5.534
10.90	9.911

- Intervalo de Fusión ⁽²⁾ :

El intervalo de fusión reportado para la Clortalidona es de 215 a 226°C con descomposición, utilizando la técnica descrita en la farmacopea de los Estados Unidos (USP). Por calorimetría diferencial de barrido se obtiene un punto de fusión de 214°C; no se observa alguna endoterma de fusión al sobrecalentar, enfriar y volver a calentar la muestra, debido a la formación de un polvo amorfo.

- Polimorfismo ⁽²⁾ :

La Clortalidona presenta sólo una forma cristalina, ya que no se encontraron polimorfos de ésta al ser recristalizada de dimetilformamida/agua y analizada por rayos X y calorimetría diferencial de barrido.

- Constante de Ionización (2) :

La función sulfonamida de la Clortalidona se considera la responsable de la disociación ácida, presentando un pKa de 9.36 en agua, determinado espectrofotométricamente a 275 nm.

- Espectroscopia (2) :

Ultravioleta.- La Clortalidona presenta un máximo de absorción en aproximadamente 214 nm y un multiplete aromático en aproximadamente, 266, 275 y 283 nm como se muestra en la Figura 1.2.

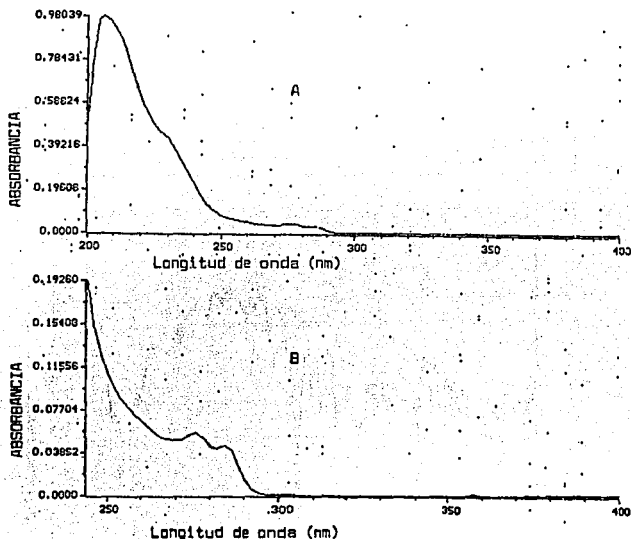


Figura 1.2. Espectro Ultravioleta de Clortalidona obtenido en un Espectrofotómetro UV/VIS Hewlett Packard de Arreglo de Fotodiodos modelo 8452A en una celda de cuarzo de 1 cm de longitud y a una concentración de Clortalidona de 10.0 µg/mL.

A) Intervalo de 200 a 400 nm

B) de 244 a 400 nm.

Infrarrojo: En la Figura 1.3 se muestra el espectro de absorción, en el cual se distinguen las siguientes bandas:

Tabla 1.3. Asignación de Bandas de Absorción al Infrarrojo de la Clortalidona

Banda (cm ⁻¹)	Intensidad	Asignación
3350	Media	Estiramiento O-H
3255	Media	Estiramiento O-H
1690	Fuerte	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{-C-NH} \end{array}$ Amida
1347	Fuerte	Sulfonamida
1170	Fuerte	Sulfonamida
1041	Fuerte	Flexión O-H
596	Fuerte	Estiramiento -Cl

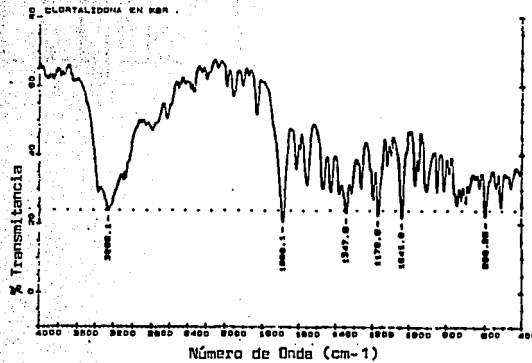


Figura 1.3. Espectro IR de la Clortalidona obtenido en una dispersión en Bromuro de Potasio en un espectrómetro IR con Transformadas de Fourier Nicolett modelo 205

Espectro de Masas: El espectro de Masas de la Clortalidona se muestra en la Figura 1. 4.

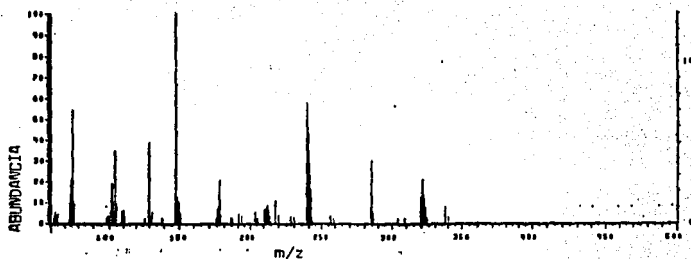
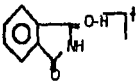

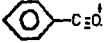
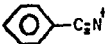
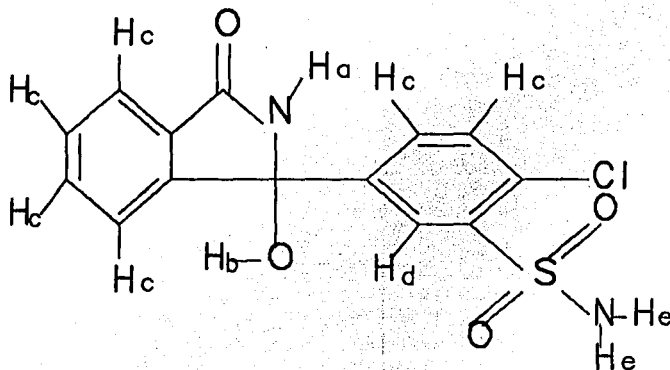


Figura 1. 4. Espectro de Masas de la Clortalidona utilizando ionización de Impacto de Electrones, obtenido en un equipo Varian MAT-112

Tabla 1.4. Asignación de señales características del espectro de masas de la Clortalidona

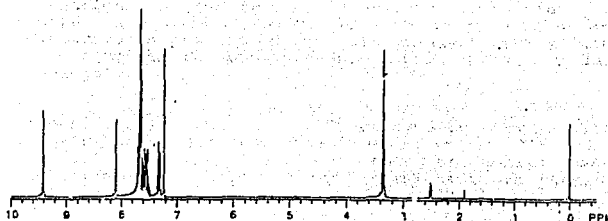
Pico	No. de Masa	Asignación
1	340	$M^+ + 2$ (Indica 1 Cloro)
2	338	M^+ (ION MOLECULAR)
3	321	$M^+ - OH$
4	285	$M^+ - H_2O - Cl$
5	239	$M^+ - H_2O - SO_2NH_2$
6	177	NO ASIGNADO
7	148	
8	130	
9	104	
10	102	

Resonancia Magnética Nuclear: El espectro de resonancia magnética nuclear de 1H se muestra en la Figura 1. 5, utilizando TMS como referencia interna, mostrándose también la asignación de bandas en la Tabla 1.5. Picos adicionales en el espectro son debidos a los disolventes.

Tabla 1.5. Asignación de bandas de ^1H 

Protón	Número de Protones	Escudo Químico	Multiplicidad
a	1	9.38	Singlete
b	1	7.20	Singlete
c	6	7.63 - 7.20	Multiplete
d	1	8.11	Doblete
e	2	7.63 - 7.48	Multiplete

Figura 1.5. Espectro de RMN de la Clortalidona en DMSO con TMS como referencia interna, obtenido en un instrumento JEOL FX 90Q.



- Síntesis y Purificación (2) :

El ácido 3-amino-4-clorobenzofenona-2-carboxílico se diazotiza, el cloruro de diazonio resultante se pone a reaccionar en frío con dióxido de azufre en ácido acético glacial en presencia de cloruro cúprico, para formar el cloruro de 4-cloro-2'-carboxi-benzofenona-3-sulfonilo (C). Calentando "C" con cloruro de tionilo se produce el 3-cloro-(3'-cloro-sulfonil-4'-clorofenil) ftalida, la cual es aislada, disuelta y puesta a reaccionar con amonio en frío en presencia de etanol. Se elimina el disolvente y el tratamiento del residuo con HCl produce la clortalidona cruda, la cual es recrystalizada en etanol acuoso. US pat 3,055,904.

- Estabilidad (1, 2, 3, 4, 5) :

La Clortalidona se considera estable como polvo seco a temperatura ambiente, ya que no se encontró degradación de la materia prima durante el almacenamiento en un periodo de 3 años.

En la Figura 1.6 se muestran los productos de degradación de la Clortalidona.

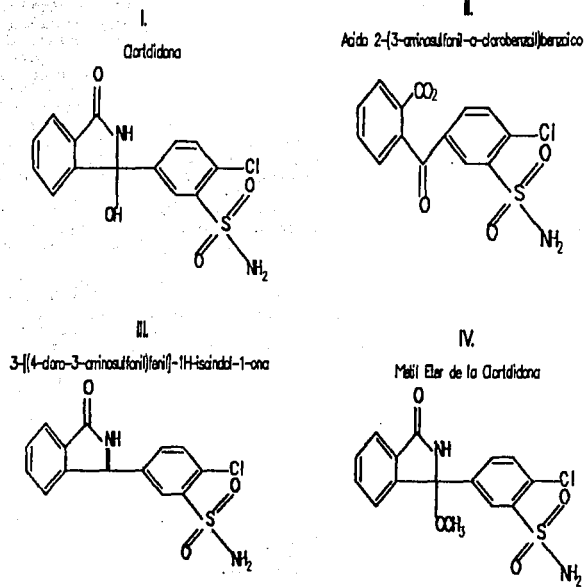
En 1983 Bauer J. y colaboradores (3) reportaron 2 productos de degradación de la clortalidona (I): el ácido 2-(3-aminosulfonil-4-clorobenzoil)-benzoico (II) y el 3-[(4-cloro-3-aminosulfonil)fenil]-1H-isoindol-1-ona (III). Estos compuestos se observaron al ser preparada la muestra de I con la técnica indicada por la USP XIX e inyectada a un sistema cromatográfico. La preparación de la muestra involucra extracción con acetona, evaporación y reconstitución del residuo en metanol acidulado. La degradación se produce en este último disolvente y depende del pH, de la cantidad de agua presente en la muestra y del tiempo de exposición.

Por otra parte. Sa'Sa' S. I. (4) reportó en 1988 la obtención de II al reflujar I con hidróxido de sodio al 20%. El método se desarrolló con el fin de obtener un método selectivo para clortalidona y atenolol en una formulación que combinaba los dos principios activos por cromatografía de líquidos.

En 1985 en un artículo reportado por Pandit N. K. y colaboradores(5) se informa acerca de la formación de éteres de I con alcoholes, en presencia de ácidos inorgánicos fuertes y específicamente con metanol (IV).

Cabe mencionar que la USP XXII(1) requiere la cuantificación de II como una prueba de límite de impurezas para la materia prima, bajo el nombre de "Límite de ácido 4'-Cloro-3'-Sulfamocil-2-benzofenona carboxílico (CCA)".

Figura 1.6. Productos de degradación Reportados para la Clortalidona



1.1.2. Farmacología

- Mecanismo de Acción (6, 7):

La Clortalidona es un diurético sulfonamídico, que difiere en su estructura de las tiazidas y benzotiazidas debido a la naturaleza de su anillo heterocíclico, pero su acción farmacológica es similar. Su acción principal es aumentar la excreción renal de cloruro y sodio con el volumen de agua acompañante. Aunque es inhibidor débil de la anhidrasa carbónica, el mecanismo de acción principal es la inhibición del transporte activo de Na^+ y su ion acompañante (Cl^-) desde los túbulos renales hacia la sangre, pero la localización precisa y el mecanismo por el cual se efectúa todavía no se conoce. Se ha observado que no interacciona directamente con la ATPasa dependiente de Na^+/K^+ aislada de células renales, por lo tanto se sugiere que inhibe a este sistema enzimático de manera indirecta actuando sobre una de las enzimas que intervienen en las vías de síntesis de la ATPasa. Como la síntesis de la ATPasa no se lleva a cabo solamente en tejido renal, la acción selectiva sobre el transporte sódico renal se explica por la acumulación del fármaco a este nivel.

Otra acción es la de producir un aumento importante en la excreción de K^+ y Mg^{2+} y disminuir la excreción de ácido úrico sin modificar la excreción de I^- y Br^- .

Por último, se ha visto que al inicio del tratamiento con Clortalidona o fármacos relacionados se disminuye el gasto cardíaco y el volumen sanguíneo; pero con la terapia crónica el gasto cardíaco se normaliza, la resistencia vascular periférica disminuye y hay una reducción persistente del líquido extracelular y del volumen plasmático, provocando así un efecto antihipertensivo. Este efecto es atribuido a la excreción de sodio provocado por el fármaco, aunque se ha sugerido que hay una acción sobre el músculo liso arteriolar con lo que se logra la resistencia vascular periférica.

- Toxicidad y Efectos Adversos (6, 7):

La toxicidad de la Clortalidona a altas dosis provoca la depresión del Sistema Nervioso Central. Se han presentado casos inesperados de hipersensibilidad al fármaco manifestada como púrpura, dermatitis con fotosensibilidad, vasculitis necrotizante y depresión de los elementos figurados de la sangre.

El uso de este diurético puede provocar hipocalcemia, aumento del nivel de ácido úrico en la sangre, aumento de la glucemia y disminución de la tolerancia a la glucosa y agrava cuadros de insuficiencia renal y/o hepática.

- Usos (8):

En la iniciación y mantenimiento de la terapia de la insuficiencia cardiaca congestiva; en padecimientos renales edematosos (nefrosis, nefritis); edema del embarazo, síndrome premenstrual; coadyuvante en la terapia corticosteroidea y de otros fármacos que inducen la retención de electrolitos y líquidos y en hipertensión. En este último caso es especialmente efectiva para potenciar la acción y reducir la dosificación de otros agentes hipotensores.

- Dosificación (8):

En el tratamiento del edema administrar 50-100 mg diarios o 100 mg 3 veces por semana; dosis diaria máxima: 200 mg. En el tratamiento de la hipertensión dar una sola dosis diaria de 25-50 mg; dosis diaria máxima: 100 mg. Para niños en todos los usos dar 2 mg/Kg 3 veces por semana.

1.1.3. Biodisponibilidad, Farmacocinética y Eliminación.

La biodisponibilidad de la Clortalidona ha sido estudiada por varios autores, reportándose en un estudio⁽⁹⁾ los siguientes parámetros para 12 sujetos a los cuales se les administró una dosis única de 50 mg de Clortalidona en tabletas. Las concentraciones de Clortalidona en sangre total y orina se monitorearon por un lapso de 120 horas después de ser administrada:

Tabla 1.6
Parámetros de Biodisponibilidad de la Clortalidona

Parámetro	Media ± Desviación Estándar
Área Bajo la Curva de cero a infinito (AUC _{0-inf} , mg Hr/Litro)	336 ± 53
Constante de Absorción (K _a , Hr ⁻¹)	0.253 ± 0.170
Constante de Eliminación (β, Hr ⁻¹)	0.020 ± 0.010
C _{max} (mg/L)	4.62 ± 0.80
T _{max} (Hr)	10.8 ± 5.0
T _½ (Hr)	46 ± 22.2
Cantidad Excretada en Orina de 0-120 Hr. (mg)	22.1 ± 5.6 (44.2% ± 11.2%)

Por otra parte, se ha reportado una fuerte unión del fármaco a eritrocitos, asociado a la enzima anhidrasa carbónica⁽¹⁰⁾, encontrándose que aproximadamente el 98% de la Clortalidona en sangre se une a estos. En plasma, en ausencia de eritrocitos, aproximadamente el 75% se une débilmente a proteínas, principalmente a la albúmina. Estos datos explican la gran vida media de la Clortalidona.

La vía de eliminación principal es por orina (del 30 al 60%) y la fracción remanente se elimina por hígado ya sea por metabolismo o excreción fecal. Aún no se conoce la vía metabólica del fármaco pero se ha reportado el ácido 4'-Cloro-3'-Sulfamoiil-2-benzofenona carboxílico (CCA) como metabolito encontrado en ratas, aunque no se ha detectado en orina o bilis humana.

1.1.4. Aspectos Comerciales y Regulatorios.

La Clortalidona es un fármaco catalogado como genérico en los Estados Unidos⁽¹³⁾ y está registrado en el cuadro básico de medicamentos en México⁽¹⁴⁾. En cuanto a su regulación, su monografía aparece en las Farmacopeas comúnmente utilizadas en nuestro país, como son: la de los Estados Unidos Mexicanos⁽¹¹⁾ (FEUM), la de los Estados Unidos⁽¹⁾ (USP) y la Británica⁽¹²⁾ (BP), tanto como materia prima como en la forma farmacéutica de comprimidos.

Por otra parte, en el Libro de Especialidades Farmacéuticas "PLM"⁽⁵⁾, libro especializado en dar información acerca de medicamentos, laboratorios farmacéuticos, etc., se reporta un sólo laboratorio que produce Clortalidona en comprimidos a una dosis de 50 mg y en comprimidos combinada con otros fármacos antihipertensivos como el Atenolol, Oxprenolol y Reserpina. La BP reporta para los comprimidos dosis de 50 y 100 mg. En los Estados Unidos el "Orange Book"⁽¹³⁾ de 1993, libro especializado en dar información legal acerca de fármacos en el mercado, patentes, regulación de bioequivalencia, etc., reporta 18 laboratorios productores de Clortalidona en comprimidos a dosis de 25 y 50 mg, siendo el "Hygroton" producido por los laboratorios Rhone Poulenc a una dosis de 50 mg, el producto innovador. Además reporta otros comprimidos de clortalidona combinada con otros fármacos antihipertensivos, como el Atenolol, Clonidina, Tartrato de Metoprolol, y Reserpina. A todos los productos se les solicita necesariamente el estudio de bioequivalencia para poder ser vendidos como genéricos en los Estados Unidos. Para establecer la bioequivalencia de Clortalidona sólo en comprimidos, se dispone de una guía de Biodisponibilidad Biofarmacéutica aprobada por la oficina de fármacos y alimentos de los Estados Unidos (FDA) el 5 de Julio 1983 y vigente hasta la fecha, la cual indica lo siguiente⁽¹⁶⁾:

A) Estudio de Bioequivalencia

El estudio de Bioequivalencia de la Clortalidona debe ser conducido con un diseño cruzado de dos vías, empleando por lo menos 20 sujetos. Los sujetos deben ser voluntarios varones adultos sanos y

deben ser seleccionados con base en exámenes físicos, historia médica y pruebas de laboratorio clínico.

Los sujetos no deben de tomar medicamentos durante una semana antes del estudio y durante el estudio. No se les permite consumir alcohol por lo menos 48 horas antes de la administración de la Clortalidona. Se debe observar un periodo de lavado de 14 días entre las dosis.

El producto de prueba, debe ser un lote de producción o un lote producido bajo condiciones de producción. El producto de referencia deben ser tabletas de 25 mg de Hygroton, fabricado por los laboratorios USV. Debe administrarse una sola dosis de tabletas de 2 x 25 mg de los productos de prueba y referencia, con 240 mL de agua, después de un ayuno de una noche. Los sujetos deben continuar con el ayuno por dos horas más después de la administración de la dosis.

Se deben obtener muestras de sangre a las 0 (justo antes de dosificar), 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas y colectar muestras de orina a las 0, 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-12, 12-24, 24-48, 48-72, 72-96 y 96-120 horas después de la administración del fármaco. El análisis de todas las muestras debe hacerse usando un método específico para la valoración del fármaco, por ejemplo, Cromatografía de Gases o de Líquidos de Alta Presión. La valoración de la Clortalidona en las muestras de sangre debe hacerse en sangre total, no en plasma o suero.

La presión sanguínea (sistólica/diastólica) debe monitorearse antes del estudio y a los siguientes tiempos después de la dosis: 0, 0.5, 1, 2, 3, 6, 8, 12, 24, 48 y 72 horas.

El análisis estadístico de los datos debe incluir: el Análisis de Varianza de 2 vías considerando a la secuencia como un factor entre sujetos (10 sujetos/secuencia) y a los productos como un factor dentro de sujeto.

El requisito de los comprimidos de 50 mg será dado por bueno si cumple con las siguientes condiciones:

1. Los comprimidos de 50 mg deben ser proporcionales en sus ingredientes activos e inactivos a los comprimidos de 25 mg.
2. Los comprimidos de 50 mg deben tener una disolución similar a los comprimidos de 25 mg.
3. El estudio de Biodisponibilidad in vivo de los comprimidos de 25 mg debe ser aceptable.

B) Guía de Disolución

Fármaco: Comprimidos de Clortalidona

Estudio in vivo: Requerido

Número de Unidades a ser probadas: 12 (del mismo lote usado en el estudio de Biodisponibilidad in vivo en el caso de comprimidos de 25 mg)

Tiempos de Muestreo: 60 Minutos

Método:

a) Aparato: USP XX aparato II
 b) RPM: 75
 c) Medio: 900 mL de agua
 d) Temperatura: 37°C

Especificaciones: No Menos de 70% en 60 Minutos.

C) Guía de Uniformidad de Contenido

Debe determinarse la uniformidad de contenido (UC) de 10 tabletas, del mismo lote usado en la prueba de disolución, y los resultados deben presentarse junto con éstos. Para la prueba de UC de los comprimidos de 25 mg, las unidades dosificadas deben ser del mismo lote usado en el estudio de Bioequivalencia in vivo.

1.1.5 MÉTODOS REPORTADOS PARA EL ANALISIS DE CLORTALIDONA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

Se han reportados algunos métodos para cuantificar Clortalidona en fluidos biológicos, a continuación se describen algunos de ellos en orden cronológico.

- Método 1 ⁽³¹⁾ :

Este método fué publicado por Tweeddale y Ogilvie en 1974 para determinar Clortalidona en orina, sangre total, bilis, plasma y glóbulos rojos de la sangre y consiste en lo siguiente:

En un matraz de 125 mL de capacidad, colocar 2 mL de muestra, adicionar 2 mL de una disolución amortiguadora pH = 5 de ácido cítrico-fosfato de sodio dibásico 1 M y 25 mL de éter. Agitar mecánicamente la mezcla por 10 minutos y dejar separar las fases; decantar la capa etérea y colocar 20 mL de ésta un embudo de separación que contiene 2 mL de NaOH 2 N. Agitar mecánicamente la mezcla por 5 min. y transferir la fase acuosa a un tubo de vidrio con tapa de plástico.

Determinar la absorbancia del extracto alcalino de cada muestra a 262 nm usando blanco de reactivos como blanco en una celda de 10 mm de longitud (A₁). Después de esto, regresar cada extracto a su tubo, tapar e incubar a 97°C durante dos horas, dejar enfriar a temperatura ambiente en un baño de hielo. Finalmente determinar la

absorbancia de cada muestra a 262 nm contra el blanco de reactivos incubados (A_2). La diferencia entre las absorbancias ($A_1 - A_2$) es proporcional a la concentración de Clortalidona en las muestras.

Determinar las concentraciones de las muestras contra una curva patrón preparada de manera similar de 0, 5, 10 y 20 mg/L, teniendo una referencia interna de 20 mg/L como control del recobro absoluto y del proceso de desaminación producido en la incubación.

- Método 2 ⁽³²⁾ :

Método diseñado por Fleuren y Rossum y publicado en 1978, el cual reporta la determinación de Clortalidona en plasma, orina y glóbulos rojos de la sangre por cromatografía de gases (CG). Este autor discute los inconvenientes del uso de métodos espectrofotométricos descritos por carencia de sensibilidad y el método por CG reportado por Ervik y Gustavii⁽³³⁾ por su alta variabilidad. Esta técnica utiliza el siguiente equipo:

Cromatógrafo de gases con las siguientes características:

Columna: Columna de vidrio silanizada (1.8m x 3 mm DI) empacada con SE-30 al 3% sobre Gas-Crom Q (malla 80-100).

Temperatura: 270 °C para la columna, 320 °C para el puerto de inyección y 360 °C para el detector.

Gases usados: Helio como gas acarreador a un flujo de 60 mL/min, hidrógeno y aire para el detector a un flujo de 30 y 180 mL/min respectivamente.

Detector: Detector Dual de Nitrógeno (Detector de Ionización de Flama Alcalina) con cristal de bromuro de rubidio.

Inyección: 5 µL.

En general, la preparación de las muestras es la siguiente:

Colocar la muestra en un tubo de ensaye, adicionar una disolución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, 0.067 M y el estándar interno (4-Cloro-N¹-metil-N¹-(3-metoxipropil)-1,3-bencendisulfonamida). Extraer con una mezcla de isobutil metil cetona-etanol (100:2 v/v), centrifugar a 3000 rpm y transferir la capa orgánica a un tubo de ensaye. La Clortalidona se extrae con hidróxido de sodio 0.1 M. Transferir la fase acuosa a un tubo de ensaye adicionar hidróxido de tetrabutilamonio 0.1 M, mezclar y agregar iodometano 0.75 M en diclorometano. Agitar 20 min. con temperatura controlada a 50 °C, centrifugar y transferir la capa orgánica a otro tubo de ensaye evaporar a sequedad con flujo de aire a 40 °C. Al residuo adicionar hexano y colocarlo en baño de ultrasonido, evaporarlo y reconstituir el residuo en etanol para su inyección al sistema cromatográfico.

- Método 3 ⁽³⁴⁾ :

Este método fue publicado por Guelen, Baars y Vree en 1980 con el objeto de determinar a la Clortalidona en sangre total, plasma y orina, usando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). En él se discute la falta de sensibilidad de otra técnica por CLAR⁽³⁵⁾. La Técnica descrita en este artículo utiliza el siguiente sistema cromatográfico:

Columna: Columna de acero inoxidable (15cm x 4.6 mm DI) empacada con Lichrosorb RP18 (tamaño de partícula de 5 μ m).

Detector: Detector de longitud de onda variable operado a 226 nm.

Fase Móvil: Acetato de sodio 0.01 M. en agua:acetonitrilo (400:100) a un flujo de 1.6 mL/min.

Inyección: 100 μ L.

La preparación de las muestras para sangre total y orina descritas son las siguientes:

- Sangre total: Mezclar 0.1 mL de la muestra con 0.4 mL de ácido perclórico 0.33 N a 4 °C y agitar en un mezclador tipo vórtice durante 5 min. Centrifugar la muestra a 2600 g por 5 min. e inyectar al cromatógrafo.

- Orina: Mezclar 10 μ L de la muestra con 0.2 mL de agua e inyectar al cromatógrafo.

Se reporta un porcentaje de recobro de la Clortalidona en el intervalo de concentración de 1 a 10 μ g/mL de 47.6 \pm 2.7% en sangre total y de 100 \pm 2 % para orina.

- Método 4 ⁽³⁶⁾ :

Este trabajo trata de la biodisponibilidad de la Clortalidona y el Atenolol en humanos en una formulación con estos principios activos en combinación. Está enfocado principalmente a la biodisponibilidad de éstos y hace una breve descripción del método de análisis, en el cual se utiliza el siguiente sistema cromatográfico:

Columna: Columna de 20 cm x 1/4" DE empacada con Spherisorb ODS (tamaño de partícula de 10 μ m), para sangre.
Columna de 20 cm x 1/4" DE empacada con Hypersil ODS (tamaño de partícula de 5 μ m), para orina.

Detector: Detector de longitud de onda variable operado a 204 nm, para sangre.
Detector de longitud de onda variable operado a 220 nm, para orina.

Fase Móvil: metanol:agua (50:50) a un flujo de 1.0 mL/min para sangre.
acetonitrilo:agua (30:70) a un flujo de 1.0 mL/min para orina.

Inyección: 20 µL.

La preparación de las muestras para sangre total y orina descrita es la siguiente:

Mezclar 1.0 mL de la muestra con 80 µL del estándar interno, adicionar 1.0 mL de disolución amortiguadora de fosfatos/citratos pH 5 y 10 mL de éter dietílico. Agitar por 15 minutos y centrifugar para separar las fases, transferir 9 mL de la capa etérea a otro tubo que contiene 1 mL de hidróxido de sodio 0.1 M. Agitar la mezcla por 10 min. y centrifugar para separar las fases, eliminar el éter dietílico y adicionar 1 mL de fosfato de potasio monobásico 5.0 M y 5 mL de acetato de etilo a la fase acuosa. Después de agitar por 10 min. y centrifugar, separar 4.8 mL de la fase orgánica y evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Redisolver el residuo en 400 µL de metanol:agua 50:50 para inyectarse al sistema cromatográfico.

No reporta porcentaje de recobro ni cromatogramas de las muestras, sólo que se tuvieron que hacer cambios al sistema cromatográfico para mejorar la selectividad en las muestras de orina.

- Método 5 ⁽⁹⁾ :

Este método sólo se describe brevemente en un estudio de biodisponibilidad de Clortalidona en una publicación hecha en 1982 por Rogers L. y colaboradores, en la cual se determina la Clortalidona en sangre total y orina usando CLAR. El sistema cromatográfico utilizado en este artículo no se describe, sólo que se utilizó detección al UV a 210 nm para la sangre total y 250 nm para la orina, obteniendo una sensibilidad de 200 ng/mL y 750 ng/mL y con una precisión de 5.0% y 6.6% respectivamente.

La preparación de las muestras para sangre total y orina descrita es el siguiente:

- **Sangre total:** Mezclar 0.2 mL de la muestra con un volumen igual de agua, colocar en baño de ultrasonido por 5 min, y entonces mezclar con acetonitrilo que contiene el estándar interno (Clorhidrato de Fentolamina). Después de agitar y centrifugar el sobrenadante, transferirlo a un tubo limpio y evaporar a aproximadamente 0.4, mL para ser inyectado al sistema cromatográfico.

- Orina: Se procesa igual que la sangre total, excluyendo los pasos del baño de ultrasonido y la centrifugación y utilizando Senobarbital sódico como estándar interno.

- Método 6 ⁽³⁷⁾ :

Este método fué publicado por Rosenberg, Lam y Dorsey en 1986, con el objeto de determinar la Clortalidona en sangre total usando CLAR y en éste se habla del pobre recobro de otras técnicas reportadas por CLAR^(34, 38). La Técnica descrita en este artículo utiliza el siguiente sistema cromatográfico:

Columna: Columna de acero inoxidable (30 cm x 4.6 mm DI) empacada con μ Bondapak RPCN (tamaño de partícula de 10 μ m).

Detector: Detector de longitud de onda variable operado a 214 nm.

Fase Móvil: tetrahidrofurano:acetonitrilo:agua (2.0:0.5:97.5) conteniendo fosfato de dibutilamina ajustado a un pH de 5.0 con hidróxido de sodio 2 M y operado a un flujo de 2.5 mL/min.

Inyección: 25 μ L.

La preparación de las muestras es la siguiente:

Mezclar una alícuota de 160 μ L de la muestra con 480 μ L de una disolución acuosa de sulfanilamida (estándar interno). Agitar la mezcla y colocarla en un baño de ultrasonido por 15 min. Adicionar 6 mL de acetonitrilo y colocarla en baño de ultrasonido por 15 min. Después, centrifugar por 10 min a 4 °C y decantar el sobrenadante a un tubo limpio para evaporarlo a sequedad en un baño de agua a 40 °C bajo corriente de Nitrógeno. Reconstituir el residuo en 80 μ L de fase móvil e inyectar al cromatógrafo.

Se reporta linealidad entre 0.20 a 5.27 μ g/mL con un porcentaje de recobro de la Clortalidona de 86.1 \pm 5% con una exactitud relativa de \pm 5.0% y una precisión del 7.7% en el peor de los casos.

- Método 7 ⁽³⁹⁾ :

Método publicado por Muirhead y Christie en 1987 para cuantificar Clortalidona en sangre total usando CLAR. Se discute, entre otras cosas, que el recobro de las técnicas descritas por Rosenberg y por Williams usando CLAR y precipitación con acetonitrilo^(37, 38) no es bueno, además menciona que la técnica publicada por MacGregor y colaboradores⁽⁴⁰⁾ presenta una preparación de la muestra laboriosa. La Técnica descrita en este artículo utiliza el siguiente sistema cromatográfico:

Columna: Columna de acero inoxidable (25 cm x 5 mm DI) empacada con LiChrosorb RP18 (tamaño de partícula de 10 μm).

Detector: Detector de longitud de onda variable operado a 214 nm.

Fase Móvil: Acetato de Sodio 0.01 M en agua:acetonitrilo (77:23). con un flujo de 1.5 mL/min.

Inyección: 25 μL .

La preparación de las muestras es la siguiente:

Mezclar una alícuota de 200 μL de la muestra con 200 μL de ácido Perclórico 0.33 M en un tubo de vidrio y colocarlo en baño de ultrasonido por 5 min. Neutralizar la mezcla con 500 μL de disolución amortiguadora de fosfato de sodio e hidróxido de sodio, para después adicionar una disolución acuosa de Probenecid (estándar interno). Extraer las sustancias de interés de la mezcla, con 10 mL de metil tert-butil éter por agitación horizontal durante 15 min seguida de centrifugación a 3000 g por 10 min. Transferir la fase orgánica a un tubo limpio para evaporarla a sequedad en un baño de agua a 45 $^{\circ}\text{C}$ bajo corriente de aire comprimido. Reconstituir el residuo en 200 μL de fase móvil e inyectar al cromatógrafo.

Se reporta linealidad entre 0.312 a 2.5 $\mu\text{g/mL}$ con un porcentaje de recobro de la Clortalidona entre 90.4 y 94.5% con una exactitud de $\pm 2.8\%$ y una precisión del 8.4% en el peor de los casos.

- Método s (41) :

Método publicado por Fullimfaw, Bury y Moulds en 1987, para buscar nueve diuréticos excretados de potasio en orina por CLAR. La técnica descrita en este artículo utiliza el siguiente sistema cromatográfico:

Columna: Columna de acero inoxidable (25 cm x 4 mm DI) empacada con LiChrosorb RP18 (tamaño de partícula de 5 μm).

Detector: Detector de arreglo de fotodiodos operado de 210 a 400 nm y monitoreando a 271 nm.

Fase Móvil: Disolución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 3.0 en agua:acetonitrilo con un flujo de 1.5 mL/min e incrementando la cantidad de acetonitrilo del 10% a 1.5 min. al 35% a 3.5 min.

Temperatura: 50 $^{\circ}\text{C}$ para el sistema cromatográfico.

Inyección: 5 μL .

La preparación de las muestras es la siguiente:

Adicionar una alícuota de 2 mL de la muestra, 2 mL de fosfato de sodio monobásico 1 M pH 4.1, adicionar 4 mL de acetato de etilo. Agitar 2 min. y centrifugar a 1500 g por 5 min, transferir la fase orgánica a un segundo tubo que contiene 5 mL de fosfato de sodio dibásico 0.1 M pH 7.5. Agitar 2 min y centrifugar como se describe anteriormente. Transferir la fase orgánica a un tubo limpio para evaporarla a sequedad en un baño de agua a 60 °C bajo corriente de nitrógeno. Reconstituir el residuo en 100 µL de acetonitrilo al 35% en disolución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 3.0 en agua e inyectar al cromatógrafo.

No informan cuantificación de muestras, sólo la búsqueda de los diuréticos en pacientes y voluntarios y un estimado de la concentración. Se reporta un porcentaje de recobro de $82 \pm 2.3\%$ a una concentración de 10 µg/mL y un límite de cuantificación de 0.5 µg/mL.

- Método 9 ⁽⁴²⁾ :

Método publicado por Song-Ja, Hee-Soo Pyo, Yun-Je Kim, Mi-Sook Kim y Jongsei Park en 1987, para buscar diuréticos en orina, ya que se consideran como fármacos de abuso en los deportistas. La búsqueda se hizo con CLAR equipado con detector de arreglo de fotodiodos y comprobación con CG acoplado a un espectrómetro de masas. La técnica descrita en este artículo utiliza los siguientes sistemas cromatográficos y etilteofilina como estándar interno:

CLAR:

Columna: Columna de acero inoxidable Hypersil-ODS (100 mm x 4.6 mm DI, tamaño de partícula de 5 µm).

Detector: Detector de arreglo de fotodiodos operado de 210 a 400 nm y monitoreando a 220, 273 y 328 nm.

Fase Móvil: Disolución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 en agua:acetonitrilo con un flujo de 1.0 mL/min, utilizando inicialmente 4% de acetonitrilo, incrementando la cantidad a 35% a los 10 min, al 45% a los 15 min y al 60% a los 18 min.

Temperatura: 40 °C para el sistema cromatográfico.

Inyección: 5 µL.

CG:

Columna: Columna capilar de sílica fundida cubierta con metilsilicona "cross-linked" (SE-30, 16 m x 0.2 mm DI, 0.33 µm de grosor de película).

Temperatura: 200 °C inicialmente para la columna, después se incrementó a 15°C/min hasta 280 °C, a 10 °C/min hasta 300 °C, permaneciendo así durante 1.20 min, incrementándola a 20 °C/min hasta 310 °C y finalmente manteniéndola así durante 2.00 min. El puerto de inyección y la línea de transferencia a 290 °C, y 200 °C para la fuente de iones.

Gases usados: Helio como gas acarreador a un flujo de 0.9 mL/min.

Detector: Espectrómetro de masas operado a 70 eV usando modo de exploración y en monitoreo de ión seleccionado ("SIM").

Inyección: 2 µL operado en modo de "split" (1:10).

La preparación de las muestras es la siguiente:

Extracción líquido-líquido (ELL):

Mezclar una alícuota de 5 mL de la muestra con 15 µL de estándar interno, ajustar el pH con 0.1 g de amortiguador sólido de fosfatos [pH 5, KH₂PO₄; pH 7, KH₂PO₄/K₃PO₄ (1:1); pH 9, K₂HPO₄; pH 11, K₂HPO₄/K₃PO₄ (3:1)], y adicionar 0.5 g de sulfato de sodio anhidro, agitar en mezclador tipo vórtice y adicionar 5 mL de dietil éter. Agitar mecánicamente durante 10 min y centrifugar a 2500g por 5 min. Transferir la fase orgánica a un tubo limpio para evaporarla a sequedad en un evaporador de vacío rotatorio. Reconstituir el residuo en 200 µL de metanol, filtrar a través de un poro de 45 µm e inyectar al cromatógrafo.

Extracción líquido-sólido (ELS):

Acondicionar un Cartucho Sep-pak C18 con dos porciones de 5 mL de metanol y 2 porciones de 5 mL de agua. Adicionar una alícuota de 3 mL de la muestra con el estándar interno, eliminar el eluido. Lavar el cartucho con 5 mL de agua y 1 mL de hexano. La muestra se eluye dentro de un tubo de colección con 3 porciones de 2 mL de éter etílico y 2 mL de metanol. Evaporar la fracción orgánica a sequedad en un evaporador de vacío rotatorio. Reconstituir el residuo en 200 µL de metanol, filtrar a través de un poro de 45 µm e inyectar al cromatógrafo.

Derivación:

Evaporar a sequedad la muestra extraída con ELS, y reconstituir el residuo en 200 µL de acetona, adicionar 20 µL de yoduro de metilo y 100 mg de carbonato de potasio, calentar a 60 °C por 2 hr e inyectar al cromatógrafo.

Se reporta que el método es adecuado para la identificación de la Clortalidona; una buena linealidad entre 0.2 a 20.0 µg/mL a una longitud de onda de 220 nm; un porcentaje de recobro de 73.5 ± 2.4 % a una concentración de 10.0 µg/mL con ELS. Con ELL de 70.7 ± 2.9

a pH 5, 100 ± 2.0 % a pH 7, 94.3 ± 4.9 % a pH 9, y 76.8 ± 4.1 % a pH 11 y un límite de detección de $0.2 \mu\text{g/mL}$. No reportan datos de exactitud ni precisión, pero sí los resultados de la cuantificación utilizando ELS en sujetos que recibieron 50 mg de Clortalidona.

1.2 METODOS ANALITICOS EN FLUIDOS BIOLOGICOS

1.2.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (17, 18, 19, 20)

Muchos estudios para la obtención de la licencia de mercadeo de un producto farmacéutico, ya sea para una nueva identidad química o para una formulación alternativa de un producto existente, contienen datos farmacocinéticos; estos datos usualmente son los de concentración en sangre contra tiempo. Otro tipo de datos, como las concentraciones urinarias, se presentan ocasionalmente.

El interés de la cromatografía en el análisis de fármacos se puede ver desde los años cincuenta, aplicándose desde entonces para seguir la síntesis de fármacos, asegurar su pureza, establecer la estabilidad de formas farmacéuticas para conocer su vida de anaquel, etc. Un enfoque diferente ocurrió en los setentas cuando la instrumentación, particularmente en la cromatografía en columna, incrementó la sensibilidad abriendo la posibilidad de valorar compuestos en fluidos biológicos, los cuales hasta entonces eran muy difíciles de analizar.

Analizando las referencias acerca de la aplicación de la cromatografía a diferentes compuestos, es obvio que el primer lugar lo ocupa la cromatografía de fármacos. Dentro de éstos, la mayor atención está enfocada a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) seguida por la Cromatografía de Gases (CG) y la Cromatografía en Capa Delgada (CCD). La mayor atención ha sido hacia las aplicaciones de técnicas en métodos usados para estudios biológicos (Métodos Bioanalíticos).

La CLAR es preferible sobre otras técnicas tales como la espectroscopia UV o de Fluorescencia, ya que éstas últimas no son lo suficientemente selectivas; en cuanto a la CG, aunque está reportado que es más sensible su capacidad de detección, tiene el inconveniente de que muchos fármacos son inestables a la temperatura y por lo tanto es necesario derivar las muestras; las técnicas de inmunoensayo muchas veces carecen de selectividad aunque son más rápidas y de fácil manejo en forma rutinaria.

En la actualidad, se utiliza principalmente la CLAR en fase reversa para los métodos bioanalíticos. Se emplean columnas comerciales rellenas con empaque de 5-10 micrones de tamaño de partícula, generalmente con fase químicamente enlazada C8 o C18; seguida de la cromatografía de intercambio iónico y por último la cromatografía de fase normal. En cuanto a fases móviles, en la mayoría de los casos se utilizan disoluciones acuosas amortiguadoras, disolventes

orgánicos como metanol y acetonitrilo y aditivos tales como heptansulfonato de sodio, etc.

Una parte importante de la CLAR en el monitoreo de fármacos son los detectores. Desde el inicio de los setenta, se utilizó la absorción en el UV a 254 nm introduciéndose más tarde detectores de longitud de onda variable, los cuales permiten el monitoreo a longitudes de onda donde el fármaco absorba más y así aumentar la sensibilidad. Desafortunadamente en muchos casos los fármacos tienen su máximo entre 200-230 nm, resultando en un decremento de su selectividad debido a que muchos compuestos endógenos de las muestras absorben también en esas longitudes de onda. Hoy en día un detector UV muy utilizado es el detector de arreglo de fotodiodos, el cual registra digitalmente el espectro UV obtenido simultáneamente en un microprocesador, donde posteriormente puede ser manipulado de diferentes maneras, ya sea para la identificación y verificación de pureza del pico o para la obtención de múltiples cromatogramas a diferentes longitudes de onda, lo cual maximiza la detección o minimiza las interferencias.

Otro detector es el fluorométrico, detector muy selectivo y sensible, pero presenta el inconveniente de que muchos fármacos no fluorescen y tienen que ser primero convertidos a un derivado fluorescente.

Los detectores electroquímicos pueden ser usados en compuestos que puedan oxidarse o reducirse al aplicar un potencial al electrodo de trabajo. Tales detectores pueden ser amperométricos, coulombimétricos o polarográficos. Son altamente sensibles, selectivos y trabajan en medios acuosos (aplicables en fase reversa e intercambio iónico), pero para su uso requieren de condiciones experimentales estrictamente constantes tales como flujo, pH, fuerza iónica, temperatura, etc.

En la actualidad el acoplamiento de cromatografía de líquidos-espectroscopia de masas (CL-EM) es una herramienta usada en los estudios farmacocinéticos. Desafortunadamente es caro y no fácilmente utilizable por los problemas de vaporización del eluyente, compuestos termolábiles y la presencia de lastres no volátiles lo cual no lo hace popular.

Otra manera de aumentar la sensibilidad en CLAR es la derivación, además de aumentar la selectividad y la posibilidad de la separación de enantiómeros.

Los agentes para derivar usados en UV y fluorescencia más comunes son el cloruro de dansilo, o-ftaldehído, fluorescamina, trinitrobeneno, etc., los cuales son adecuadas para compuestos con funciones nitrogenadas. De los procedimientos más recientes, es el uso de formadores de par iónico fluorescentes (p. e. el sulfato de α -fenilcinamonitrilo). El pH óptimo para la detección no es necesariamente el óptimo para la separación, no obstante, para este fin se puede utilizar la derivación post-columna.

También se han reportado procedimientos de derivación para producir moléculas electroactivas a partir de moléculas electroinactivas las cuales pueden ser monitoreadas por un detector electroquímico. Por ejemplo, se ha reportado el uso del o-ftaldehído para aminas primarias y complejos de metalditiocarbamatos para aminas secundarias.

Todos los tipos de derivación se pueden llevar a cabo antes de la cromatografía o en línea, ya sea pre o post-columna, pero en todos los casos no debe haber decremento de la resolución del fármaco y sus metabolitos. El uso de sistemas multicolumnas permite la derivatización más rápida pero incrementa el costo del equipo.

Otra área de interés en farmacocinética es la separación de fármacos ópticamente activos, ya que está bien demostrado que éstos se comportan de manera diferente en el organismo. En general, la separación de enantiómeros se lleva a cabo de tres maneras: por el uso de columnas con fase estacionaria quiral, por la adición de compuestos quirales a la fase móvil o por reactivos quirales antes de la cromatografía.

Actualmente ya se dispone de columnas quirales comercialmente pero son limitadas en su uso. La derivatización con reactivos quirales es la más popular pero presenta la desventaja de que puede ocurrir cierto grado de racemización, la reacción tiene diferentes velocidades dependiendo del estereoisómero, etc.

Otra área en la que se está estudiando la CLAR para métodos bioanalíticos es la miniaturización, o sea el uso de columnas microboro, la cual presenta varios problemas técnicos por la baja capacidad de carga de la columna y la complejidad de las muestras biológicas.

1.2.2. Limpieza de Muestras (17, 20, 21, 22)

La preparación de las muestras biológicas para ser analizadas por cromatografía requiere de mucha atención ya que una limpieza inadecuada puede provocar una falla en el análisis; muchas veces esta parte del método bioanalítico requiere de más tiempo que la separación cromatográfica de la muestra por sí misma.

La preparación de la muestra involucra la extracción del fármaco a probar y/o de sus metabolitos del material biológico y la simplificación del extracto obtenido removiendo impurezas que pudieran interferir con el sistema cromatográfico y disminuir la vida de la columna analítica. Esta parte se denomina limpieza de la muestra.

Para la extracción del fármaco de la matriz biológica uno se debe de guiar por sus propiedades fisicoquímicas, por la matriz biológica en sí (plasma, suero, sangre total, orina, tejidos, semen, etc.) y por la manera en que podemos encontrarlo (esto puede

ser libre, unido a eritrocitos, unido a proteínas, lipoproteínas en presencia de metabolitos e inclusive conjugados).

La técnica más sencilla es la dilución directa de la muestra e inyección al sistema cromatográfico. Esta técnica es usada pero presenta el inconveniente de deteriorar rápidamente a la columna.

En la mayoría de las técnicas utilizadas reportadas en el pasado, la extracción y purificación del extracto se hace utilizando disolventes orgánicos y ajuste del pH. Tales procedimientos usualmente requieren de reextracción, centrifugación y evaporación, lo cual consume demasiado tiempo. Adicionalmente, se pueden presentar problemas en la extracción de aminas cuaternarias y algunos metabolitos, lo cual produce pérdida de la sustancia de interés. Para esto, se han utilizado procedimientos tales como el uso de disoluciones amortiguadoras volátiles o la extracción de pares de iones con un contraión, por ejemplo el ión tetrabutylamonio.

Por esas razones, actualmente una técnica que ha ganado popularidad para la limpieza de las muestras es la extracción en fase sólida (extracción sólido-líquido, ELS), en la cual se utilizan pequeñas columnas empacadas con un sorbente, generalmente en fase reversa químicamente enlazada o con sorbente en fase normal o intercambiadores de iones. Esto puede hacerse de manera manual o de manera automática en grandes series de muestras.

El procedimiento general para el uso de la extracción en fase sólida es el siguiente:

- Solvatación o humectación de la fase.- Debido a que las columnas son empacadas secas, es necesario humectar la fase estacionaria para permitir la interacción con matrices acuosas, esto se hace generalmente haciendo pasar un disolvente tal como metanol o acetoniitrilo.
- Eliminación del disolvente y acondicionamiento.- Esto se hace pasando agua con el objeto de eliminar el exceso de disolvente y permitir una buena interacción hidrofóbica. Si es necesario, se adiciona una disolución amortiguadora para asegurar que el pH sea adecuado para la interacción del compuesto de interés con la fase. Es importante no permitir que la fase se seque.
- Adición de la muestra.- La muestra se adiciona directamente a la columna. Si es necesario, previamente se precipitan las proteínas con un precipitante adecuado o se filtra la muestra o se ajusta el pH de ésta. El objetivo es que el fármaco se retenga fuertemente en la columna.
- Lavado.- La muestra se lava con un disolvente tal, que las impurezas se eluyan selectivamente del cartucho e idealmente el 100% de los compuestos de interés se retenga.

- **Elución.**- Los compuesto de interés se eluyen de la columna con un disolvente apropiado, sin posibles interferencias, y se colectan para su posterior análisis.

En la Figura 1.7 se muestra un diagrama general de la extracción en fase sólida.

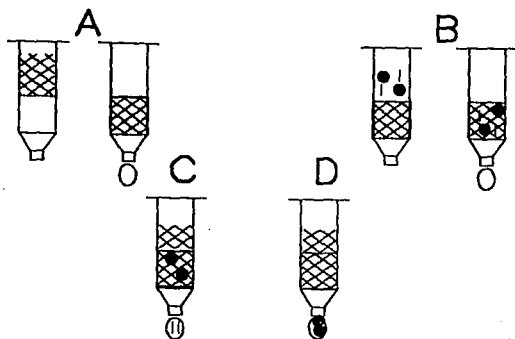


Figura 1.7. Limpieza de muestras utilizando los cartuchos de extracción en fase sólida

- A = Solvatación y Acondicionamiento del Cartucho
- B = Adición de la Muestra
- C = Lavado
- D = Elución
- Donde:
- | = Interferencias
- = Compuesto de Interés

Actualmente las técnicas de limpieza en línea usando la conmutación de columnas (switching column) han ganado gran popularidad. En general, la técnica se lleva a cabo utilizando una válvula de seis vías. En el primer paso del proceso, la muestra se inyecta y se hace pasar a la columna de lavado usando un eluyente adecuado, de tal manera que el compuesto de interés se quede retenido y los contaminantes se eluyan durante tiempo determinado; por otro lado, se hace pasar a través de otros puertos la fase móvil a la columna analítica (Figura 1.8A). Transcurrido el tiempo de lavado, la válvula se hace girar de tal manera que el flujo fase móvil se hace pasar a través del cartucho, arrastrando la muestra hacia la

columna analítica, para realizar la separación y su posterior análisis (Figura 1.8B).

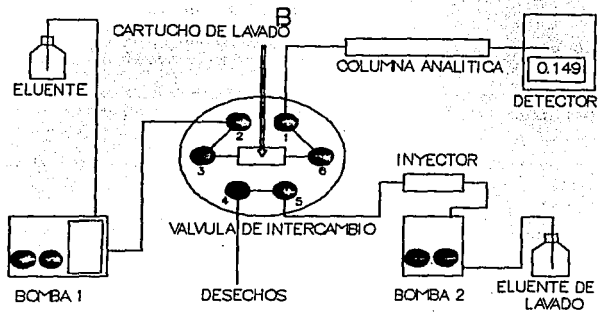
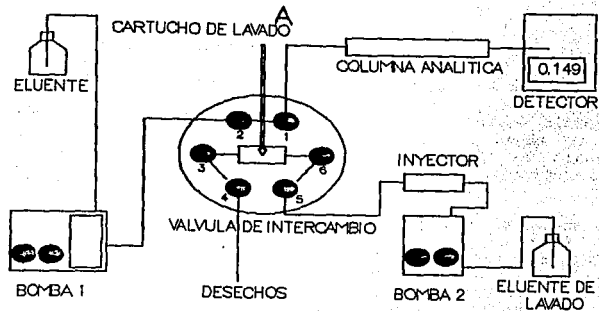


FIGURA 1.8
 DIAGRAMA GENERAL DE LIMPIEZA DE MUESTRAS POR CONMUTACION DE COLUMNAS
 A) LIMPIEZA DE MUESTRA
 B) ELUCION HACIA LA COLUMNA

Otras técnicas reportadas pero poco utilizadas son la diálisis y ultrafiltración.

1.2.3. Validación (20, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29)

En la parte 320 del Código de Registros Federales (CFR) capítulo 21 de los Estados Unidos, parte referente a los requisitos de Biodisponibilidad y/o Bioequivalencia, establece que cuando se hagan este tipo de estudios, el método analítico usado para determinar la concentración del fármaco o sus metabolitos en fluidos biológicos o productos de excreción o el método usado para medir un efecto farmacológico agudo debe mostrar que es exacto y lo suficientemente sensible para medir con precisión adecuada la concentración del fármaco o sus metabolitos.

Desde la década de los ochenta se ha reportado que una de las fallas más frecuentemente encontradas, y por la cual se han rechazado solicitudes para la venta de fármacos, es una inadecuada validación de métodos analíticos para demostrar la bioequivalencia. Partiendo de este hecho, se han realizado conferencias, no solamente en los Estados Unidos sino a nivel internacional, para establecer consensos y en un futuro establecer guías para la validación de métodos bioanalíticos, con el objetivo de demostrar que dichos métodos para la cuantificación de un compuesto (fármaco, metabolito o derivado) en una matriz biológica dada son confiables para la determinación que se intenta.

Haciendo una revisión de lo anterior (23, 28, 29) podemos decir que la validación se lleva a cabo en dos fases:

- **Fase de Establecimiento del Método**, también llamada validación in vitro o validación previa al estudio de Biodisponibilidad y/o bioequivalencia:

Esta fase es obligatoria para todos los métodos, ya sea completamente desarrollada por el laboratorio, tomada de bibliografía o modificada de un método previamente validado. El procedimiento del método debe ser detalladamente escrito y cada paso investigado para concluir su uso en un informe final de validación. Los pasos generales son los siguientes:

Especificidad

Es la demostración que el método puede diferenciar al compuesto de interés de metabolitos, compuestos endógenos de la matriz biológica y productos de degradación conocidos. Esta se puede establecer por lo siguiente:

a) Probar por lo menos seis fuentes independientes de la misma matriz biológica (cuando hay disponibilidad de ésta) verificando que no se presente interferencia alguna,

b) analizando metabolitos (si se cuenta con ellos) con la técnica propuesta o bien analizando muestras de sujetos que recibieron el fármaco de interés para comprobar que no interfieran con el análisis y,

c) verificando que los productos de degradación del compuesto de interés no interfieran al ser analizados con la técnica propuesta y cuáles fármacos que podrían ser administrados en terapia conjunta interfieren con éste.

Intervalo Lineal y Función Respuesta

El intervalo lineal es aquel sobre el cual el compuesto de interés será determinado. Se basa en la evaluación de muestras patrón en el fluido a analizar, las cuales definen la curva de calibración (curva patrón). Esta debe constituirse típicamente por 6-8 puntos de calibración (excluyendo blancos e incluyendo la concentración mínima cuantificable) y además definirá la función lineal que es la que nos indicará la relación concentración-respuesta. Para métodos cromatográficos se espera una relación lineal simple y con métodos inmunológicos, una relación lineal utilizando datos logaritmo transformados.

Para evaluar este paso, los criterios a tomar son (para la relación simple concentración-respuesta):

a) coeficiente de determinación (r^2) mayor a 0.98 para la recta generada por el método de mínimos cuadrados,

b) la calidad del ajuste, al obtener la concentración estimada de los puntos de la curva interpolando las respuestas de éstos sobre la curva generada (concentraciones calculadas de regreso), debe de cumplir con los criterios de precisión y exactitud.

Esto se evalúa con las curvas patrón generadas en cada prueba de exactitud y precisión.

Exactitud y Precisión

La exactitud se define como la cercanía del valor experimental al compararlo contra el considerado real (valor real), reportada generalmente como desviación o porcentaje de desviación.

La precisión se define como la cercanía de resultados experimentales de la valoración de un fármaco determinados replicadamente. Puede ser subdividida en precisión dentro de un día (precisión intradía o repetibilidad) y precisión entre días (reproducibilidad o precisión interdía), es expresada comúnmente como coeficiente de variación (CV).

Esta prueba se determina cuantificando sobre una curva patrón recién preparada, muestras adicionales a por lo menos tres concentraciones del intervalo lineal (baja, media y alta) de manera azarizada, mínimo por duplicado durante tres días para establecer

la precisión inter día y mínimo por quintuplicado en un día para establecer la precisión intradía. Los parámetros a evaluar recomendados son:

- a) La exactitud debe estar dentro del intervalo de $\pm 15\%$ del valor real ($\pm 20\%$ para la concentración mínima cuantificable) y,
- b) la precisión intra e inter día debe ser menor al 15% de CV (menor al 20% para la concentración mínima cuantificable).

Sensibilidad

Esta parte define a los términos de límite de cuantificación y límite de detección:

Límite de Cuantificación: es la concentración más baja del intervalo lineal que puede ser determinada con exactitud y precisión adecuadas. Se determina analizando la concentración mínima a cuantificar, la cual debe cumplir con los criterios antes mencionados ($\pm 20\%$ para exactitud y menos del 20% de CV para precisión).

Límite de Detección: es la concentración más baja que puede ser detectada, pero no precisamente cuantificada en un método de análisis. Normalmente se evalúa haciendo diluciones de la muestra y analizándola para determinar la concentración que produce una señal con una relación de 2 a 4 veces el nivel del ruido.

Eficiencia de Extracción

Es la cantidad extraída del compuesto de interés y del estándar interno, si es usado, de la matriz biológica.

Comúnmente se determina procesando y analizando la respuesta obtenida de muestras adicionadas a la matriz biológica a diferentes concentraciones dentro del intervalo lineal y comparándolas contra soluciones del compuesto en un disolvente adecuado y que no han sido procesadas, expresándolas en porcentaje.

No hay especificación para esto, pero se desea que el recobro no sea menor al 50% para no comprometer la sensibilidad y si cercanas al 100% , además de que sean constantes en el intervalo estudiado.

Estabilidad.

Se debe de asegurar la integridad del fármaco desde la toma de muestra hasta su análisis, una manera de probarlo es la siguiente:

- a) Preparar una serie de muestras adicionadas a concentraciones dentro del intervalo de interés, procesarlas y cuantificarlas a las 0, 24, 48, ... horas, almacenadas a las condiciones del laboratorio y observar su comportamiento,

b) analizar muestras adicionadas a concentraciones dentro del intervalo de interés las cuales se procesan después de haber sido sometidas a 2 ó 3 ciclos de congelación-descongelación y,

c) establecer la estabilidad del compuesto de interés en la matriz biológica en muestras adicionadas a concentraciones dentro del intervalo de interés, o bien sobre muestras reales, en temperaturas normales de almacenamiento (0, 1, 2 y 3 semanas de -5 a -10°C ó 0, 1, 2,6 meses de -20 a -40°C).

El criterio de aceptación usado se basa en los mencionados para exactitud y precisión.

- **Fase de Aplicación del Método**, también llamada validación in vivo o validación durante el estudio de Biodisponibilidad y/o bioequivalencia:

Esta fase es hecha durante la utilización de un método en un estudio particular. En general los puntos a cubrir son los siguientes:

Adecuabilidad del Sistema.

Son pruebas rutinarias hechas con el fármaco y el equipo utilizado para asegurar la operación óptima del sistema.

Intervalo Lineal y Función Respuesta

Para cada corrida analítica se debe preparar una curva patrón fresca, ya sea sólo o por duplicado y debe de cubrir el intervalo lineal estudiado en la fase anterior. Estas curvas deben cumplir con lo mencionado para el punto análogo en la validación previa.

Exactitud y Precisión.

Se establece con muestras adicionadas del compuesto de interés en la matriz biológica a por lo menos tres concentraciones conocidas que se procesan mínimo por duplicado y se analizan de manera azarizada y periódica dentro de cada corrida analítica. Estos puntos deben cumplir con el criterio de aceptación de exactitud y precisión para el total de estas corridas.

Cabe mencionar que estos puntos de control de calidad se utilizan como criterio de aceptación o rechazo de una corrida, tomando la siguiente regla: "Por lo menos 4 de 6 puntos deben caer dentro del $\pm 20\%$ de sus respectivos valores reales, 2 de las 6 muestras control de calidad (no ambas de la misma concentración) pueden caer fuera del $\pm 20\%$ del valor real".

Por último algunas fuentes sugieren como parámetro de precisión el reanálisis azarizado del 15% del total de muestras, las cuales al ser comparadas con la cuantificación original no deben diferir por más del 15%.

1.3 BIOEQUIVALENCIA

1.3.1. Generalidades (23, 25)

La bioequivalencia es un aspecto regulatorio muy importante para la venta de productos farmacéuticos en los Estados Unidos y Canadá, y en México está tomando mucha importancia, tanto por razones éticas como legales. Para mejor entendimiento de la bioequivalencia definiremos los siguientes términos:

-La biofarmacia es la rama de las ciencias farmacéuticas que estudia la relación entre las propiedades fisicoquímicas de la forma de dosificación del medicamento y la respuesta terapéutica observada tras su administración. Una parte de ésta es la llamada biodisponibilidad, que es la relación y extensión en la que un principio activo o entidad terapéutica es absorbida desde un producto farmacéutico y es disponible en el sitio de acción del fármaco.

-Un producto farmacéutico es una forma de dosificación terminada, por ejemplo, tableta, cápsula, o disolución, que contiene el ingrediente activo, generalmente, pero no necesariamente, en asociación con ingredientes inactivos.

-Los equivalentes farmacéuticos son productos que contienen cantidades idénticas del principio activo, por ejemplo, la misma sal o éster de la misma entidad terapéutica, en formas de dosificación idénticas, pero no necesariamente conteniendo los mismos ingredientes inactivos, y que cumplen los mismos patrones compendiales u otros necesarios de identidad, dosis, calidad y pureza, incluyendo potencia y, cuando sea aplicable, uniformidad de contenido, tiempos de desintegración y/o velocidades de disolución.

-Las alternativas farmacéuticas son productos farmacéuticos que contienen la misma entidad terapéutica, o su precursor, pero no necesariamente en la misma cantidad o forma farmacéutica o como la misma sal o éster. Cada uno de esos productos farmacéuticos cumplen individualmente ya sea los mismos o sus propios patrones compendiales u otros aplicables de identidad, dosis, calidad y pureza, incluyendo potencia y, cuando sea aplicable, tiempos de desintegración y/o velocidades de disolución.

-Los productos farmacéuticos bioequivalentes son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas las cuales no muestran una diferencia significativa en la cantidad y velocidad de absorción cuando se administra en la misma dosis molar la entidad terapéutica bajo condiciones experimentales similares, ya sea en dosis única o múltiple. Algunos equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas pueden ser equivalentes en la extensión de su absorción pero no en su velocidad de absorción y aún ser considerados bioequivalentes porque tales diferencias en la velocidad de absorción son intencionales y están señaladas en la etiqueta, no son esenciales para el logro de la concentración

efectiva del fármaco en el cuerpo en uso crónico, o son consideradas insignificantes médicamente para el producto farmacéutico en particular.

- El requisito de Bioequivalencia es un requisito de las autoridades sanitarias para pruebas in vitro y/o in vivo de productos farmacéuticos especificados el cual debe ser satisfecho para su mercadeo.

- Producto farmacéutico intercambiable es aquel producto farmacéutico bioequivalente a un producto que ha probado ser seguro y eficaz (producto innovador) el cual está en la misma forma farmacéutica.

La biodisponibilidad es comunmente asegurada por una serie de mediciones del fármaco o sus metabolitos, o ambos, en la circulación sistémica. Esas series de medidas dan perfiles de concentración plasmática (o sangre total, suero u orina) contra tiempo, del cual se puede calcular un número importante de parámetros farmacocinéticos, incluyendo area bajo la curva (ABC), la concentración máxima observada (C_{max}) y el tiempo en el cual C_{max} es obtenida (t_{max}). El ABC da un estimado de la cantidad de fármaco absorbido, t_{max} refleja la velocidad de absorción y C_{max} junto con t_{max} pueden reflejar también la velocidad de absorción.

La bioequivalencia implica que el producto farmacéutico tenga el mismo efecto sistémico que el producto de referencia, cuando se administre a pacientes como se indica en la etiqueta. La Bioequivalencia se establece in vitro, con los perfiles de disolución; in vivo, con estudios en sujetos sanos voluntarios en los cuales se comparan la biodisponibilidad tanto del producto innovador como del producto de prueba o por una combinación de ambos.

1.3.2. Requisitos en Canadá y en los Estados Unidos (23, 30)

La bioequivalencia está regulada en los Estados Unidos de Norteamérica desde Enero de 1977 para los productos que pretenden usarse como productos farmacéuticos intercambiables para el mismo efecto terapéutico (productos que se intentan introducir al mercado bajo el rubro de Abbreviated New Drug Application, ANDA, o sea productos que ya han sido estudiados y han demostrado ser seguros y eficaces). Para esto, el criterio que se ha establecido por los funcionarios de la FDA o por algún solicitante por petición de un funcionario de la FDA se basa en evidencias bien documentadas de productos que no podrían ser bioequivalentes, considerando lo siguiente:

- Evidencia de que no se tienen efectos terapéuticos similares con tales productos,
- Evidencia de que los productos no son bioequivalentes,

- Evidencia de que tienen un índice terapéutico pequeño y que necesitan una dosificación cuidadosa y monitoreo del paciente,
- Una determinación médica competente de que una falta de bioequivalencia trae un serio efecto adverso en el tratamiento o prevención de un desorden o condición seria,
- Evidencia fisicoquímica de:
 - baja solubilidad en agua, o si la disolución en el estómago es crítica para la absorción en el tracto gastrointestinal,
 - velocidad de disolución lenta o diferencia significativa de la disolución cuando se compara contra un producto innovador,
 - el tamaño de partícula y/o área superficial del principio activo es crítico para su biodisponibilidad,
 - ciertas características estructurales del principio activo, tales como presencia de polimorfos, solvatos, etc. que se disuelvan poco y esto afecte su absorción,
 - los productos farmacéuticos tienen una alta relación excipiente/principio activo
 - si están presentes ciertos ingredientes inactivos que se requieran para la absorción o que puedan afectar la absorción.
- Evidencia farmacocinética que:
 - el principio activo se absorbe en gran parte en un segmento del tracto gastrointestinal o se absorbe en un sitio en particular,
 - el grado de absorción del principio activo es pobre,
 - cuando sufre metabolismo de primer paso y que afecta el efecto terapéutico y/o toxicidad,
 - cuando la entidad terapéutica es metabolizada o excretada rápidamente y que se necesite una disolución y absorción rápida para que actúe eficazmente,
 - cuando la entidad terapéutica es inestable en porciones específicas del tracto gastrointestinal y que requiera recubrirse o formulaciones especiales para asegurar una absorción adecuada,
 - cuando la entidad terapéutica es sujeta a una cinética dosis-dependiente en o cerca del intervalo terapéutico y la velocidad y extensión de la absorción sean importantes para la bioequivalencia.

Los diferentes requisitos generales de bioequivalencia de la FDA pueden ser los siguientes:

- Una prueba in vivo en humanos,
- Una prueba in vivo en animales diferentes a los humanos los cuales se han correlacionado con datos in vivo de humanos
- Una prueba in vivo en animales diferentes a los humanos los cuales no se han correlacionado con datos in vivo de humanos
- Una prueba de bioequivalencia in vitro estándar (por ejemplo una prueba in vitro que ha sido correlacionada con humanos)
- Una prueba in vitro disponible (comúnmente el perfil de disolución) que no ha sido correlacionada con humanos.

Generalmente las formas de dosificación sólidas como tabletas, cápsulas etc., están sujetas a los requisitos de bioequivalencia, como se puede ver en la sección 1.1.4 para la Clortalidona, en los cuales se les solicita la prueba in vivo en humanos además de una prueba in vitro. Para el desarrollo de las pruebas in vivo se deben considerar los siguientes aspectos:

- Diseño del estudio, que implica a la dosis administrada (simple o múltiple) de manera azarizada, generalmente cruzado de dos vías y un número de sujetos establecido (generalmente más de 20).
- Sujetos, los cuales deben ser sanos y bajo supervisión médica de acuerdo a las regulaciones nacionales y bajo la declaración del Helsinki para los Derechos Humanos.
- El producto de referencia, el cual debe ser un producto farmacéutico que ha sido aprobado sobre las bases de estudios clínicos
- Los tiempos del muestreo del fluido biológico, que deben ser tomados con la suficiente frecuencia para caracterizar las partes ascendentes y descendentes de la curva concentración-tiempo (absorción, distribución y eliminación), cuidando de no tomar más de 475 mL de sangre en un periodo de 1 mes.
- El método analítico utilizado debe cumplir con los criterios de Especificidad, Intervalo Lineal y Función Respuesta, Exactitud y Precisión, Sensibilidad Eficiencia de Extracción y Estabilidad.
- Comparación estadística de los parámetros farmacocinéticos de ambos productos bajo estudio como son el ABC, C_{max} y t_{max} .

Todo esto, establecido en "protocolos" aprobados y junto con los registros de fabricación del producto, pruebas compendiales, prueba de disolución, etc., generará un informe que será entregado a la FDA para que el producto farmacéutico cumpla con el requisito de bioequivalencia y pueda autorizarse a la venta.

Canadá es una nación pionera en los requisitos oficiales de la bioequivalencia de los productos farmacéuticos, en la cual ya está formalizada por la Health Protection Branch (HPB, Departamento de Protección de la Salud), organismo canadiense similar a la FDA. Sus guías y objetivos son similares a los de Estados Unidos, teniendo

variaciones en la evaluación estadística de los parámetros farmacocinéticos.

1.3.3. Perspectivas en México

En México no existe una regulación acerca de la bioequivalencia. Actualmente se han dado los primeros pasos al respecto, en conferencias por parte de la Secretaría de Salud (SS) y la Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica (CANIFARMA). Asimismo han existido esfuerzos por parte de la Secretaría de Salud que en 1989-1990 junto con expertos en el área, propusieron "La Guía y Recomendaciones Para Realizar Estudios de Biodisponibilidad y Bioequivalencia en Humanos" y "La Guía de Validación de Métodos Analíticos para usarse en estudios de Biodisponibilidad y Bioequivalencia" las cuales no se han traducido en legislación.

Se tienen las bases, pero hace falta un gran esfuerzo conjunto tanto del gobierno, iniciativa privada, organismos colegiados, universidades y de la cámara para obtener la legislación. Esto involucra un fuerte gasto para establecer laboratorios analíticos y clínicas especializadas, pero a la larga se espera un mayor beneficio económico, ya que esto aumentará la calidad y competitividad de los medicamentos producidos en México a nivel internacional.

CAPITULO 2

OBJETIVO

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Clortalidona es un producto genérico clasificado en la categoría terapéutica como diurético de acción prolongada y baja toxicidad. Para obtener la autorización de la venta de un medicamento con este principio activo en los Estados Unidos y lograr competitividad en el mercado nacional, en la forma de dosificación de comprimidos, uno de los requisitos necesarios es probar la bioequivalencia con un producto existente en el mercado, que haya demostrado su seguridad y eficacia. Esta prueba se lleva a cabo en al menos 20 sujetos sanos voluntarios evaluando, entre otras cosas, la concentración de Clortalidona en orina con respecto al tiempo después de una administración del producto en forma de tabletas a una dosis de 50 mg, lo que hace necesario una técnica analítica confiable y sensible para la cuantificación del activo en el fluido biológico.

2.2 OBJETIVO

Establecer y validar un método analítico para cuantificar Clortalidona en Orina para ser utilizado en un estudio de biodisponibilidad/bioequivalencia después de administrarse una dosis de 50.0 mg.

CAPITULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS

- Equipo:

Sistema Cromatográfico

- Inyectores: -Inyector Waters, Modelo U6K
 -Inyector Automático Waters, Modelo 712
 -Inyector Automático Waters, Modelo 717
- Bombas: -Bomba Waters, Modelo 510
 -Unidad de Flujo Waters con capacidad de manejar 4 disolventes, Modelo 600E
 -Sistema Controlador Waters, modelo 600
- Detectores: -Detector UV de longitud de Onda Variable, Waters, Modelo 484
 -Detector UV de longitud de Onda Variable, Waters, Modelo 486
- Integradores: -Integrador Waters, Modelo 740
 -Integrador Waters, Modelo 745
 -Integrador Hewlett Packard, Modelo 3306
- Otro : -Válvula de conmutación de 6 puertos, Waters

Columnas Cromatográficas:

- Ultrasphere ODS, 5 μ m de tamaño de partícula de 4.6 mm DI y 25 cm de Longitud
- μ bondapak C18, 10 μ m de tamaño de partícula de 3.9 mm DI y 15 cm de Longitud

Otros Equipos:

- Baño de Ultrasonido Cole Parmer, Modelo 8851
- Baño de agua con temperatura controlada, Polytherm, Modelo PY1.
- Centrifuga con Refrigeración Sorvall, modelo RT 600D.
- Equipo para procesar muestras en Cartuchos de Extracción en Fase Sólida J. T. Baker, de 24 plazas

Potenciómetro Beckman, Modelo #45

Balanza Analítica Mettler, Modelo AE260

Agitador "Vortex", Thermoline, mezclador tipo 37600

Ultracongelador Harris de 0 a -70°C , operado a -40°C

Pipetas automáticas de Transferencia marca Finnipipette y Oxford de las siguientes capacidades: 5 a $50\mu\text{L}$, 50 a $200\mu\text{L}$, 200 a $1000\mu\text{L}$ y 1000 a $5000\mu\text{L}$

Pipeta de descarga múltiple Eppendorf, de 100 a $5000\mu\text{L}$

Cartuchos de Extracción en Fase Sólida con las siguientes características

Cartucho	Tipo	Capacidad	Marca
	Si	1 mL	Spe-ed
	CN	1 mL	Spe-ed
	C18	1 mL	Spe-ed
	CN	3 mL	J. T. Baker
	C18	1 mL	J. T. Baker
	CN	1 mL	J. T. Baker

- Reactivos:

Acetato de Sodio R.A. Merck.

Agua grado HPLC obtenido de equipo MilliQ de Waters

Acetonitrilo HPLC, Mallinkrodt

Metanol HPLC, Fisher Scientific

Acetona HPLC, J. T. Baker

Fosfato de potasio monobásico R. A., Merck

Fosfato de potasio dibásico R. A., Merck

Acido Fosfórico R.A., Merck

Hidróxido de Sodio R. A., Merck

Clortalidona R. A., Sigma

Clortalidona Sustancia de Referencia USP lote G-2.

2-7, Dihidroxinaftaleno R. A., Sigma

Orina obtenida de Sujetos Voluntarios

3.2 TRABAJO PREVIO

De acuerdo a las características farmacocinéticas de la Clortalidona, de la dosis a administrar, de lo reportado en bibliografía de técnicas analíticas y concentraciones urinarias reportadas, se estableció un intervalo dinámico de trabajo de 0.1000 a 20.00 µg/mL en el cual se buscaría ser selectivo a compuestos endógenos y al único metabolito reportado, el Acido 2-(3-aminosulfonil- α -clorobenzoil) benzoico (CCA).

Inicialmente se hizo una revisión de los métodos reportados para Clortalidona en fluidos biológicos, descartando de inicio los métodos espectroscópicos, primeramente por la recomendación de la guía de la FDA de utilizar métodos cromatográficos y segundo por la inespecificidad que podría acarrear el uso de estas técnicas. Las opciones quedaron en cromatografía de gases (CG) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para lo cual consideramos lo siguiente:

- Disponibilidad de equipo,
- factibilidad de las técnicas y,
- disponibilidad de reactivos

En el laboratorio no contábamos con cromatógrafo de gases, además, por las características de la Clortalidona, se requiere derivarla para hacerla termoestable, lo cual conlleva a la compra de reactivos y material necesario para hacerlo, por lo que se decidió la CLAR, ya que además de contar con todos los equipos y material necesarios, con esta técnica obtenemos resultados que cumplen con la sensibilidad y selectividad que se necesita y no se requiere derivar la muestra.

Teniendo la técnica seleccionada, procedimos a reproducir uno de los métodos reportados en las condiciones actuales de nuestro laboratorio, seleccionando el más corto, ya que el número de muestras clínicas a analizar en un estudio de bioequivalencia es de aproximadamente 1000 a 1500 y los resultados deben ser obtenidos de manera rápida y de acuerdo a las buenas prácticas de laboratorio para su análisis estadístico. El método que se reprodujo fué el reportado por Guelen y colaboradores⁽³⁹⁾, utilizando para ello una columna µBondapak C18, 10 µm de tamaño de partícula, de 3.9 mm DI y 15 cm de longitud con la misma fase móvil reportada y en la cual la muestra se procesa sólo con una dilución. Al inyectar un blanco de orina procesada se vió una gran interferencia de compuestos endógenos con la clortalidona (Figura 3.1) por lo que el método fué eliminado y se pensó en otro procesamiento que fuera sencillo, ya que los otros métodos reportados utilizan la extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos para la limpieza de muestras.

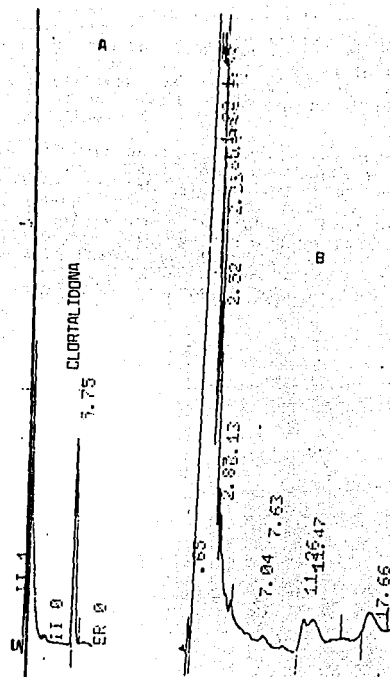


Figura 3.1. Cromatograma de las muestras de Clortalidona usando como fase móvil Acetato de sodio 0.01M:Acetonitrilo 400:100 a un flujo de 1.6 mL/min. A) Disolución de Clortalidona. B) Blanco de Orina.

3.3 DESARROLLO DEL METODO

3.3.1 SISTEMA CROMATOGRAFICO

Con los resultados obtenidos en el trabajo previo, y de acuerdo a la mayoría de las técnicas reportadas, se propuso utilizar un sistema cromatográfico en fase reversa, seleccionando para ello una columna Ultrasphere ODS, 5 μ m de tamaño de partícula, de 4.6 mm DI y 25 cm de longitud para tener una eficiencia elevada. La fase móvil

se obtuvo al reemplazar el amortiguador de la fase móvil probada inicialmente por uno preparado con fosfatos, con el objeto de ampliar el intervalo de pH de amortiguación, y respetando las proporciones de disolución amortiguadora:Acetonitrilo. Debido a que el pKa de la Clortalidona es de 9.36, en el intervalo de trabajo de las columnas analíticas (pH<7.5) no se altera su comportamiento cromatográfico por el cambio de pH, pero sí el de los compuestos endógenos de la orina.

Se probó la disolución amortiguadora de fosfatos 0.01M:Acetonitrilo (80:20; pH 7.0) como fase móvil ajustando el flujo a 2 mL/min, obteniendo así un sistema con un factor de capacidad grande para Clortalidona (entre 4 y 5), un pico simétrico y una alta eficiencia. Con este sistema se empezó a trabajar y a la postre fue el que se quedó como sistema definitivo para el monitoreo de la clortalidona, utilizando la detección al UV a 214 nm, la cual permite una sensibilidad alta para monitorear al fármaco en el intervalo de 0.05-100 µg/mL. Ver Figura 3.2.



Figura 3.2. Cromatograma de las muestras de Clortalidona usando como fase móvil fosfato de potasio:Acetonitrilo 80:20 pH 7.0 a un flujo de 2 mL/min. A) Disolución de Clortalidona a 10 µg/mL.

3.3.2 OBTENCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA DE MUESTRAS

Ya teniendo un sistema cromatográfico propuesto, se buscó el mejor método para el tratamiento de las muestras, seleccionando primeramente técnicas de extracción líquido-sólido. De acuerdo con las características del principio activo, principalmente su solubilidad, se utilizaron cartuchos en extracción de fase sólida con empaque C18 con 100 mg de carga de fase estacionaria, los cuales se procesaron de las siguientes maneras:

- Solvatación y acondicionamiento del cartucho (para todos los ensayos):

Pasar 2 mL de metanol

Pasar 2 mL de agua cuidando de no secar el cartucho.

- Adición de la muestra (para todos los ensayos):

Adicionar 0.3 mL de Orina y 0.2 mL de agua al cartucho

- Lavado de la muestra

Ensayo	Disolvente de Lavado	Número de lavados de 1 mL
1	agua	5
2	agua:metanol (90:10)	5
3	agua:metanol (80:20)	5

- Elución de la muestra:

Eluir con 1 mL de una mezcla acetona:metanol (50:50), recolectando el eluido

- Preparación final

Evaporar a sequedad a 60°C bajo corriente de nitrógeno y reconstituir con 300 µL de fase móvil. Inyectar 20 µL al cromatógrafo.

Se trataron disoluciones de Clortalidona y blancos de orina con estos procedimientos, para observar el grado de interferencia de compuestos endógenos en el cromatograma (limpieza de la muestra) y el porcentaje de recobro de la Clortalidona. Los resultados fueron los siguientes:

Ensayo	Recobro de Clortalidona	Limpieza de la muestra
1	Aproximadamente 100%	Muy Mala
2	Aproximadamente 90%	Mala
3	Aproximadamente 50%	Buena

Estos resultados se consideraron buenos, pero se tenía que trabajar con ellos para optimizar la limpieza y el porcentaje de recobro, por lo que se buscaron otras alternativas.

Con base en el sistema reportado por Dorsey⁽³⁸⁾ en el cual se utiliza un sistema cromatográfico en fase reversa, usando fase móvil compuesta casi por pura agua y una columna analítica CN, se propuso la utilización de cartuchos de extracción en fase sólida con este tipo de empaque. Se probaron los siguientes cartuchos:

- Cartucho de Extracción en fase sólida CN de 500 mg de fase con tratamiento de recubierta final (End capped).
- Cartucho de Extracción en fase sólida de 100 mg con el empaque anterior.

Con ambos cartuchos se procedió a hacer estudios de recobro de la Clortalidona con los siguientes pasos:

- Solvatación y acondicionamiento del cartucho:

Pasar 3 mL de metanol

Pasar 3 mL de agua cuidando de no secar el cartucho.

- Adición de la muestra:

Adicionar 0.6 mL de disolución de Clortalidona y 0.4 mL de agua.

- Lavado de la muestra

Para los cartuchos de 500 mg, pasar cuatro porciones de 1 mL de agua, recolectar el efluente e inyectar al cromatógrafo.

Para los cartuchos de 100 mg, pasar tres porciones de 1 mL de agua, recolectar el efluente e inyectar al cromatógrafo.

- Elución de la muestra:

Eluir con 1 mL de una mezcla acetona:metanol (50:50), recolectando el eluido.

- Preparación final

Evaporar a 60°C a sequedad bajo corriente de Nitrógeno y reconstituir en 600 µL de fase móvil. Inyectar 25 µL al cromatógrafo.

Con este procedimiento se obtuvieron los siguientes resultados:

Cartucho	Efluente	Recobro de Clortalidona
500 mg	Lavados	Aproximadamente 3.43%
	Eluido	Aproximadamente 103.46%
100 mg	Eluido	Aproximadamente 80%

Considerando estos resultados, se procedió a "cargar" muestras de orina fortificadas con una concentración de 0.1000 y 20.00 $\mu\text{g/mL}$ de Clortalidona en cartuchos de 500 mg. También se procesaron blancos de orina. Se utilizó el procedimiento indicado para los cartuchos de 500 mg pero reduciéndolos a tres porciones de 1 mL el paso de lavado. Los resultados obtenidos mostraron un recobro de aproximadamente 90% de Clortalidona en Orina y una limpieza adecuada de la muestra. En este punto se buscó un posible estándar interno para la Clortalidona. Se probaron el Naproxén, Probenecid, 2,7-Dihidroxinaftaleno, Fenol, Naftaleno y 2 Naftol, de los cuales se seleccionó el 2,7-Dihidroxinaftaleno que presentó un recobro de aproximadamente el 80% con el procedimiento de limpieza y una resolución adecuada en el Sistema Cromatográfico (Figura 3.3).

Teniendo una limpieza de muestra tan sencilla se pensó en la posibilidad de automatizarla, por lo que se montó un sistema como se describe en la Figura 1.8. Para la limpieza de muestra se utilizó una guardacolumna de "yo-yo" Waters empacada con un cartucho relleno con aproximadamente 100 mg de fase $\mu\text{Bondapak CN}$. El sistema se adaptó de modo que el tiempo de lavado de la muestra en el cartucho fué de 2 minutos a un flujo de 1 mL/min antes de que se le hiciera pasar la fase móvil en contraflujo para dirigir los compuestos de interés hacia la columna analítica. Con este cartucho se obtuvieron cromatogramas limpios, pero sólo se pudieron inyectar alrededor de 14 muestras antes de que disminuyera el recobro de la Clortalidona y de su estándar interno por saturación del cartucho. Posteriormente se probó con un cartucho de 20 mm x 3.6 mm de D.I. relleno con empaque NovapakCN de Waters, el cual pudo soportar aproximadamente 40 muestras antes de deteriorarse. Ante este problema, se pensó en hacerle un lavado y regeneración en línea, por lo que la bomba de lavado se conectó a un sistema de gradiente con mezclado a baja presión, el cual permitió hacer la regeneración del cartucho de limpieza al hacerle pasar Acetonitrilo y agua antes de realizar la siguiente inyección, durante el tiempo que duraba la corrida analítica. Con esta regeneración, el cartucho de lavado duró aproximadamente 80 muestras antes de deteriorarse.

Con el objeto de hacer más económico el análisis se buscó una fase estacionaria más estable que pudiera soportar el tratamiento de un gran número de muestras antes de deteriorarse. El mejor resultado se obtuvo con la fase "Stable Bond-CN" de Zorbax (presentación en

columna de 12.5 x 4 mm D.I.). Con este cartucho se pudieron tratar más de 300 muestras sin que mostrara signos de deterioro, lo cual lo hace muy adecuado para un estudio de bioequivalencia.

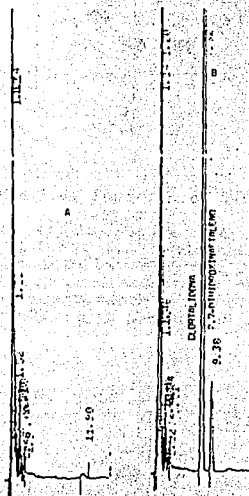


Figura 3.3. Cromatograma de las muestras de Clortalidona usando como fase móvil fosfato de potasio:Acetonitrilo 80:20 pH 7.0 a un flujo de 2 mL/min. A) Blanco de Orina. B) Orina cargada con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Clortalidona y 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 2,7-Dihidroxi-naftaleno.

En resumen el método quedó de la siguiente manera:

-Preparación de la Muestra: Mezclar 600 μL de muestra de orina con 400 μL de disolución de Estándar Interno (2,7-Dihidroxi-naftaleno). Inyectar 50 μL al Cromatógrafo.

-Limpieza de la Muestra, Análisis Cromatográfico y Regeneración del Cartucho:

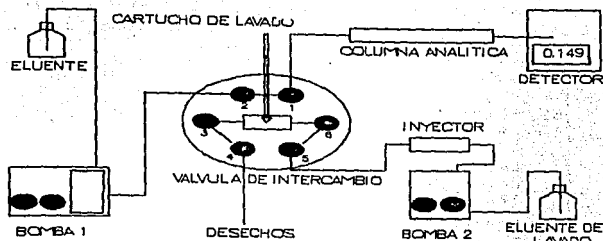


Figura 3.4. Posición de limpieza de la muestra

Como se muestra en la Figura 3.4, la muestra al inyectarse se deposita en la columna de lavado haciéndole pasar agua a un flujo de 1 mL/min para lavarla, eluyendo los compuestos endógenos de la orina y manteniendo la Clortalidona en el cartucho; mientras que la fase móvil pasa directamente a la columna analítica a un flujo de 2 mL/min. Estas condiciones permanecen durante 2 minutos.

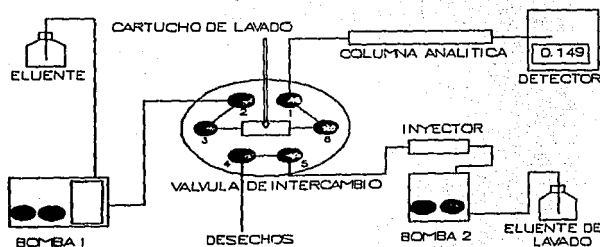


Figura 3.5. Posición de Elución de la muestra hacia la columna analítica

Transcurrido el tiempo de lavado, la válvula de intercambio rota de tal manera que el flujo de la fase móvil se hace pasar a través del cartucho de lavado para arrastrar la muestra hacia la columna analítica y así empezar el proceso cromatográfico de la muestra

(Figura 3. 5). Esta posición permanece durante 30 segundos para posteriormente pasar el sistema a la posición original y así iniciar la regeneración del cartucho de acuerdo a la Tabla 3.1:

Tabla 3.1. Tabla de Gradiente para la regeneración del cartucho

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Proporción (%)	
		Agua	Acetonitrilo
0.0*	1.0	100	0
2.7*	1.0	100	0
3.7	2.0	5	95
5.0	2.0	5	95
6.0	2.0	100	0
14.0	2.0	100	0
15.0**	1.0	100	0

* Tiempo de Lavado y elución de la muestra hacia la columna analítica

** Preparación del cartucho para recibir otra inyección.

Cromatogramas representativos se muestran en la Figura 3.6.

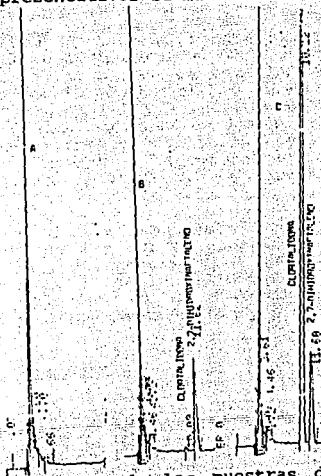


Figura 3.6. Cromatograma de las muestras de Clortalidona en el sistema definitivo para su análisis. A) Blanco de Orina. B) Orina cargada con 20 $\mu\text{g/mL}$ de Clortalidona C) Orina cargada con 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de Clortalidona. B) y C) en presencia de su estándar interno.

3.4 VALIDACION DEL METODO

Ya teniendo el método analítico se procedió a validar como se indica a continuación:

Especificidad

- a) Se realizó analizando bajo el método propuesto la orina de 7 sujetos voluntarios, y observando si ésta presentaba interferencias en el área de los compuestos de interés
- b) Se analizó también el metabolito reportado de la Clortalidona, el Acido 2-(3-aminosulfonil- α -clorobenzoil) benzoico (CCA) y se observó que no presentara interferencia con los compuestos de interés.
- c) Se analizaron disoluciones de Metildopa, Acido Salicílico, Cafeína, Naproxén y Probenecid, buscando aquellas sustancias que podrían ser una interferencia potencial de los compuestos de interés.

Intervalo Lineal y Función Respuesta

Como ya se mencionó al inicio de este capítulo, el intervalo de trabajo se fijó de 0.1000 $\mu\text{g/mL}$ a 20.00 $\mu\text{g/mL}$ de Clortalidona en orina. Para su caracterización se estableció una curva patrón en orina con puntos calibradores a las concentraciones de 0.1000, 0.2000, 0.5000, 1.000, 5.000 y 20.00 $\mu\text{g/mL}$. Esta curva se generó y procesó de manera independiente en los experimentos de precisión interdía. Para cada curva se realizó un análisis de regresión por mínimos cuadrados, tomando a la concentración como variable "x" y la respuesta (altura relativa de la Clortalidona respecto a su estándar interno) como variable "y".

La evaluación de la función respuesta consistió en la verificación de la consistencia de las curvas generadas, en el coeficiente de determinación de la recta generada, el cual no debería ser menor a 0.98, y en la evaluación de la calidad de ajuste, en el cual las concentraciones estimadas en el "cálculo de regreso" deberían cumplir con los criterios de exactitud y precisión de las muestras.

Exactitud y Precisión.

La precisión se evaluó en dos partes, precisión intradía y precisión interdía. Para este fin, se "cargaron" muestras de orina a las concentraciones de 0.1000, 0.3000, 7.000 y 16.00 $\mu\text{g/mL}$, las cuales se procesaron por triplicado durante tres días para la precisión interdía y por sextuplicado en un solo día para la precisión intradía. Todas las muestras se interpolaron en su curva patrón.

Para la precisión intradía se obtuvo el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de la concentración interpolada de todas las muestras de ese experimento, dándose por buena si el coeficiente de variación era menor al 15% (menor de 20% a la concentración de 0.1000 $\mu\text{g/mL}$).

Para la precisión interdía, se obtuvo el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de la concentración interpolada de todas las muestras obtenidas en los diferentes días que duró el experimento, dándose por buena si el coeficiente de variación era menor al 15% (menor de 20% a la concentración de 0.1000 $\mu\text{g/mL}$).

La exactitud se evaluó verificando que el promedio de la concentración interpolada en ambos experimentos de precisión no se alejara más del 15% de las concentraciones adicionadas (no más del 20% de la concentración de 0.1000 $\mu\text{g/mL}$).

Sensibilidad.

a) Límite de Cuantificación. Se estableció con la concentración de 0.1000 $\mu\text{g/mL}$ la cual debió haber cumplido con el criterio de $\pm 20\%$ para exactitud, precisión y calidad de ajuste en la prueba de función respuesta.

b) Límite de detección. Se estableció haciendo diluciones sucesivas de la concentración de 0.1000 $\mu\text{g/mL}$ de Clortalidona, llegando a las concentraciones aproximadas de 0.0500, 0.0200, y 0.0100 $\mu\text{g/mL}$, analizándolas con el método propuesto y obtener la dilución, que produjera una señal de 2 a 4 veces la señal de fondo.

Eficiencia de la Extracción (Recobro Absoluto).

La prueba de eficiencia de la extracción se realizó con disoluciones de Clortalidona en orina y en agua, ambas a las mismas concentraciones.

Para tener la referencia de las muestras acuosas, las disoluciones en agua se inyectaron al cromatógrafo pero no se hicieron pasar por el cartucho de lavado.

Las muestras de orina se procesaron de acuerdo al método propuesto.

El recobro absoluto se obtuvo al comparar el promedio de la respuesta de cada concentración obtenida en orina contra la correspondiente en agua. Para el estándar interno, se comparó el promedio global de la respuesta de éste en las muestras en orina contra el promedio global de la respuesta en las muestras en agua. Esa relación se expresó en porcentaje.

Estabilidad de la muestra.

La Estabilidad se evaluó de diferentes maneras:

a) Estabilidad de la Muestra Procesada Lista para su Análisis. Se prepararon muestras de orina adicionada de Clortalidona; se procesaron y se cuantificaron a las 0, 24 y 48 horas después de haber estado dentro del inyector automático del cromatógrafo siempre contra una curva patrón fresca. Se observó la consistencia de resultados a través del tiempo.

b) Estabilidad a ciclos de Congelación-Descongelación. Las muestras de Precisión Intradía se almacenaron y se sometieron a 3 ciclos de 24 horas cada uno de congelación-descongelación (-40°C - TA). Al final de este período, se procesaron por triplicado a cada concentración y se cuantificaron contra una curva patrón fresca. La concentración promedio obtenida, se comparó contra la obtenida originalmente.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 ESPECIFICIDAD

En la Figura 4.1 se muestran los cromatogramas de Clortalidona con su estándar interno, de 3 blancos de orina de 3 sujetos y del metabolito reportado para la Clortalidona.

Tabla 4.1
Tiempos de Retención de Algunos Compuestos en el Sistema
Cromatográfico de la Clortalidona

Compuesto	Tiempo de Retención (min)
Clortalidona	9.8
2,7-Dihidroxi-naftaleno	11.2
CCA	5.3
Naproxén	9.5
Cafeína	4.1
Probenecid	16.5
Metildopa	---
Acido Salicílico	---

De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que el método es específico a diferentes fuentes de matriz biológica, al CCA y a los fármacos probados, a excepción del Naproxén que sí es un interferente potencial.

4.2 INTERVALO LINEAL Y FUNCION RESPUESTA

En la Tabla 4.2 se muestran los resultados de los estadísticos de regresión de las curvas patrón generadas en los experimentos de exactitud y precisión. En la Tabla 4.3 se muestran los resultados de calidad de ajuste de dichas curvas y en las Figuras 4.2 a 4.4 las gráficas de las curvas patrón en los diferentes días.

Tabla 4.2
Análisis de Regresión de las curvas generadas en diferentes días
para la cuantificación de Clortalidona en el intervalo de 0.1000 a
20.00 $\mu\text{g/mL}$.

DIA	ORDENADA AL ORIGEN	PENDIENTE	COEFICIENTE DE DETERMINACION
1	0.002027	0.412342	0.9999996
2	0.010942	0.415881	0.9999825
3	-0.002426	0.421959	0.9999927

Tabla 4.3
Calidad de Ajuste para las curvas patrón generadas en diferentes
días para la cuantificación de Clortalidona en el intervalo de
0.1000 a 20.00 $\mu\text{g/mL}$.

DIA	CONCENTRACION ADICIONADA ($\mu\text{g/mL}$)					
	0.1000	0.2000	0.5000	1.000	5.000	20.00
	CONCENTRACION INTERPOLADA DE REGRESO ($\mu\text{g/mL}$)					
1	0.1073	0.2024	0.4964	0.994	4.999	20.00
2	0.0865	0.1856	0.4833	0.994	5.066	19.98
3	0.1121	0.2050	0.5235	0.986	4.965	20.01
$n =$	3	3	3	3	3	3
$\bar{X} =$	0.1020	0.1977	0.5011	0.991	5.010	20.00
D.E. =	0.0136	0.0106	0.0205	0.0047	0.0517	0.012
C. V. =	13.33	5.35	4.09	0.47	1.03	0.06
% DE ERROR =	1.99	-1.16	0.21	-0.88	0.21	-0.01

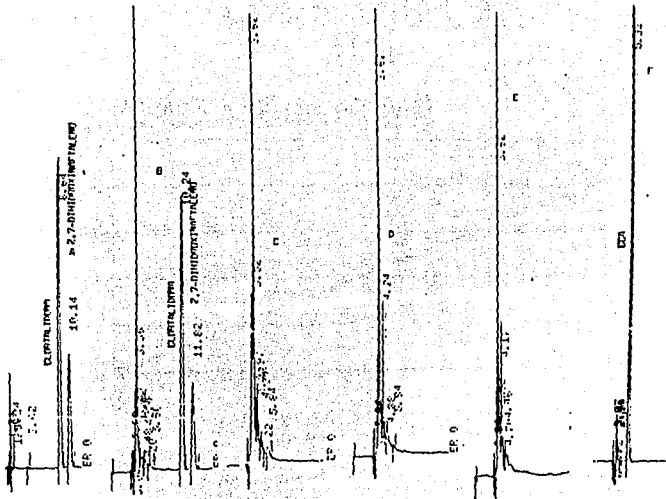
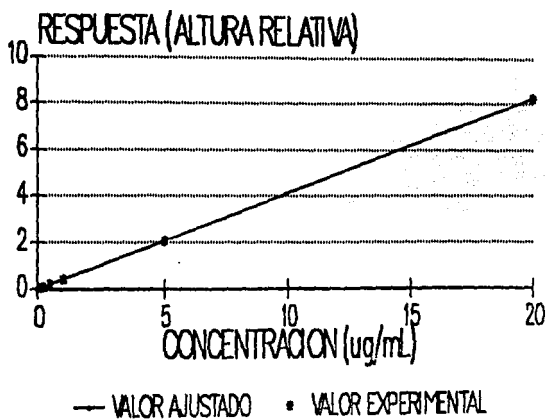


Figura 4.1
 Cromatogramas típicos de Clortalidona en Orina. A) Clortalidona con su estándar interno en disolución acuosa, B) Clortalidona en orina a 5 µg/mL. C), D) Y E) Blancos Orina provenientes de varios sujetos, F) Cromatograma del CCA.

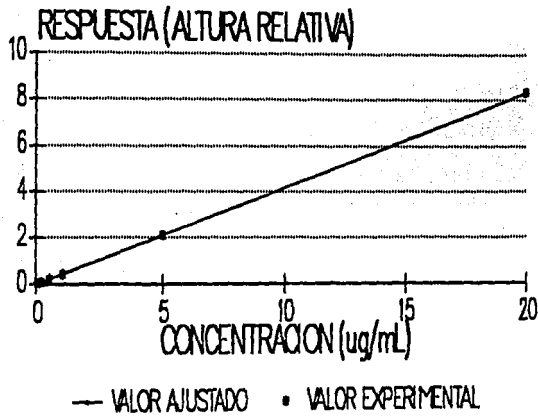
CLORTALIDONA
CURVA PATRON EN ORINA
DIA 1



$$y = 0.002027 + 0.412342 x$$
$$r^2 = 0.9999996$$

Figura 4.2.
Gráfica de Función Respuesta para el método de Cuantificación de
clortalidona en Orina. Día 1.

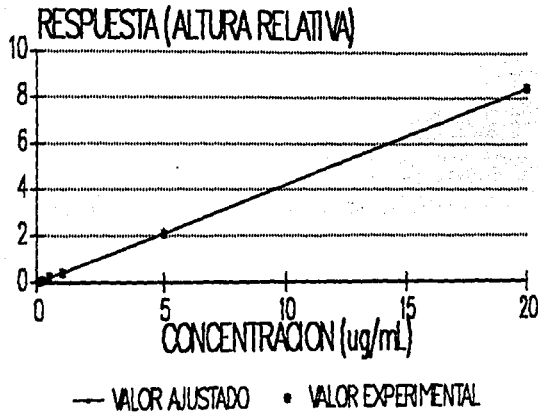
CLORTALIDONA
CURVA PATRON EN ORINA
DIA 2



$$y = 0.010942 + 0.415881 x$$
$$r^2 = 0.9999825$$

Figura 4.3.
Gráfica de Función Respuesta para el método de Cuantificación de
Clortalidona en Orina. Día 2.

CLORTALIDONA
CURVA PATRON EN ORINA
DIA 3



$$y = -0.002426 + 0.421959 x$$
$$r^2 = 0.9999927$$

Figura 4.4.
Gráfica de Función Respuesta para el método de Cuantificación de
Clortalidona en Orina. Día 3.

Como muestran los resultados, se observa consistencia de las curvas patrón durante los días del experimento, un excelente coeficiente de determinación en todas las curvas y la calidad de ajuste cae dentro de los criterios de aceptación de exactitud y precisión; por lo que se considera que la curva patrón presenta un comportamiento lineal del tipo $y = A + Bx$ para relacionar la concentración de clortalidona presente en la orina con la respuesta del sistema cromatográfico.

4.3 EXACTITUD Y PRECISION

A) Precisión intradía. La Tabla 4.3 presenta los resultados de Precisión Intradía

Tabla 4.3.
Precisión Intradía. Análisis de las Muestras Adicionadas

REPLICA NUMERO	CONCENTRACION ADICIONADA ($\mu\text{g/mL}$)			
	0.1000	0.3000	7.000	16.00
	CONCENTRACION CUANTIFICADA ($\mu\text{g/mL}$)			
1	0.0859	0.2869	6.951	14.03
2	0.0911	0.2967	6.860	15.76
3	0.1035	0.2974	6.846	15.80
4	0.0996	0.2954	6.902	15.89
5	0.0947	0.3087	6.948	15.99
6	0.0966	0.3090	6.656	16.08
n =	6	6	6	6
PROMEDIO =	0.0952	0.2990	6.860	15.59
D. E. =	0.0062	0.0085	0.109	0.77
C. V. =	6.55	2.83	1.59	4.97
PORCENTAJE DE ERROR =	-4.77	-0.32	-2.00	-2.55

B) Precisión interdía. La Tabla 4.4 presenta los resultados de Precisión Interdía

Tabla 4.4.
Precisión Interdía. Análisis de las Muestras Adicionadas

DIA	REPLICA NUMERO	CONCENTRACION ADICIONADA ($\mu\text{g/mL}$)			
		0.1000	0.3000	7.000	16.00
		CONCENTRACION CUANTIFICADA ($\mu\text{g/mL}$)			
1	1	0.1143	0.3338	7.087	16.15
	2	0.1100	0.3303	7.172	15.94
	3	0.1093	0.3304	7.015	16.09
2	1	0.0927	0.3219	7.322	16.42
	2	0.0912	0.3187	7.344	16.26
	3	0.0922	0.3161	7.133	16.53
3	1	0.1123	0.3245	6.646	14.93
	2	0.1117	0.3207	6.792	14.68
	3	0.1092	0.3101	6.514	15.15
n	=	9	9	9	9
PROMEDIO	=	0.1048	0.3230	7.003	15.79
D. E.	=	0.0097	0.0076	0.292	0.69
C.V.	=	9.25	2.36	4.17	4.36
PORCENTAJE DE ERROR	=	4.76	7.65	0.04	-1.29

Como se muestra en los resultados de precisión, el coeficiente de variación máximo para precisión intradía fué de 6.55% que corresponde a la concentración de 0.1000 $\mu\text{g/mL}$ y para la precisión interdía fué de 9.25% para la misma concentración. Como en ambos casos el coeficiente de variación fué menor al 15%, decimos que el método tiene una adecuada precisión.

En cuanto a exactitud, se observa que la desviación máxima encontrada en todas las concentraciones fué de 4.77% respecto al valor nominal y correspondió a la concentración de 0.1000 $\mu\text{g/mL}$. Debido a que esta desviación es menor al 15% se dice que el método cumple con el requisito de exactitud.

4.4 SENSIBILIDAD

a) Límite de Cuantificación. El límite de cuantificación se fijó en 0.1000 $\mu\text{g/mL}$, ya que esta concentración cumplió con los criterios de Exactitud, Precisión y Función Respuesta. En ningún experimento llevado a cabo, esta concentración presentó un coeficiente de variación mayor al 20% ni una desviación mayor del 20% a la concentración nominal. Además es la concentración menor considerada para el intervalo lineal.

b) Límite de detección. El límite de detección se fijó en 0.0200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ya que esta concentración es la que presentó una respuesta de 2 a 4 veces la señal del ruido (ver Figura 4.5).

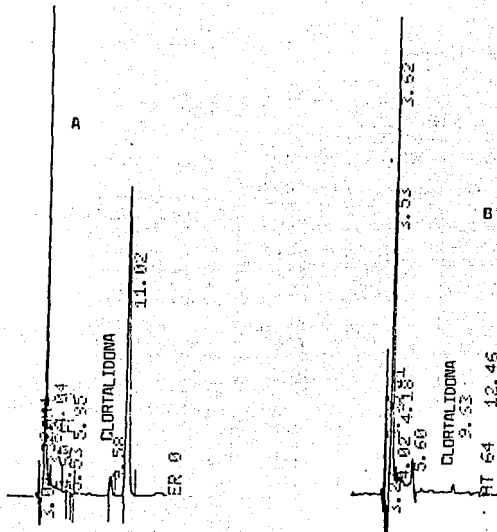


Figura 4.5
 Cromatogramas de Clortalidona en Orina. A) Clortalidona en orina a una concentración de 0.1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (concentración mínima cuantificable) y B) Clortalidona en orina a una concentración de 0.0200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (concentración mínima detectable).

4.5 EFICIENCIA DE LA EXTRACCION (RECOBRO ABSOLUTO)

En las tablas 4.5 y 4.6 se muestran los resultados de recobro absoluto. El recobro promedio para Clortalidona fué de 92.35% variando de 88.15 a 95.99% y para el estándar interno fué de 82.77%.

Tabla 4.5.
Recobro absoluto de la Clortalidona en las muestras de Orina.

SUSTANCIA	MEDIO	CONCENTRACION ($\mu\text{g/mL}$)				
		0.1000	0.3000	7.000	16.00	
		RESPUESTA (ALTURA, UNIDADES ARBITRARIAS)				
CLORTALIDONA	ACUOSO	756	1792	42276	95029	
		623	1799	42341	94985	
		630	1789	41448	93584	
		585	1717	40533	92637	
		570	1713	39639	90195	
n	=	5	5	5	5	
PROMEDIO	=	633	1762	41247	93286	
D. E.	=	73	43	1161	1999	
C. V.	=	11.59	2.45	2.81	2.14	
CLORTALIDONA	ORINA	618	1781	37556	82189	
		647	1703	37432	83781	
		---	1688	37333	81092	
		557	1676	36181	82165	
		597	1609	36451	81912	
n	=	4	5	5	5	
PROMEDIO	=	605	1691	36991	82228	
D. E.	=	38	62	628	976	
C. V.	=	6.26	3.64	1.70	1.19	
PORCENTAJE DE RECOBRO		95.57	95.99	89.68	88.15	92.35

Tabla 4.6.
Recobro absoluto del 2,7- Dihidroinaftaleno en las muestras de Orina.

2,7-DIHI-DRO- XINAFTALENO	MEDIO	
	ACUOSO	ORINA
n =	20	20
PROMEDIO =	15021	12434
D. E. =	485	527
C. V. =	3.23	4.23
PORCENTAJE DE RECOBRO	82.77	

4.6. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

a) Estabilidad de la muestra procesada lista para su análisis. Los resultados de la cuantificación de la muestra se graficaron y estas gráficas muestran que la Clortalidona es estable a 48 horas en el inyector lista para su análisis (Ver Figura 4.6).

b) Estabilidad a Ciclos de Congelación-Descongelación. La Tabla 4.8 muestra los resultados obtenidos después de haber sometido muestras a ciclos de congelación-descongelación, los cuales no muestran signos claros de degradación.

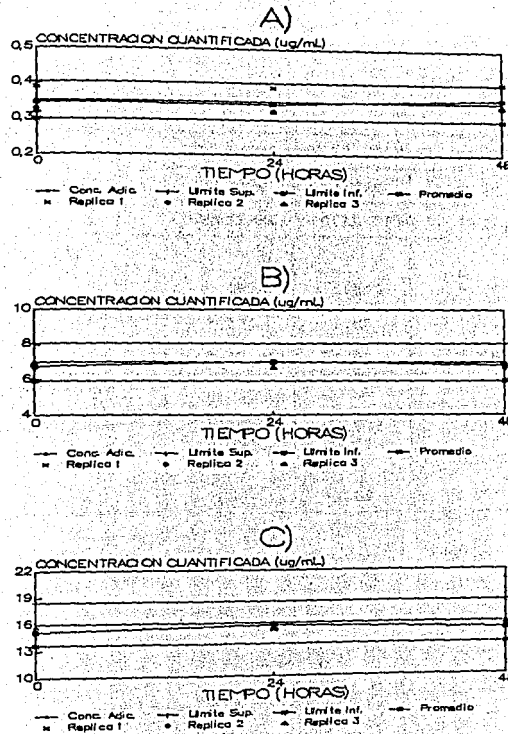


Figura 4.6
Gráficas de la estabilidad de la Clortalidona en la muestra procesada lista para su análisis por un lapso de 48 horas.
A) Muestra adicionada a una concentración de 0.3500 $\mu\text{g/mL}$,
B) Muestra adicionada a una concentración de 7.000 $\mu\text{g/mL}$ y
C) Muestra adicionada a una concentración de 16.00 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 4.8.
Estabilidad de la Muestra a Ciclos de Congelación-Descongelación

	CONCENTRACION ADICIONADA ($\mu\text{g/mL}$)		
	0.3000	7.000	16.00
	CONCENTRACION CUANTIFICADA ($\mu\text{g/mL}$)		
TIEMPO INICIAL			
n =	6	6	6
PROMEDIO =	0.2990	6.860	15.59
D. E. =	0.0085	0.109	0.77
C. V. =	2.83	1.59	4.97
PORCENTAJE DE ERROR =	-0.32	-2.00	-2.55
DESPUES DE CICLAR			
n =	3	3	3
PROMEDIO =	0.3197	6.532	14.86
D. E. =	0.0030	0.052	0.09
C. V. =	0.95	0.80	0.58
PORCENTAJE DE ERROR =	6.56	-3.69	-7.13

CONCLUSIONES Y PROPUESTAS

CONCLUSIONES

1) Se desarrolló un método analítico para cuantificar Clortalidona en Orina usando 2,7-Dihidroxi-naftaleno como estándar interno, con el objeto de ser utilizado en un estudio de bioequivalencia.

2) El método desarrollado requiere de poca manipulación de muestra, resulta rápido y económico, lo cual cumple con las características deseables para un estudio de esta naturaleza.

3) La validación previa al estudio de bioequivalencia muestra que la Clortalidona se puede cuantificar de manera selectiva de los compuestos endógenos de la orina, del CCA y de fármacos como Metildopa, Acido salicílico, Cafeína y Probenecid. El Naproxén puede interferir en la determinación.

4) La Clortalidona, con este método se cuantifica en el intervalo de 0.1 a 20 $\mu\text{g/mL}$ en la cual presenta una función lineal del tipo $y = A + Bx$.

5) El método es exacto y preciso de acuerdo a los requisitos aceptados para este tipo de métodos.

6) La Clortalidona se puede cuantificar de manera confiable a la concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ y se alcanza a detectar hasta 0.02 $\mu\text{g/mL}$.

7) El método presenta un recobro absoluto de la Clortalidona de alrededor del 92% y del 82% para su estándar interno.

8) La muestra permanece estable cuando se almacena en el inyector durante 48 horas antes de ser inyectada al sistema cromatográfico y a 3 ciclos de congelación-descongelación.

PROPUESTAS

1) Utilizar este mismo principio para la cuantificación de Clortalidona en sangre total para el estudio de bioequivalencia.

2) Estudio a fondo de las posibilidades de combinaciones de las diferentes tipos de cromatografía para la limpieza de muestras biológicas con el fin de obtener métodos sensibles en los cuales se elimine la manipulación excesiva de la muestra, se disminuyan costos y que se piense en utilizar en estudios de farmacia-clínica.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- U. S. Pharmacopeial Convention, Inc. (1990); The United States Pharmacopeia XXII ed., National Formulary XVII ed.; Rockville MD. 301 y 1815.
- 2.- Florey Klaus, "Analytical Profiles of Drugs Substances", American Pharmaceutical Association, 1985; 14, 1-36.
- 3.- Bauer John, Quick John, Krogh Susane y Shada Douglas, Journal of Pharmaceutical Sciences, 72, 924-928, 1983.
- 4.- Sa'Sa' S. I. Jalal I. M. y Khalil H. S., Journal of Liquid Chromatography, 11(8), 1673-1696, 1988.
- 5.- Pandit Nivedita y Hinderliter Janet S., Journal of Pharmaceutical Sciences, 74, 857-861, 1985.
- 6.- Goodman Gilman Alfred, Goodman Louis S. y Gilman Alfred. "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica", Editorial Médica Panamericana, Sexta edición 1982. 794, 888-892.
- 7.- Bowman W. C. y Rand M.J. "Farmacología" Nueva Editorial Interamericana, Segunda Edición 1984, 27.26-27.29.
- 8.- Heckheimer Estelle, Loobl Suzanne, Spratto George. "Manual de Farmacología", Ediciones Orientación, Nueva Edición 1990, 2, 661-668.
- 9.- Roger L. Williams, Cheryl D. Blume, Emil T Lin, Nicholas H.G. Holford y Leslie Z. Benet., Journal of Pharmaceutical Sciences, 71(5), 533-535, 1982.
- 10.- W. Dieterle et. al., Eur. J. Clin. Pharmac., 10(37), 1976.
- 11.- Secretaría de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (1988); Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Quinta ed.; México D. F. 600-601 y 1099-1101.
- 12.- Health Ministers; British Pharmacopeia 1993; London England. 150 y 836.
- 13.- U. S. Department of Health and Human Services. (1994); Approved Drug Products With Therapeutic Equivalence Evaluations, 14th ed.; Rockville MD.
- 14.- Consejo de Salubridad Nacional. (1989); Cuadro Básico de Medicamentos; México D.F.
- 15.- Dr. Emilio Resenstein.; Diccionario de Especialidades Farmacéuticas 37a ed. 1991; Ediciones PLM S.A. de C.V.

- 16.- Food and Drug Administration, Office of Generic Drug. (1983); Guidelines For a Protocol to Conduct Bioavailability Study on Chloralidone Drugs Products; Rockville MD.
- 17.- G. Piemonte, F. Tagliaro, M. Marigo y A. Frigerio. "Developments in Analytical Methods in Pharmaceutical, Biomedical, and Forensic Sciences", Plenum Press, New York, 1987.
- 18.- Gerald L. Hawk, Paul B. Champlin, Howard C. Jordi y David Wenke. "Biological/Biomedical of Liquid Chromatography", Marcel Dekker Inc., USA; 1979, 10.
- 19.- Gerald L. Hawk, Robert F. Hutton, Gordon Johnston, y Chris Mol. "Biological/Biomedical of Liquid Chromatography IV", Marcel Dekker Inc., USA; 1982, 20.
- 20.- Eric Reid y Ian Wilson. "Analysis for Drugs and Metabolites, Including Anti-inefective Agents", Royal Society of Chemistry, 1990, 20.
- 21.- Ronald E. Majors., J.C.GC The Magazine of Separation Science, 10(12), 912-918, 1992.
- 22.- R. D. McDowall, Journal of Chromatography, 492, 3-58, 1989.
- 23.- Bioavailability and Bioequivalence Requirements. 21 CFR 320 (1991)
- 24.- Vinod P. Shah, Kamal K. Midha, Shrikant Dighe, Iain J. McGilveray, Jerome P. Skelly, Avraham Yacobi, Thomas Layloff, C. T. Viswanathan, C. Edgar Cock, R.D. McDowall, Kenneth A. Pittman y Sidney Spector., Pharmaceutical Research, 9(4), 588-592, 1992.
- 25.- A. R. Carterright et. al., Drug Information Journal, 25, 471-482, 1991.
- 26.- Shrikant Dighe., Clin. Res. Practices & Drug Req. Affairs, 2(4), 401-421, 1984.
- 27.- Vinod P. Shah., Clin. Res. Practices & Drug Req. Affairs, 5(1), . 51-60, 1987.
- 28.- H. Thomas Karnes, Gerald Shiu, y Vinod P Shah., Pharmaceutical Research, 8(4), 421-426, 1991.
- 29.- Canadian Health Protection Branch, The U.S. Food and Drug Administration, and the United States Pharmacopeia. Memorias de International Open Conference on Dissolution, Bioavailability and Bioequivalence., Junio 15-18 de 1992, Toronto Canada.
- 30.- Peter G. Welling, Francis L. S. Tse, Shrikant V. Dighe. "Pharmaceutical Bioequivalence", Drugs and Pharmaceutical Sciences, 48, Marcel Dekker INC., 1991.

- 31.- M. G. Tweeddale y R. I. Ogilvie., Journal of Pharmaceutical Sciences, 63(7), 1065-1068, 1974.
- 32.- H. L. J. M. Fleuren y J. M.. Van Rossum., Journal of Chromatography, 152, 41-54, 1978.
- 33.- M. Ervik y K. Gustavii., Analytical Chemistry, 46, 39, 1974.
- 34.- A. J. M. Guslen, A M. Baars y T. B. Vree., Journal of Chromatography, 181, 497-503, 1980.
- 35.- T. B. Vree, B. Lenseink, F. T. M. Huysmans, H. L. J. Fleuren y Th. A. Thien., Journal of Chromatography, 164, 228-234, 1979.
- 36.- J. Mcainsh, W. Bastain, J. Young y D. Harry., Biopharmaceutics & Drug Disposition, 2, 147-156, 1981.
- 37.- M. J. Rosenberg, K. K. Lam y T. E. Dorsey., Journal of Chromatography (Biomedical Applications), 375, 438-443, 1986.
- 38.- R. L. Williams C. D. Blume, E. T. Lin, N. H. G. Holford y L. E. Benet., Journal of Pharmaceutical Sciences, 71, 583, 1982.
- 39.- D. C. Muirhead y R. B. Christie., Journal of Chromatography (Biomedical Applications), 416, 420-425, 1987.
- 40.- T. R. MacGregor, P. R. Farina, M. Hagopian, N. Hay, H. J. Esber y J. J. Keirns., Therapeutical Drug Monitoring, 6, 83, 1984.
- 41.- R. O. Fullinfaw, R. W. Bury y R. F. W. Moulds., Journal of Chromatography (Biomedical Applications), 415, 347-356, 1987.
- 42.- Song-Ja Park, HeSoo Pyo, Yun-Je Kim, Mi-Soek Kim y Jongsei Park., Journal of Analytical Toxicology, 14, . 84-90, 1990.