



10
rej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**" DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO PARA DETERMINAR METABOLITOS DE
ASPIRINA, ACIDO SALICILURICO Y ACIDO
SALICILICO, EN ORINA POR CROMATOGRAFIA
LIQUIDA "**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A ,
GUADALUPE CANSECO RUIZ**



ASESOR: M. en C, INES FUENTES NORIEGA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo
Desarrollo y validación de un método analítico para determinar metabolitos de aspirina, ácido salicílico y ácido salicílico en orina por cromatografía líquida.

que presenta la pasante: Guadalupe Canseco Ruiz
con número de cuenta: 8502285-0 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 18 de Agosto de 1995.

PRESIDENTE	M. en C. Inés Fuentes Noriega.	
VOCAL	Q.F.B. Elizabeth G. Toriz García	
SECRETARIO	M. en C. Luisa Martínez Aguilar	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. José A. Garduño Rojas	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Guadalupe Rebolledo Barrera	

Dedico este trabajo con mucho cariño.

A Dios porque me permite seguir viviendo, por darme la paciencia y alegría de seguir adelante cuando todo parece terminar. Gracias por escucharme siempre señor.

A mi madre.

Por ser mi mejor amiga, por apoyarme en todo lo que hago. Gracias por tu ayuda desinteresada, por compartir conmigo momentos de alegría, dolor, y angustia. Gracias por ser fuerte, alegre y amorosa. Gracias por ser mi mamá, te amo.

A mi padre.

Por estar siempre con nosotros, por ser el árbol que amarra la tierra cuando los fuertes vientos soplan para derrumbarnos. Gracias por el amor que me das, gracias por ser mi papá, te amo.

A mis hermanos.

Viky, J. Manuel, Isabel, Alicia, F. Javier, Norma y J. Bernarda, por el cariño y apoyo que me dan, por los momentos felices que hemos pasado. Gracias.

A mis cuñados.

Angel, Braulio, Hilarión, Justina, Zoila, y Alejandro, por el apoyo e interés mostrado en mí.

A mis sobrinos.

Laura, A. Omar, Diego, J. Luis, J. Angel, Eduardo, Alberto, Daniel, Oswaldo, Oscar. De quienes se aprende mucho por ser niños.

A mis maestros.

Con respeto y admiración a mis maestras, Antonio Trejo, Ana María V, M. Esther R, M. Eugenia, E. Toriz, Laura Frago, Eva Molina, José Garduño, Rodolfo Cruz, etc...

AGRADECIMIENTOS.

A CONACYT PFPN1121/92 por el apoyo dado para la realización de este trabajo, así como a PADEP 5006.

A mi asesor.

M. en C. Inés Fuentes, por la ayuda y paciencia dada en la realización de este trabajo y por la espera en la terminación de este. Por siempre gracias.

A las maestras Margarita Rodríguez y Helgi Jung, por el apoyo e interés mostrado en la realización de este trabajo.

A mis sinodales, por el tiempo invertido en revisar este trabajo, así como por las sugerencias hechas, que enriquecieron el contenido de este. Gracias.

A mis amigos

Por los momentos vividos, por el apoyo que siempre me dieron, y porque aprendo de ustedes día a día. Solo menciono algunos no porque no me acuerde sino por falta de espacio. Tere, Mary, Sandra, Lolita, Enriqueta, Paty E, Lupita A, Juana C, Margarita O, Lupita M, Ena, Victor, Rafael, Miguel, Noe, Amalia, Lety, Yolanda B, Juan, Mario, Ana, Viky, Josefina, Yolanda...

A todas las personas del departamento de Biofarmacia, por los momentos vividos, Manuel, Lalo, Luisa, Katya, Elsa T, Magda, Ana, Lorena, Liz, Luis, Aldo, Lino, Elsa,.....

Y a todos aquellos que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

INDICE

I.- INTRODUCCION Y OBJETIVOS.	1
II.- GENERALIDADES.	
II.1.0.- Monografía del ácido acetilsalicílico.	3
II.2.0 - Propiedades farmacológicas de los salicilatos.	4
II.2.1.- Mecanismo de acción.	4
II.2.2.- Absorción.	5
II.2.3.- Distribución.	6
II.2.4.- Biotransformación.	7
II.2.5.- Excreción.	8
II.2.6.- Toxicidad.	11
II.2.7.- Reacciones adversas.	11
II.2.8.- Contraindicaciones.	12
II.2.9.- Formas farmacéuticas y vías de administración.	13
II.3.0.- Métodos de valoración en fluidos biológicos.	
II.3.1.- Métodos colorimétricos.	14
II.3.2.- Métodos por cromatografía líquido-gas.	14
II.3.3.- Métodos por cromatografía líquida en columna.	15
II.4.0.- Generalidades de cromatografía líquida.	
II.4.1.- Fase móvil.	19
II.4.2.- Sistema de bombeo.	20
II.4.3.- Inyector.	20
II.4.4.- Columna cromatográfica.	21
II.4.5.- Fase estacionaria.	22
II.4.6.0.- Detectores.	23
II.4.6.1.- Detector de absorción UV/VIS.	24
II.4.6.2.- Detector de índice de refracción.	24
II.4.6.3.- Detector de fluorescencia.	25
II.4.6.4.- Detector electroquímico.	25
II.4.6.5.- Detector conductimétrico.	25
II.4.6.6.- Detector de radioactividad.	25

II.4.7.0.- Integradores.	25
II.4.8.0.- Análisis cuantitativo para cromatografía líquida.	26
II.4.8.1.- Estándar interno.	26
II.5.0.- Propiedades particulares de la orina.	27
II.6.0.- Validación de métodos analíticos.	27
II.6.1.- Linealidad	28
II.6.2.- Precisión.	29
II.6.3.- Exactitud.	29
II.6.4.- Reproducibilidad.	30
II.6.5.- Especificidad.	30
II.6.6.- Concentración mínima cuantificable.	31
II.6.7.- Concentración mínima detectable.	31
II.6.8.- Estabilidad.	31

III.- PARTE EXPERIMENTAL.

III.1.0.- Material.	32
III.1.1.- Equipo.	32
III.1.2.- Reactivos.	32
III.1.3.- Soluciones.	33
III.1.4.- Preparación de soluciones.	33
III.2.1.- Método de extracción.	35
III.2.2.- Condiciones cromatográficas.	35

III.3.0.- Validación del sistema.

III.3.1.- Linealidad del ácido salicílico (Asu) y ácido salicílico (As)	37
III.3.2.- Precisión del Asu y As.	38

III.4.0 - Validación del método analítico.

III.4.1.- Linealidad para Asu y As.	38
III.4.2.- Precisión para Asu y As.	38
III.4.3.- Exactitud para Asu y As	39
III.4.4.- Reproducibilidad para Asu y As.	39
III.4.5.- Límite de detección para Asu y As.	39
III.4.6.- Especificidad para Asu y As.	40
III.4.7.- Estabilidad de las muestras de orina.	40

IV.- RESULTADOS y DISCUSION DE RESULTADOS

IV.1.- Linealidad del sistema ácido salicílico (Asu)	41
IV.2.- Precisión del sistema para Asu.	43
IV.3.- Linealidad del sistema ácido salicílico (As)	44
IV.4.- Precisión del sistema para As.	46
IV.5.0.- Validación del método analítico para ácido salicílico (Asu)	
IV.5.1.-Tiempos de retención de Asu, As, MP.	47
IV.5.2.-Especificidad del método para Asu y As en orina.	47
IV.5.3.- Linealidad del método en Asu.	48
IV.5.4.- Precisión del método en Asu.	51
IV.5.5.- Exactitud del método en Asu.	51
IV.5.6.- Reproducibilidad del método en Asu.	52
IV.5.7.- Estabilidad del Asu en orina.	54
IV.6.0.- Validación del método analítico para ácido salicílico (As)	
IV.6.1.- Linealidad del método en As..	55
IV.6.2.- Precisión del método en As.	57
IV.6.3.- Exactitud del método en As.	58
IV.6.4.- Reproducibilidad del método para As.	59
IV.6.5.- Estabilidad del As en orina.	61
IV.7.0.- Limite de detección de Asu y As en orina	62
V.0.- Conclusiones.	63
VI.0.- Bibliografía.	64

INDICE DE TABLAS

TABLA	PAGINA	
I	Construcción de la curva de calibración Asu/As en metanol.	38
II	Construcción de la curva de calibración Asu/As en orina.	38
III	Linealidad del sistema en ácido salicílico (Asu)	41
IV	ANADEVA de la linealidad del sistema en Asu.	42
V	Precisión del sistema en Asu.	43
VI	Linealidad del sistema en ácido salicílico (As).	44
VII	ANADEVA de la linealidad del sistema en As.	45
VIII	Precisión del sistema en As.	46
IX	Linealidad del método en ácido salicílico	48
X	ANADEVA de la linealidad del método en Asu.	49
XI	Precisión del método en Asu.	51
XII	Exactitud del método en Asu..	51
XIII	Reproducibilidad del método en Asu.	53
XIV	ANADEVA de la reproducibilidad del método en Asu.	53
XV	Estabilidad del Asu en orina.	54
XVI	Linealidad del método en ácido salicílico.	55
XVII	ANADEVA de linealidad del método en As.	55
XVIII	Precisión del método en As.	57
XIX	Exactitud del método en As.	58
XX	Reproducibilidad del método en As.	60
XXI	ANADEVA de la reproducibilidad del método en As.	61
XXII	Estabilidad del As en orina.	61

INDICE DE FIGURAS

<i>FIGURA</i>		<i>PAGINA</i>
1	Productos de biotransformación del ácido acetilsalicílico.	10
2	Equipo básico de un cromatógrafo de líquidos.	19
3	Diagrama de flujo para la extracción de Asu y As en orina.	36
4	Gráfica de linealidad para el sistema en ácido salicílico.	41
5	Gráfica de linealidad para el sistema en ácido salicílico	44
6	Cromatogramas de Asu y As en metanol y orina.	46
7	Gráfica de linealidad del método en ácido salicílico.	47
8	Gráfica de linealidad del método en ácido salicílico.	56
9	Cromatograma de la concentración mínima detectable.	62

GENERALIDADES

1.0.- INTRODUCCION

El ácido acetilsalicílico fue sintetizado en 1853 por Gerkard, pero fue Dreser en 1899 quien demostró sus propiedades antiinflamatorias.⁽¹⁾ En algunos países el ácido acetilsalicílico recibe el nombre comercial de aspirina.

El ácido acetilsalicílico así como los demás salicilatos, están clasificados dentro del grupo de los "agentes desinflamatorios, antipiréticos y analgésicos no narcóticos" debido a que no causan dependencia y causan pocos efectos en la identificación de estímulos dolorosos por parte del cerebro.⁽²⁾

A pesar de que el ácido acetilsalicílico tiene un uso tan antiguo, sigue siendo el fármaco más empleado para lograr un efecto desinflamatorio, analgésico y antipirético y son el prototipo con el cual se valoran los nuevos fármacos de su tipo. En la actualidad este fármaco es uno de los productos de uso popular y de más frecuente uso debido a sus propiedades farmacológicas y a su gran eficacia terapéutica, siendo particularmente útil en el tratamiento de molestias muscoesqueléticas, cefaleas, y artritis reumatoide, entre otras.⁽³⁾

En México el ácido acetilsalicílico es manufacturado en varias formas farmacéuticas por diferentes laboratorios lo que hace que se encuentre disponible en el mercado bajo distintos nombres de marcas comerciales, lo que lleva a realizar estudios de bioequivalencia para demostrar que la biodisponibilidad del fármaco es la misma en cualquier marca comercial. Por lo cual, es necesario tener un método analítico confiable para determinar y cuantificar los productos de biotransformación de aspirina en fluidos biológicos, en este caso en orina.

En el presente trabajo se plantea la validación de un método analítico para cuantificar los productos de biotransformación de aspirina en una matriz biológica (orina) por cromatografía líquida de alta resolución.

El método se realiza en orina por que su recolección es más fácil y los estudios de bioequivalencia en éste ambito han sido poco estudiados, por otro lado la impermanencia de los salicilatos en orina es alrededor de 24 horas siendo mayor que en plasma. El método se plantea de acuerdo a dos productos de biotransformación que son excretados en mayor cuantía que son el ácido salicílico (75 %) y el ácido salicílico en (10%) aproximadamente, ya que los otros productos de biotransformación sólo son excretados en un porcentaje menor al 10%.

I.1.- OBJETIVO

El objetivo que se plantea es el siguiente:

1.- Validar el método analítico implementado tomando en cuenta la especificidad, linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, concentración mínima detectable, y estabilidad del ácido salicílico y ácido salicílico en orina.

II. - GENERALIDADES

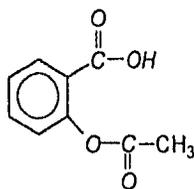
II.1.- MONOGRAFIA DE ACIDO ACETILSALICILICO (ASPIRINA)

Nombre químico: Ácido 2-(acetyloxy)benzoico, acetato de ácido salicílico.

Nombres sinónimos: Acido 2-acetoxibenzoico, ácido acetilsalicílico, acetilil, ácido acetosálico, acetil-SAL.

Fórmula condensada: $C_9 H_8 O_4$.

Estructura química:



Composición porcentual: Carbono 60%, Hidrógeno 4.48%, Oxígeno 35.53 %.

Peso molecular: 180.15 g/mol.

Gravedad específica: 1.40

Punto de fusión: 135 °C con calentamiento rápido.

Constante de disociación: pKa 3.5 a 25 °C.

Aspecto físico: Se puede presentar en forma de cristales de color blanco a incoloros, o como granulados blancos, es estable al aire seco pero se hidroliza en forma gradual en contacto con la humedad, produciendo ácido acético y ácido salicílico, presentando un ligero olor a ácido acético.⁽⁴⁾

Solubilidad: 1 gramo se disuelve en 300 ml de agua a 25 °C, en 100 ml de agua a 37 °C, 5 ml de alcohol, 17ml de cloroformo, de 10-15 ml de éter. Soluble en soluciones de acetatos y citratos, se descompone con agua hirviendo o cuando se disuelve en soluciones de hidróxidos alcalinos y carbonatos.⁽⁵⁾

Usos: Se emplea en medicina como agente analgésico, antipirético y antiinflamatorio.⁽³⁾

II.2.- PROPIEDADES FARMACOLOGICAS

Las propiedades farmacológicas de los salicilatos se debe a la presencia del grupo carboxilo e hidróxilo de su molécula cambiando de esta manera su potencia y toxicidad de estos compuestos al variar posiciones y sustituyentes. La posición orto del grupo hidróxilo es una característica importante en la acción de los salicilatos.⁽⁶⁾

El ácido acetilsalicílico es frecuentemente usado por sus efectos analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos y ha sido considerado como el fármaco de primera elección en el tratamiento de artritis reumatoide y osteoartritis.^(7, 8, 9)

Se ha encontrado que la aspirina interfiere con la agregación plaquetaria y que es ahora aprovechado por la U.S Food and Drug Administration como sustancia terapéutica para reducir el riesgo de ataques isquémicos cerebrales transitorios o recurrentes.⁽⁹⁾

Más recientemente el AAS se ha empleado como un agente antitrombótico basado en su habilidad para inhibir la función plaquetaria. El ácido salicílico que es otro salicilato presenta las mismas propiedades farmacológicas que el ácido acetilsalicílico sólo que causa mayor daño a la mucosa gástrica, por lo cual su uso está limitado a una aplicación tópica externa, como un compuesto altamente irritante que produce queratolisis; estas propiedades lo han llevado a que se use como un agente queratolítico para el tratamiento de verrugas, callos y en otros trastornos cutáneos.⁽¹⁾

Se ha reportado que la respuesta obtenida de pacientes artríticos tratados con dosis terapéuticas de ácido acetilsalicílico, son igual a los observados en pacientes tratados con ácido salicílico, con la diferencia de que hay menos úlceras gástricas en los pacientes tratados con ácido acetilsalicílico.⁽¹⁰⁾

II.2.1.-MECANISMO DE ACCION

El mecanismo de acción de los salicilatos no esta aún bien establecido, pero el que se acepta y se maneja es el propuesto por Vane en 1971. Sugiere que los fármacos antiinflamatorios no esteroides actúan inhibiendo la prostaglandina sintetasa.⁽¹¹⁾

Acción antiinflamatoria: Los fármacos de tipo aspirina son eficaces para evitar el edema, exudados celulares y el dolor que causa la inflamación. Esto se debe a la inhibición de la síntesis de prostaglandina sintetasa que es la responsable de permitir la síntesis de prostaglandinas que son mediadores importantes causantes del dolor en la reacción inflamatoria que se localizan en los lugares inflamados. ⁽⁶⁾

Acción antipirética: Los salicilatos provocan un descenso importante en la temperatura corporal en estado febril pero en estado normal esta acción no se aprecia. Esta pérdida de calor se produce por la vasodilatación cutánea que da lugar a una piel de color roja-caliente disipándose el calor por sudoración.

II.2.2.-ABSORCION

Los salicilatos se encuentran dentro de los fármacos que son absorbidos con mayor velocidad por cualquier vía que se le administre, el ácido acetilsalicílico es un ácido débil de pKa 3.5 que se absorbe con rapidez y de forma completa a través del tracto gastrointestinal. ⁽¹²⁾

Cuando se le administra por vía oral, sólo una pequeña cantidad de esta dosis se absorbe en el estómago a pesar de que el pH ≈ 1 es muy favorable para su mejor absorción, mientras que la mayor cantidad de la dosis se absorbe mejor en el intestino delgado superior especialmente en el duodeno, debido a que el área superficial de este tejido es mucho mayor. ⁽²⁾

Son múltiples los factores que pueden afectar la velocidad de absorción del ácido acetilsalicílico (ASA) en una administración oral, entre éstos. ⁽¹³⁾

pH de las superficies de la mucosa gastrointestinal.

La tasa de vaciamiento gástrico.

El contenido gástrico.

Interacción con otros medicamentos especialmente (antiácidos y agentes amortiguadores).

La velocidad con que se disuelve la forma farmacéutica en los fluidos gástricos.

Manson D. y otros, señalan que el proceso más lento y determinante en la absorción de los salicilatos es la disolución de la forma farmacéutica en los fluidos gastrointestinales y por lo tanto las características fisicoquímicas de los excipientes que conforman al medicamento son de gran importancia.⁽¹⁴⁾

En un estudio comparativo realizado en 3 tabletas comerciales de AAS, revela que influye la cantidad de agua que se ingiere en la toma de la tableta, ya que a mayor cantidad de agua ingerida es mayor la absorción de aspirina.⁽¹⁵⁾

También se ha encontrado que el tiempo medio de absorción de ASA en el estómago sin alimentos puede ser menor de 30 minutos, pero en presencia de alimentos el tiempo de absorción se duplica.⁽¹⁶⁾

Manson, realizó un estudio de cinética de absorción de AAS usando diferentes soluciones amortiguadoras concluyendo que cuando se usan estas soluciones la velocidad de absorción de AAS es más rápida reduciendo así la irritación gastrointestinal.⁽¹⁴⁾

II.2.3.- DISTRIBUCION

El ácido acetilsalicílico después de su absorción llega a sangre donde se une a las proteínas plasmáticas especialmente a la albúmina que sirve de depósito de dichos fármacos. Se cree que la aspirina se combina con la albúmina a través de su radical acetilo lo que da lugar a la formación de un antígeno responsable de los fenómenos de hipersensibilidad que suelen presentar algunos pacientes que son tratados con aspirina.⁽¹⁷⁾

El ácido acetilsalicílico unido a proteínas es farmacológicamente inactivo mientras que la fracción libre es la que presenta la actividad farmacológica y es la que se distribuye en todos los tejidos por un mecanismo de difusión pasiva pH dependiente. En los estudios de farmacocinética realizados en humanos reportan que el ácido acetilsalicílico se absorbe principalmente como salicilato.^(13, 16)

El ASA libre se distribuye en líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, fluido peritoneal, saliva y leche, pero no en jugo gástrico, lo hace muy poco en sudor y bilis; también atraviesa fácilmente la barrera placentaria y puede llegar al feto en desarrollo. Las concentraciones máximas de salicilato reportados se encuentran en plasma, hígado, corazón y pulmón.⁽¹³⁾

La vida media del ácido acetilsalicílico en plasma es corta sólo de 15-20 minutos debido a que sufre una hidrólisis rápida a ácido salicílico por esterasas no específicas que se encuentran en varios tejidos.⁽⁶⁾ Mientras que la vida media plasmática de salicilato es de 3-6 horas a bajas dosis (menor a 1 g/día) y a dosis altas (4 g/día) la vida media se prolonga pudiendo llegar a ser más de 15 horas; el aumento de este tiempo se debe a la saturación de las enzimas responsables de la conjugación de salicilato a glicina y glucurónido.⁽¹⁸⁾

La fracción de salicilato unido a albúmina es de 80-90%. Constituye una reserva de fármaco en el cuerpo que se encuentra en equilibrio con la forma libre por lo cual todo factor que altere este equilibrio puede conducir a efectos tóxicos. Esto toma gran importancia cuando se administra a niños y pacientes en estado desnutrición, porque se ha reportado que en pacientes con desnutrición las cantidades de albúmina están disminuidas y que con la misma dosis terapéutica la concentración de salicilatos libre aumenta y por lo tanto alcanzar niveles tóxicos.⁽¹²⁾

También se ha encontrado que la albúmina plasmática en niños se encuentra reducida lo que causa que la ingestión de una dosis de aspirina mal dosificada en niños, produce que las concentraciones de salicilato libre se eleven demasiado y causen toxicidad, se han reportado varias muertes de niños debido a esta causa.⁽¹⁷⁾

II.2.4.-BIOTRANSFORMACION

El ácido acetilsalicílico es desacetilado con gran rapidez por esterasas plasmáticas para formar ácido salicílico (Producto de biotransformación farmacológicamente activo) y ácido acético, esta es una reacción rápida con una vida media aproximada de 15 minutos.⁽¹⁶⁾

Posteriormente el ácido salicílico experimenta otra reacción de biotransformación pero ahora a nivel de mitocondrias hepáticas, donde una fracción se conjuga con glicina para formar el ácido salicílicúrico y la otra fracción con el ácido glucurónico para formar dos conjugados uno de tipo éter (Salicil-acil-glucurónido) y el otro de tipo éster (salicilfenol glucurónido). Estos se consideran como los principales productos de la transformación del AAS junto con el ácido salicílico libre.⁽⁷⁾ Fig. 1.

Una pequeña fracción de ácido salicílico se oxida a ácido gentísico (2,5-dihidroxibenzoico), 2,3 dihidroxibenzoico, el 2,3,5-trihidroxibenzoico y después una fracción de ácido gentísico se conjuga con glicina para formar el ácido gentisúrico. Todos los productos de biotransformación del AAS son muy polares y son excretados por vía renal.

Todos los procesos de biotransformación y excreción de AAS siguen una cinética de primer orden excepto las conjugaciones de ácido salicílico con glicina y ácido glucurónico que son cinéticas que dependen de la dosis administrada.⁽¹⁹⁾

Levi, estudió la cinética de formación de ácido salicílico y glucurónico salicílico en el hombre y observó que la reacción de formación de ácido salicílico pasa de una cinética de primer orden a una de orden cero, cuando la cantidad de ácido salicílico en el cuerpo supera la cantidad derivada de la biotransformación de menos de 1 g de aspirina, mientras que los niveles de conjugación con ácido glucurónico está saturado a niveles más altos de ácido salicílico.^(15, 19)

La velocidad de biotransformación de los salicilatos no está determinada sólo por la concentración sino que también depende de la velocidad de acción de las enzimas, estos cambios adquieren significado clínico muy importante cuando se hace mal uso de la dosis, porque se podría llegar a consecuencias potencialmente peligrosas durante una terapia prolongada de aspirina.⁽¹⁹⁾

II.2.5.- EXCRECION

Todos los salicilatos se eliminan por vía renal y lo realizan por filtración glomerular, reabsorción y secreción tubular. Las cantidades reportadas que se excretan en orina son las siguientes:

-Acido salicílico	75.0 %
-Acido salicílico	10.0 %
-Glucurónico salicílico fenólico	10.0 %
-Glucurónico salicílico acílico	5.0 %
-Acido gentísico	1.0 %

Mientras que los otros productos de biotransformación sólo se eliminan en un porcentaje menor al 1.0 %, en algunos casos sólo se encuentran vestigios de éstos. La cantidad de ácido salicílico libre encontrada en orina es en extremo variable y depende tanto de la dosis administrada como del pH urinario. En orina alcalina más del 30 % del fármaco ingerido puede eliminarse como salicilato libre mientras que en orina ácida puede ser sólo del 2 %.⁽⁶⁾

La alcalinización de la orina incrementa la velocidad de excreción de los salicilatos libres cuando el ácido acetilsalicílico es usado en bajas concentraciones (650 mg/día) la eliminación está de acuerdo a una cinética de primer orden y la vida media en plasma es aproximadamente cerca de 3-5 horas mientras que a dosis altas (4 g/día) la cinética es de orden cero y la vida media en plasma aumenta de 15 a más horas.⁽¹⁸⁾

Este efecto puede observarse después de una semana y está dada por la saturación de los sistemas hepáticos que catalizan la formación de salicilato a salicilglucurónido y ácido gentísico.^(13, 19)

Los conjugados glucurónicos de los ácidos salicílico y gentísúrico son ácidos orgánicos hidrosolubles por lo cual no difunden con facilidad a través de las células del túbulo renal. Estos productos de biotransformación no se excretan mediante un proceso pH dependiente como lo hace el ácido salicílico libre, sino que se filtran en el glomérulo y son segregados por el sistema para el transporte de ácidos orgánicos.⁽¹⁹⁾

El ácido salicíúrico sufre una reabsorción tubular por su liposolubilidad a pH urinario. Se reporta que su velocidad de eliminación es de 444 ml/minuto empleando un mecanismo de excreción tubular.⁽²⁰⁾

11.2.6.- TOXICIDAD

Como resultado de su amplio uso y fácil adquisición en el mercado, los salicilatos son la causa frecuente de intoxicación, a menudo se produce en niños y a veces suele ser fatal.

La intoxicación por salicilatos se debe a la medicación con dosis excesivas. Esta intoxicación puede ser leve o severa, a la intoxicación leve también se le conoce como salicilismo que se caracteriza por zumbidos de oídos, vértigo, cefalea, mareos, sudoración, somnolencia, hiperventilación, vómitos, náuseas, disminución visual y confusión mental. La intoxicación leve se observa con dosis terapéuticas altas utilizadas en el tratamiento de la fiebre reumática.^(6, 12)

El salicilismo severo se presenta a dosis por arriba de la terapéutica, los síntomas y signos que se presentan son los mismos que en el salicilismo leve, pero además se presenta alteraciones graves en el equilibrio ácido-base, y en la composición electrolítica del plasma, seguido de convulsiones, delirios, estado de coma y paro respiratorio. La dosis mortal de salicilatos está entre 20-30 g ingeridos en una sola toma.^(12, 21)

11.2.7.- REACCIONES ADVERSAS

Los efectos o reacciones adversas de los salicilatos se manifiestan a diferentes niveles de los sistemas orgánicos:

Gastrointestinal: En las dosis usuales el principal efecto adverso es la irritación gastrointestinal causando, náuseas, vómito, malestares hipogástricos, empeoran la úlcera péptica, la dispepsia, hemorragia gástrica y gastritis erosiva.⁽²¹⁾

En 1984 Dearden y Nicholson efectuaron un estudio para determinar la correlación que existe entre la actividad antiinflamatoria de drogas no esteroides y la irritación gástrica que producen, el estudio se realizó en ratas Wistar de 250 g con 25 diferentes fármacos administrados oralmente.

El daño fue evaluado conforme a la gravedad que causa al epitelio de la mucosa gástrica que iba desde el enrojecimiento del tejido hasta zonas de sangrado profundo. De acuerdo con esto, concluyeron que al aumentar la potencia antiinflamatoria del fármaco también aumenta el daño a la mucosa gastrointestinal.⁽²²⁾

Junzo Nakamura en 1991, hizo un estudio comparativo para evaluar el daño que causa el ácido salicílico y el ácido salicílico en la mucosa gastrointestinal de conejos. El experimento consistió en una administración oral de Asu y As a conejos diferentes, a las 6 y 24 horas después de la administración se sacrificaron y se evaluó los cambios morfológicos que sufrió la mucosa gastrointestinal con la ayuda del microscopio de barrido electrónico. Encontraron que el Asu a las 24 horas no produce cambios significativos en la morfología de la mucosa gastrointestinal, a diferencia del As que produce lesiones en el epitelio del duodeno, yeyuno e ileon a las 6 horas pero que éstas no son significativas hasta las 24 horas; concluyendo que el uso de profármacos como el Asu pueden ser útil para reducir el daño a la mucosa gastrointestinal.⁽²³⁾

Sangre: La ingestión de aspirina en individuos normales produce un aumento en el tiempo de sangrado, en tratamientos prolongados se presenta pérdida de sangre en heces fecales (melena) aproximadamente de 5 ml/día causando con el tiempo anemia ferropénica.⁽²⁾

Hipersensibilidad: La hipersensibilidad también es una causa de respuesta indeseable al salicilato, que causa urticaria, broncoconstricción y a veces shock anafiláctico; aproximadamente el 15% de los pacientes que toman aspirina sufren reacciones de hipersensibilidad.⁽²¹⁾

Aparato respiratorio: A dosis altas causa depresión respiratoria.⁽²¹⁾

Sistema hepático: Los salicilatos pueden producir por lo menos dos formas de lesión hepática, por lo que se restringe su uso en pacientes con hepatopatía crónica.⁽⁶⁾

Efectos metabólicos: Las dosis grandes de salicilato pueden causar hiperglucemia, glucosúria y agotar el glucógeno muscular y hepático.⁽²¹⁾

II.2.8.- CONTRAINDICACIONES

Hay algunos padecimientos que potencializan o hacen más susceptibles a los individuos a sufrir una intoxicación con salicilatos como:

Varicela: A niños o adolescentes con enfermedades virales como varicela e influenza tienen un alto riesgo de contraer el síndrome de Reye.⁽⁶⁾

Hepatopatías: Pacientes que sufren de hipoprotrombinemia, deficiencia de vitamina K y hemofilia, deben evitar la ingestión de aspirina porque se puede producir hemorragias.⁽²¹⁾

Aunque no está comprobado que la aspirina causa daños en la etapa de desarrollo embrionario, se ha visto que los niños recién nacidos que nacen de mujeres que han tomado por tiempo prolongado salicilatos tienen un parto complicado además de tener un bebé de bajo peso.^(6, 17, 21)

II.2.9.- FORMAS FARMACEUTICAS Y VIAS DE ADMINISTRACION

El ácido acetilsalicílico se presenta en formas farmacéuticas sólidas y líquidas. En presentaciones sólidas se tiene sólo o combinado con otros principios activos en forma de tabletas solubles, comprimidos, grageas, cápsulas, y en presentación líquida rara vez se tiene debido a su pronta hidrólisis con la humedad.

El ácido salicílico se encuentra principalmente en soluciones antisépticas, pomadas y cremas, todas ellas de aplicación local.

Por lo cual las vías de administración de los salicilatos puede ser oral, parenteral, rectal y tópica, por cualquier vía que se administren son bien absorbidos. La absorción de aspirina a partir de supositorios rectales puede ser incompleta e insegura por lo cual no se emplea cuando se quiere elevadas concentraciones plasmáticas.^(2, 6)

La absorción por administración parenteral es instantánea sólo que esta vía es raramente empleada y casi siempre se inyecta en articulaciones artríticas, aunque no se ha demostrado ventaja alguna utilizando esta forma de administración.⁽²⁾

Por administración local, la absorción de sales libres y ésteres de salicilato ocurre muy rápido, por ejemplo el salicilato de metilo que se aplica a la piel por frotación se absorbe tan rápido que es hallado en orina después de 15 minutos de su aplicación.⁽²⁾

II.3.0.- METODOS DE VALORACION EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

Varios métodos han sido reportados para determinar ácido acetilsalicílico y ácido salicílico en fluidos biológicos principalmente en plasma y orina, las técnicas empleadas son la colorimetría y espectrofotometría, que son técnicas no cromatográficas y que generalmente carecen de especificidad y sensibilidad además que la determinación de AAS es indirecta después de realizada una hidrólisis. Hay otras técnicas que son más específicas y sensibles para hacer estos estudios como son las técnicas cromatográficas, principalmente la cromatografía líquida de alta resolución y la cromatografía líquido-gas.

Los artículos que hacen referencia a la determinación de ácido acetilsalicílico y sus productos de biotransformación en fluidos biológicos son pocos por colorimetría y unos más por cromatografía líquida en columna empleando diferentes detectores como ultravioleta (UV) y fluorescencia.

II.3.1.- Métodos colorimétricos

La desventaja principal de los métodos colorimétricos es su baja especificidad y sensibilidad que tiene para los salicilatos.

Unos de los métodos para cuantificar al salicilato es el colorimétrico con reactivo de trinder en el cual utilizan el cloruro férrico para desarrollar el color y, el ácido clorhídrico como agente acidificante. Otro método colorimétrico es el Dupont que es parecido al anterior, sólo que en éste, se emplea ácido nítrico antes del cloruro férrico.^(25, 26)

II.3.2.- Cromatografía líquida-gas (CLG)

Son pocos los artículos que hacen referencia para determinar AAS y sus productos de biotransformación por CLG. Estos métodos son específicos y sensibles, permitiendo el análisis simultáneo de todos los productos de biotransformación sin conversión de AAS a As, sin embargo presentan una desventaja, que necesitan derivatizaciones químicas tal como la silanización para que sean detectados adecuadamente. Las derivatizaciones que se requieren llevan mucho tiempo, cerca de 60 minutos, y suelen complicarse por la hidrólisis parcial que sufre el AAS durante ésta, además de la múltiple formación de subproductos de tipo éster y éter.^(9, 27)

Morris H. Clarence y Colab.⁽²⁸⁾ proponen un método por cromatografía gas-líquido para determinar As y AAS en plasma. Ellos utilizan el fluoruro de potasio y enfriamiento para disminuir la hidrólisis del ácido acetilsalicílico usando al bisulfito de potasio al 10 % como agente acidificante y el cloroformo como agente extractor, reportan que se puede emplear al propilparabeno como estándar interno. El detector empleado fue el de ionización de flama y una columna de vidrio de empaque OV-25 al 3% (68-80 mallas) Chromosorb G, donde la temperatura de operación del inyector es de 240 °C usando al helio como gas acarreador. Se puede aumentar la sensibilidad y especificidad del método al usar un detector de conductividad térmica.

Seeger⁽²⁹⁾ describe un método para cuantificar As y AAS en plasma, empleando un detector de ionización de flama, una columna de vidrio con empaque de OV-17 al 3% (80-100 mallas), con programación de temperatura de 105 °C a 195 °C, donde el gas acarreador empleado es el argón.

II.3.3.- Cromatografía líquida en columna.

La Cromatografía líquida de alta resolución presenta las ventajas requeridas para realizar un estudio de farmacocinética ya que ofrece especificidad y sensibilidad para separar varios analitos en una sola corrida cromatográfica.

Casi todos los métodos analíticos reportados emplean una fase móvil terciaria con acetonitrilo, soluciones amortiguadoras, metanol y agua a flujos altos, con respecto a la técnica de extracción algunos de ellos emplean gran volumen de solvente orgánico para la extracción lo que dificulta el proceso de evaporación dando como resultado que la técnica sea de costo elevado y tiempo de análisis largo.

Harrison y Funk.⁽¹⁰⁾ en 1980 desarrollaron un método para cuantificar ácido acetilsalicílico y ácido salicílico en plasma y orina humana. Utilizan una columna de fase reversa de 300 X 4 mm empleando como fase móvil metanol, ácido acético glacial al 1.0 % (60:40 v/v) a flujo de 2 ml/min utilizando un detector UV a λ de 310 y 280 nm. Emplean 2 ml de orina, 0.9 ml de HCl 0.27 N, 100 μ l de estándar interno y 10 ml de hexano, se agita durante 10 min y se centrifuga a 750 rpm por 5 minutos, se evapora la fase orgánica a sequedad y se resuspende en metanol para inyectar 25 μ l al cromatógrafo.

En 1981 Rumble y Roberts ⁽⁹⁾ propusieron un método analítico para determinar aspirina y sus principales productos de biotransformación en plasma y orina sin realizar extracción. Usando una columna en fase reversa C₁₈ de 300 X 39 mm usando como fase móvil acetonitrilo, ácido fosfórico (70:30) pH 2.5 a flujo de 1 ml/min a 313 nm. El método propuesto es complicado por el tiempo de hidrólisis de los conjugados glucurónidos. Toman 2 ml de orina en un frasco ampula con 2 ml de HCl 10N sellándolo al vacío. Posteriormente lo esterilizan a 120°C durante 3 horas en una autoclave, enfrían y diluyen a 20 µl con agua y acetonitrilo, centrifugan a 1500 rpm durante 5 minutos e inyectan finalmente 20 µl del sobrenadante.

N. Buskin y Roberts ⁽³⁰⁾, en 1982 optimizaron un método para cuantificar, salicilato y ácido salicílico en plasma con una modificación para orina empleando una columna de ODS de 250 X 4.6 mm con fase móvil de agua, buffer de fosfatos pH 2.5, acetonitrilo (30:50:20 v/v) a flujo de 1.0 ml/min, usando como estándar interno al m-hidroxibenzoico y empleando un detector UV a una λ de 303 nm.

El análisis lo realizaron con 1 ml de orina, 1 ml de ácido oxálico 1M y 1 ml de estándar interno, la extracción la hacen con una mezcla de acetato de etilo-hexano en proporción de (1:4 v/v) también cuantifican los conjugados glucurónidos del ácido salicílico con una hidrólisis térmica a 120 °C durante una hora.

Mays y Sharp en 1984 ⁽²⁴⁾, desarrollaron un método semiautomático para determinar en plasma y orina ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico y conjugados glucurónidos en conejos y humanos. El método se ha aplicado a estudios de farmacocinética y biodisponibilidad tanto en animales como en humanos. Las condiciones cromatográficas empleadas fueron una columna de C₁₈ de 250 X 46 mm, una fase móvil de buffer de fosfatos pH 2.5, metanol, acetonitrilo (68:16:16) a flujo de 1.5 ml/min, a una λ de 237 nm.

La técnica que ellos emplearon es laboriosa por el tiempo de incubación con la enzima β-glucuronidasa durante 20 horas además de las múltiples alícuotas que se toman durante el procedimiento y por último el gran volumen de diclorometano (12 ml) que se usa para la extracción, esto hace que el tiempo de análisis sea largo.

James.O Kruk y Michael en 1984,⁽⁶⁾ reportaron un método al cual sólo le hicieron mejoras a la técnica original de Rumble.⁽⁹⁾ Mejoraron la separación de los productos de biotransformación del AAS y acortaron el tiempo de retención de los mismos teniendo un tiempo de análisis de 10 min. Posteriormente prueban el método en ratas y humanos, las condiciones que emplearon fueron una columna de fase inversa C₈ de 250 X 4.6 mm usando como fase móvil metanol y buffer de fosfatos pH 3.9 (35:65 v/v) a flujo de 2ml/min a 313 nm.

En 1991 Shen Jinglian ⁽⁷⁾, reportaron un método para determinar simultáneamente todos los productos de biotransformación de aspirina en orina y plasma; realizaron 2 hidrólisis una alcalina con NaOH 0.1 M y otra enzimática empleando la β -glucuronidasa. La separación la llevaron a cabo en una columna de fase inversa fenólica de 300 X 4.6 mm usando una fase móvil de metanol, acetonitrilo, trietilamina y buffer de fosfatos pH 2.8 (18:110:1:87 v/v) a flujo de 1 ml/min, empleando un detector UV a 237 nm. El tratamiento para la hidrólisis de los glucurónidos es de 2 horas a 37 °C evitando así la extracción con solventes orgánicos.

Winthrop large y col, ⁽³¹⁾ realizaron un método para cuantificar AAS y As en plasma utilizando diclorometano y HCl 6N para la extracción, trabajando con un detector de fluorescencia a una longitud de onda de 318-327 nm de excitación y de 350-488 nm de emisión.

Saul L y Kander ⁽³²⁾, desarrollaron un método por CLAR acoplado a un detector de fluorescencia para cuantificar AAS utilizando al nitrato de amonio como agente extractor y como limpiador de orina de sus endógenos; la determinación la hacen a una longitud de onda de 323 nm de excitación y 455 nm de emisión.

Se reportó un estudio, ⁽³³⁾ donde calcularon factores de capacidad de varios metabolitos fenólicos y alcohólicos en orina empleando un detector de fluorescencia con longitud de onda de excitación a 295 nm y 320 nm de emisión. Reportan como se afecta el factor de capacidad del ácido salicílico y ácido gálico al variar la composición del metanol en la fase móvil formada por metanol, ácido acético glacial 0.17M (25:75 v/v) en una columna C₁₈ a flujo de 1.0 ml/min.

II.4.0.- GENERALIDADES DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

La cromatografía es una técnica que permite separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla de compuestos. La separación se basa en la distribución del soluto entre dos fases una estacionaria y otra móvil, de tal manera que cada uno de los componentes de la mezcla migra a diferentes velocidades por la fase estacionaria.⁽³⁴⁾

Con esta técnica se obtienen separaciones en término de minutos e inclusive en algunos casos en segundos, con buena resolución y sensibilidad. La cromatografía es una técnica de análisis muy versátil que permite el análisis de compuestos de origen orgánico, inorgánico, iónico, covalente, así como de compuestos de alto peso molecular. La importancia de esta técnica es debida al variado campo de aplicación que tiene en distintas áreas industriales como la farmacéutica, alimenticia, petroquímica y clínica.⁽³⁵⁾

Los principales componentes que integran a un sistema cromatográfico son: bomba, inyector, columna, detector, registrador.

Sin embargo hay otros componentes que son opcionales como el sistema de gradiente, regulador de temperatura, automuestreador, etc. Un cromatógrafo de líquidos puede ser adquirido como un sistema integrado o como ensambles de módulos individuales.

Los sistemas modulares son generalmente más convenientes porque las unidades individuales pueden ser intercambiadas entre cromatógrafos y nuevos módulos pueden ser agregados al equipo. Mientras que los equipos integrados no presentan estas alternativas.

Generalmente los equipos de CLAR son costosos, por lo que se necesita de personal capacitado en el uso y manejo del cromatógrafo para tener un máximo aprovechamiento de este.

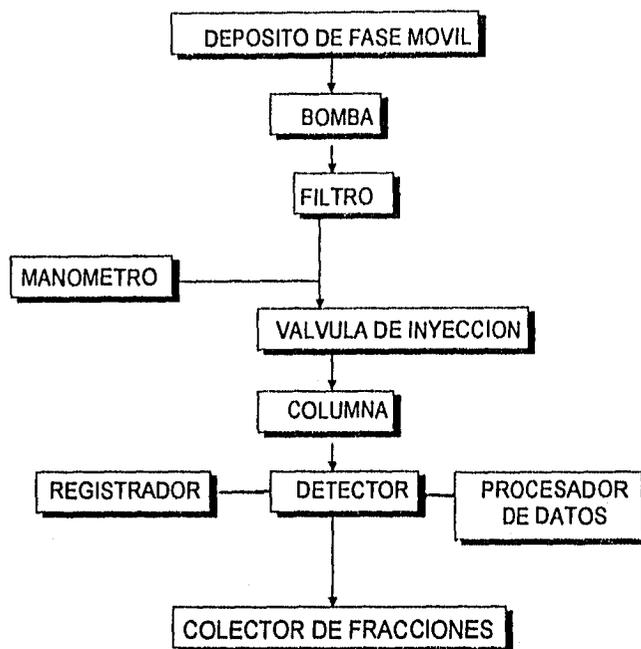


Fig.2. Módulos que conforman a un cromatógrafo de líquidos.

II.4.1.- Fase móvil.

La fase móvil es un factor importante en el análisis cromatográfico por lo que es necesario que tenga ciertas características como:

- Debe disolver la muestra.
- No degradar o disolver la fase estacionaria.
- Ser de baja baja viscosidad.
- Ser compatible con el tipo de detector utilizado.
- Ser de polaridad media.
- Los disolventes deben ser de alta pureza (grado cromatográfico)

Los recipientes en los cuales se puede almacenar la fase móvil deben ser de vidrio, acero inoxidable, o de plásticos inertes, para evitar que se altere la composición de la fase móvil por las posibles interacciones fase móvil-recipiente. La fase móvil debe ser filtrada y desgasificada antes de usarse para no introducir burbujas de aire en el sistema cromatográfico.⁽³⁴⁾

II.4.2.- Sistema de bombeo

La función de las bombas dentro del equipo de cromatografía es permitir que la fase móvil pueda fluir a través de la columna empacada. Las características más importantes que debe tener un sistema de bombeo son:

- Reproducibilidad de flujo.
- Permita trabajar a diferentes velocidades de flujo.
- Presión media adecuada.
- Deben ser resistentes a los solventes orgánicos y sales.

II.4.3.- Inyector.

Existen dos métodos principales para introducir la muestra en una columna cromatográfica, estos son a través de una válvula de inyección o por métodos de detención de flujo. Los métodos de detención de flujo requieren que el flujo de la fase móvil sea detenido o desviado mientras se introduce la muestra a la columna, después se reestablece el flujo y el proceso de separación comienza.⁽³⁶⁾

El método más empleado para introducir la muestra a la columna cromatográfica es a través de válvulas de inyección. En forma general, la válvula de inyección se coloca en posición de carga, en esta posición se introduce la muestra en la válvula mediante una jeringa llenando así una gaza (conocido en Inglés como loop). Cuando la válvula con la muestra se cambia a la posición de inyección, la fase móvil que había dejado de fluir en la válvula vuelve a fluir arrastrando así la muestra a la entrada de la columna, dando comienzo al proceso de separación. De modo que el flujo de la fase móvil hacia la columna sólo se interrumpe momentáneamente por el cambio de posición de la válvula.⁽³⁶⁾

La gaza es un tubo capilar externo de volumen conocido, generalmente estos volúmenes son pequeños del orden de microlitros (μl). La gaza se puede llenar en forma parcial o total, la inyección con gaza llena permite tener una muy buena reproducibilidad del volumen inyectado y el uso de un estándar interno se hace no necesario; mientras que con gaza parcialmente llena permite variar los volúmenes inyectados pero la reproducibilidad de la inyección dependerá entonces, del estado de la válvula, jeringa y de la experiencia del analista para inyectar.⁽³⁷⁾

En la actualidad se tienen equipos que están conectados a un sistema computarizado que permiten programar varias funciones para que se realicen en forma automática como el llenado de la válvula y la inyección de la muestra. Además de controlar funciones tales como, tiempos de inyección, tiempo de corrida, velocidad de llenado, número de inyecciones por muestra, volumen de inyección, identificación de muestras, inicio de inyección, programas de lavado así como programas de gradientes.

Las válvulas de inyección se fabrican de materiales inertes como teflón y acero inoxidable y su diseño es tal que resisten presiones muy elevadas.⁽³⁴⁾

II.4.4.- Columna cromatográfica.

La columna cromatográfica es un tubo cilíndrico de material inerte, de diámetro uniforme, paredes internas pulidas, resistente a soportar altas presiones y empacadas con fase estacionaria. El material del tubo más usado para columnas es el acero inoxidable. En algunos casos también se ha empleado vidrio de paredes gruesas, pero tienen el inconveniente de no permitir conexiones metal-vidrio herméticas a altas presiones.⁽³⁴⁾

Las dimensiones de la columna varían siendo las más comunes de 300 X 5 mm, pero que en columnas de tipo preparativo pueden ser hasta más de 1 cm. La capacidad de una columna cromatográfica depende de su longitud, diámetro y material de relleno, en general las columnas muy eficientes son de diámetro muy pequeño (3mm) y efectúan análisis muy rápidos.⁽³⁴⁾

Respecto a la forma de la columna, se prefiere las columnas rectas, aun que también hay columnas enrolladas o de forma de "V", "L", "S", u "8" estas últimas facilitan el control de la temperatura, pero su eficiencia es menor.⁽³⁴⁾ La columna es el corazón del sistema cromatográfico por lo que hay que tener algunas precauciones para conservarla en buen estado.

- Evitar partículas en suspensión.
- Evitar muestras con impurezas que se absorban irreversiblemente.
- Trabajar fases móviles en el intervalo de pH de 2-8 cuando la fase estacionaria tiene una matriz de C_{18} .

11.4.5.- Fases estacionarias.

Las fases estacionarias son materiales adsorbentes que se encuentran disponibles comercialmente. Estos pueden ser porosos o peliculares, esféricos o irregulares.

Los adsorbentes porosos fueron los primeros materiales que se utilizaron en cromatografía líquida, su tamaño de partícula generalmente es grande (40μ) y de cuerpo totalmente poroso. La forma de las partículas del material adsorbente puede ser de forma regular (esférica) o irregular.

Las partículas de forma esférica presentan una gran superficie específica de $50 - 500 \text{ m}^2/\text{g}$ por lo cual no se saturan con cargas de muestra grande (g de muestra/ g de relleno) sin perder mucha eficiencia.

Los adsorbentes peliculares son partículas que consisten de una esfera generalmente vítrea, recubierta por una capa muy fina de algún adsorbente poroso, como gel de sílice o alúmina. Los materiales peliculares tienen una superficie específica de $1-12 \text{ m}^2/\text{g}$, aceptando menor cantidad de muestra que los adsorbentes totalmente porosos. También el costo de estos materiales peliculares es mayor.⁽³⁸⁾

11.4.6.0- Detectores.

La función de un detector en cromatografía líquida es el de monitorear la composición del líquido que eluye de la columna cromatográfica y emitir una señal electrónica que hace posible hacer un registro de como la composición varía con el tiempo.

Existen varios tipos de detectores, los cuales tienen diferentes aplicaciones de acuerdo al tipo de moléculas que se desea detectar; para hacer una buena selección es necesario saber en términos generales como funcionan. Hay algunos términos que son importantes para describir y comparar a los detectores:

Ruido: El ruido se refiere a la inestabilidad de la línea base y normalmente se mide en desviaciones porcentuales de una escala establecida, el ruido también se puede medir en unidades absolutas considerando las oscilaciones del registro de un pico a otro. Las causas que pueden ocasionar ruido son múltiples, como impurezas en la fase móvil, solventes inmiscibles o fallas electrónicas, entre otras.^(35, 37)

Deriva: Se puede describir como el movimiento lento hacia arriba o hacia abajo de la línea base en un período de tiempo considerable o como la variación continua de una señal a largo plazo. Estos cambios de la línea base normalmente se miden en unidades de cambio por hora y generalmente se asocian con cambios en la temperatura, o de fase móvil.⁽³⁵⁾

Límite de sensibilidad: Es la relación señal-ruido de 2:1, es decir, el pico del componentes de interés debe ser, como mínimo 2 veces más alto que el ruido promedio. Generalmente se expresa en la unidad del fenómeno físico observado por el detector.⁽³⁷⁾

Límite de detección: Es la cantidad mínima de soluto que puede ser detectado por el detector. El límite de detección es diferente para cada sustancia, mientras que el límite de sensibilidad es único por ser un valor de señal.⁽³⁵⁾

Intervalo de linealidad: Es el intervalo de concentraciones en el cual la respuesta es proporcional a la cantidad inyectada, el intervalo de linealidad depende en general del soluto pero también del sistema electrónico de amplificación de la señal que tiene su propia linealidad.⁽³⁷⁾

Se tienen detectores para CLAR basados en varios principios de operación, sin embargo sólo algunos son los suficientemente versátiles para ser usados en cromatografía.

- Detector espectrofotométrico (UV/VIS).
- Detector de índice de refracción.
- Detector de fluorescencia.
- Detector electroquímico.
- Detector de conductividad.
- Detector de radioactividad.

II.4.6.1.- Detectores de absorción (UV/VIS).

Son los detectores más utilizados y representan aproximadamente el 80 % de los detectores de CLAR. El principio de la detección se basa en la absorción de luz por el soluto. La relación de respuesta-concentración está dado por la ley de Lambert- Beer.^(35, 37)

$A=ELC$

donde:

A=Absorbancia.

E=Coefficiente de extinción molar del soluto.

C=Concentración del soluto en la celda.

L= Paso de la luz a la celda.

El detector UV/VIS responde a sustancias que absorben luz visible o ultravioleta. Una gran cantidad de sustancias caen en esta categoría, como, sustancias que tienen electrones sin compartir (olefinas), compuestos aromáticos y compuestos que tienen enlaces del tipo π .

II.4. 6.2.- Detector de Índice de refracción.

El detector de índice de refracción conocido también como refractómetro diferencial es un detector universal, que se basa en el hecho de que todas las sustancias tienen un índice de refracción bien definido. Este detector mide las diferencias en el índice de refracción, de la fase móvil pura y del soluto que eluye de la columna. El detector de Índice de refracción es poco popular en cromatografía líquida porque:

- a) Tiene menor sensibilidad que los detectores de fluorescencia o ultravioleta .
- b) Es sensible a variaciones de temperatura y presión.
- c) El detector es muy frágil y tiene tendencia a romperse.
- d) No puede usarse para gradientes.

II.4.6.3.- Detector de fluorescencia.

Utiliza las propiedades de fluorescencia de ciertas moléculas, es un detector muy sensible que permite detectar hasta picogramos de soluto, es altamente específico, puede utilizarse con gradientes, además de ser poco sensible a las variaciones de flujo y de temperatura.⁽³⁵⁾

Lo que limita el uso de este detector, es que sólo el 20 % de las moléculas presentan fluorescencia natural, sin embargo, muchas sustancias pueden ser convertidas a derivados fluorescentes usando reactivos de derivatización. Las ventajas que presenta el detector de fluorescencia son la sensibilidad y especificidad, por lo que es un detector adecuado cuando se quiere el análisis de sustancias que existen a nivel de trazas.⁽³⁷⁾

II.4.6.4.- Detector electroquímico.

En general es de tipo amperométrico, son detectores muy sensibles y que muestran un alto grado de especificidad, sin embargo su uso está limitado a activos que tengan propiedades oxido-reductoras fuertes.⁽³⁹⁾

II.4.6.5.-Detector conductimétrico.

Detector en principio universal pero de hecho utilizado únicamente para el análisis de aniones y cationes en sistemas acuosos.⁽³⁷⁾

II.4.6.6.- Detector de radioactividad.

Este tipo de detector es poco común ya que requiere de un equipo muy especializado, pero de uso relativamente importante en estudios biológicos y en farmacocinética.⁽³⁷⁾

II.4.7.0.- Integradores.

Hay varias técnicas manuales o instrumentales que se usan para integrar el área de picos, como triangulación, cortar y pesar, planímetro, etc. pero actualmente la mayoría de los integradores son electrónicos lo cual permite que la señal que recibe el registrador sea transformada directamente en unidades relacionadas al área y/o alturas de los picos, que son proporcionales a la concentración.

II.4.8.0.- Análisis cuantitativo para cromatografía líquida.

Después de la identificación de los componentes de una muestra, la siguiente etapa es determinar la cantidad presente de cada componente a esto se le llama análisis cuantitativo. En la actualidad el análisis cuantitativo por medio de CLAR es tan confiable como el realizado por cromatografía de gases.⁽³⁴⁾

Una vez conocida el área o altura del pico cromatográfico se toman éstas como base para efectuar el cálculo de la concentración del soluto en la muestra. Existen algunos métodos de calibración como:

Análisis por calibración interna (estándar interno).
Análisis por calibración externa (estándar externo).
Métodos de adiciones patrón.

A continuación sólo se describe el método de estándar interno, porque es el método que se emplea para evaluar las concentraciones de los analitos en el presente trabajo.

II.4.8.1.- Estándar interno.

La técnica consiste en comparar el área o altura del compuesto problema y el del estándar interno. El resultado de esta relación es la que se emplea para realizar la estimación de concentración.

La sustancia utilizada como patrón interno debe tener ciertas características como: ser similar al compuesto problema, estar presente en concentraciones parecidas, tener un tiempo de retención cercano al del compuesto problema pero sin interferir con él, ser inerte y no formar parte de la muestra.⁽³⁷⁾

Las ventajas que presenta el uso del estándar interno son porque tanto el analito como el estándar interno se analizan en las mismas condiciones de análisis. Las ventajas del estándar interno son:

No se requiere inyectar muestras con mucha precisión.
Compensa errores por manejo de la técnica.
Compensa errores debido a variaciones instrumentales.

II.5.0.- PROPIEDADES PARTICULARES DE LA ORINA

La orina a diferencia del plasma está libre de proteínas y lípidos, sin embargo presenta una mayor variación en su composición y esto se puede observar en el color ámbar oscuro de la orina colectada en las mañanas y en el color amarillo pálido cuando se colecta durante el día. La composición de la orina depende en gran parte de la dieta así como del estado de salud del individuo.

En la recolección de la muestra, es importante medir el volumen total de orina recolectada, así como evitar perder volumen de esta. En los métodos de excreción urinaria lo que interesa es la cantidad excretada, si el volumen de orina excretado es muy grande la concentración del fármaco en ésta será muy pequeña y por lo tanto el análisis estará sujeto a errores asociados con bajas concentraciones y la pérdida de volumen sería una fuente importante en la variación de la cantidad de fármaco.⁽⁴¹⁾

La orina está sujeta a cambios de pH en un amplio intervalo, que dependen en su mayor parte de la dieta y de los medicamentos ingeridos. El pH normal se encuentra entre 5.5 - 7.0 y cualquier alteración en el pH de la orina afecta la excreción de los fármacos. Los fármacos básicos se excretan más fácilmente en orina ácida, mientras que los fármacos ácidos se excretan mejor en orina alcalina.⁽⁴¹⁾

También se tiene que la composición de la orina cambia con el tiempo de almacenamiento ya que el CO₂ se va perdiendo, causando que la orina se vuelva más alcalina y cause la precipitación de fosfatos inorgánicos.⁽⁴¹⁾

II.6.0.- VALIDACIÓN DE METODOS ANALITICOS

En los últimos años la validación de métodos analíticos ha adquirido gran importancia en todas aquellas industrias que han querido implantar un sistema de calidad y en los laboratorios donde se hacen determinaciones de cualquier analito sea en una forma farmacéutica, fluido biológico u cualquier otro material.

Para estudios de cualquier tipo es necesario tener métodos analíticos validados, porque nos permite obtener resultados confiables y reproducibles, para tener conclusiones correctas. Mayor importancia toma la validación de un método analítico que va a ser aplicado a un fluido biológico porque las variables que intervienen son más difíciles de controlar.⁽⁴⁰⁾

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual se establece mediante estudios de laboratorio, que las características de capacidad del método cumple con los requerimientos para las aplicaciones analíticas deseadas.⁽³⁹⁾

Los criterios a cumplir en la validación de un método son establecidos por organismos nacionales e internacionales. Estos organismos publican una serie de guías de carácter no obligatorio, para que los laboratorios las tomen en cuenta durante la validación de sus métodos analíticos de acuerdo a sus necesidades.⁽³⁰⁾

La validación de un método analítico comprende una serie de pruebas sistemáticas, que permite evaluar la confiabilidad que tiene el método al efectuar una medición. La correcta validación de un método, permite conocer la magnitud del error que se tiene al trabajar así como una mejor estimación de las mediciones. La metodología que de el menor error en las mediciones será la más viable a aplicarse.

Los parámetros a determinar en la validación de un método analítico son: especificidad, linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, y estabilidad.

II.6.1.- Linealidad.

La linealidad de un sistema o método analítico, es su capacidad para asegurar que los resultados analíticos obtenidos directamente, o bien mediante una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia de interés dentro de un intervalo.

Generalmente se determina, construyendo una curva de calibración utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución estándar y haciendo el análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

Para evaluar este parámetro se considera el coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2), pendiente (m), ordenada al origen (b) y el coeficiente de variación global (CV).

La linealidad del método se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos tres diferentes cantidades de la sustancia de interés, (placebos cargados), cada uno de manera independiente haciendo los análisis por triplicado, el análisis se realiza bajo las mismas condiciones de operación. Los criterios para evaluar este parámetro son los mismos que para la linealidad del sistema.

II.6.2.- Precisión del sistema (repetibilidad).

Es el grado de concordancia de los resultados analíticos obtenidos dentro de una serie de mediciones efectuadas en una misma muestra homogénea bajo las mismas condiciones de operación (analista, día, laboratorio, etc.) generalmente se expresa en término de coeficiente de variación.

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente a la concentración del 100 % establecido en la linealidad del sistema.

II.6.3.- Exactitud del método.

Es la concordancia que existe entre un valor obtenido experimentalmente y el valor considerado como verdadero. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido al analizar muestras a las que se les adiciono cantidades conocidas del analito.

Se determina analizando por lo menos 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria del analito para obtener la concentración considerada como del 100 %, efectuando el análisis bajo las mismas condiciones de operación.

Para evaluar la exactitud se determina el coeficiente de variación (CV) y se realiza una prueba t de students, usando una $\alpha = 0.05$.

II.6.4.- Reproducibilidad del método.

Es la concordancia entre los resultados individuales obtenidos con el mismo método y material de prueba, bajo diferentes condiciones de operación (analista, día, equipo, reactivos, etc.). Se evalúa a través de un análisis de variancia de dos factores.

Se determina de una muestra homogénea del producto carcana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

II.6.5.- Especificidad.

Es la capacidad que tiene el método analítico para que la respuesta obtenida proceda del fármaco de interés y no de otros componentes que estén presentes en la matriz de estudio, como, otros principios activos, excipientes, productos de degradación u cualquier otra sustancia interferente.

La especificidad se realiza de acuerdo a la aplicación que vaya a tener el método analítico por ejemplo, métodos para control de calidad, métodos indicadores de estabilidad, etc.

II.6.6.- Concentración mínima cuantificable.

Es la mínima concentración en la cual el método analítico es lo suficientemente preciso y exacto para dar un estimado satisfactorio de una muestra de concentración desconocida.

II.6.7.- Concentración mínima detectable.

Es la mínima concentración que da una señal detectable sin confundirse con el ruido del sistema.

Para evaluarlo se hacen diluciones seriadas de la sustancia estándar del analito, hasta obtener una respuesta de dos veces por encima del ruido del sistema cromatográfico.

II.6.8.- Estabilidad.

Con este estudio se conoce las condiciones en las cuales, las muestras que se obtienen durante el proceso de análisis, mantienen constante sus propiedades medibles en un tiempo determinado. Esto proporciona una mayor confiabilidad en los resultados, pues permite determinar si la muestra presenta degradación durante el tratamiento, durante el almacenamiento, antes de medir su respuesta para ser cuantificada.

El estudio de estabilidad de muestras se realiza en forma general, analizando soluciones estándares del analito antes de su almacenamiento. Después almacenarlas en diferentes condiciones de temperatura, iluminación, pH, etc., posteriormente se vuelven analizar a diferentes tiempos según se haya establecido en el protocolo de estabilidad.

SECCION
EXPERIMENTAL

III. - PARTE EXPERIMENTAL

III.1.0.- Material.

- Balanza analítica digital Sartorius, Mod 895320.
- Balanza granataria Ohaus, Mod. 21975.
- Baño water-Bath Lab-Line.
- Sonificador Branson, Mod. 5210.
- Centrifuga Clay Adams, Mod. 211466.
- Vortex, marca Lab-Line, Mod. 1290.
- Equipo para filtración de solventes millipore.
- Equipo desionizador de agua millipore.

III.1.1.- Equipo.

El cromatógrafo de líquidos empleado consta de los siguientes módulos:

- Sistema de bombeo programable, Beckman, Mod.116.
- Sistema programable de inyección, Beckman, Mod.507.
- Detector UV de longitud de onda variable, Beckman, Mod.166.
- Integrador de datos System Gold (computadora personal Beckman).
- Impresora Epson, Mod FX-850.

III.1.2.- Reactivos.

- Acido salicílico, Tec.Farmacéutica, lote KR114
- Acido salicílico (ácido O-hidroxihipúrico), marca Sigma, lote 103H744.
- Metil parabenol, lote 19910.
- Ácido clorhídrico concentrado, J.T.Baker, lote 9535-61.
- Metanol R.A, J. T Baker, lote 96-110.
- Acetato de etilo R.A, J.T.Baker, lote M-36448.
- Diclorometano, R.A, Merck, lote 234.
- Acido acético glacial, R.A, J.T.Baker, lote 9601-59.
- Metanol HPLC, J.T.Baker, lote 9093-03.
- Agua grado HPLC (Destilada, desionizada y filtrada 0.22 μ).
- Nitrógeno no cromatográfico, Infra.

III.1.3.- Soluciones.

- Ácido Clorhídrico 0.6 N.
- Mezcla de acetato de etilo-diclorometano (80:20 v/v).
- Solución de metilparabeno de concentración de 200 μ g/ml.
- Solución estándar de ácido salicílico de concentración 2000 μ g/ml en metanol R.A.
- Solución estándar de ácido salicílico de concentración 200 μ g/ml en metanol R.A.
- Solución estándar de ácido salicílico de concentración 4000 μ g/ml en metanol R.A.
- Solución estándar de ácido salicílico de concentración 400 μ g/ml en metanol R.A.
- Solución de ácido salicílico de concentración 2000 μ g/ml en orina libre de fármaco.
- Solución de ácido salicílico de concentración 200 μ g/ml en orina libre de fármaco.
- Solución de ácido salicílico de concentración 4000 μ g/ml en orina libre de fármaco.
- Solución de ácido salicílico de concentración 400 μ g/ml en orina libre de fármaco.

III.1.4.- Preparación de soluciones.

Solución estándar A de Asu y As.

Pesar exactamente 20 mg de ácido salicílico (Asu) y 10 mg de ácido salicílico (As).

Ponerlos en un matraz volumétrico de 5 ml, disolver y llevar a volumen con metanol R.A. Esta es la solución estándar A de concentraciones de 400 μ g/ml de Asu y 200 μ g/ml de As.

Solución estándar B de Asu y As.

La solución estándar B se prepara a partir de la solución estándar A. Tomar 0.5 ml de solución estándar A y llevar a un volumen de 5 ml con metanol R.A, para obtener concentraciones de 400 μ g/ml de Asu y 200 μ g/ml de As.

A partir de las soluciones anteriores A y B se hacen diferentes diluciones para construir las curvas de calibración de Asu y As. Las diluciones para construir la curva de calibración se indican en la tabla I.

Solución estándar de metiparabeno de 2000 $\mu\text{g/ml}$ (estándar interno).

Pesar 20 mg de metilparabeno y llevar a un volumen de 10 ml con metanol R.A. Esta solución tiene una concentración de 2000 $\mu\text{g/ml}$, a partir de la cual se toman diferentes alícuotas para ajustar la concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ de estándar interno en las curvas de calibración de Asu y As en metanol.

La solución de estándar interno que se usa para resuspender las muestras de orina evaporadas es de 200 $\mu\text{g/ml}$ de metilparabeno. Esta solución se prepara al tomar 2.5 ml de la solución de metilparabeno de 2000 $\mu\text{g/ml}$ y llevando a un volumen de 25 ml con metanol. Las soluciones de estándar interno se preparan en el mismo día de trabajo debido a que el metilparabeno se hidroliza rápidamente en metanol.

Solución estándar *EO-1* de Asu y As en orina.

La solución estándar *EO-1* tiene una concentración de 4000 $\mu\text{g/ml}$ de Asu y 2000 $\mu\text{g/ml}$ de As. La solución *EO-1* se tiene al pesar 20 mg de ácido salicílico y 10 mg de ácido salicílico, disolver ambas sustancias con el mínimo volumen de metanol en un mismo matraz de 5 ml, finalmente llevar a volumen con orina libre de fármaco.

Solución estándar *EO-2* de Asu y As en orina.

La solución estándar *EO-2* tiene concentraciones de 400 y 200 $\mu\text{g/ml}$ de Asu y As respectivamente. Esta solución se prepara tomando 0.5 ml de solución *EO-1* y llevar a 5 ml con orina libre de fármaco.

Las soluciones *EO-1* y *EO-2* sirven para preparar las curvas de calibración de Asu y As en orina, a partir de las cuales se toman diferentes diluciones.

III.2.0.- Desarrollo del método.

III.2.1.- Método de extracción.

1.- En un tubo de ensaye colocar 1 ml de orina problema, adicionarle 0.5 ml de HCl 0.6 N y 2.0 ml de una mezcla de acetato de etilo-diclorometano (80:20 v/v) y agitar fuertemente en vortex durante 1 minuto.

2.- Centrifugar durante 10 minutos a 2500 rpm, separar el sobrenadante orgánico y ponerlo en un tubo de ensaye limpio. Desechar la fase acuosa.

3.-El extracto orgánico se evapora a sequedad con una suave corriente de nitrógeno, ayudado de un baño con agua a 35 °C para favorecer la evaporación.

4.- El residuo se resuspende con 1.5 ml de estándar interno (metilparabeno de 200 µg/ml) se agita en vortex durante 30 segundos y se procede a llenar los viales del inyector, finalmente inyectar 25 µl al cromatógrafo. El diagrama de flujo se esquematiza en la fig.3.

Nota: El flujo de la corriente de nitrógeno no debe ser turbulento y la temperatura no mayor a 35 °C, para evitar la formación de un compuesto metil éster de ácido salicílico que se forma de la sublimación del ácido salicílico ⁽⁴²⁾

III.2.2.- Condiciones cromatográficas.

Columna: C₁₈ ODS2, dimensiones 250 × 4.6 mm, tamaño de partícula 5 micras.

Fase móvil: Metanol/Agua/ ácido acético filtrado (55:44:1 v/v)

Flujo: 0.7 ml/ minuto.

Longitud de onda: 290 nm.

Estándar interno (metilparabeno 200 µg/ml)

Para estimar las concentración de Asu y As se usa la relación de áreas (Ra).

$$Ra = \frac{\text{área del analito}}{\text{área del estándar interno}}$$

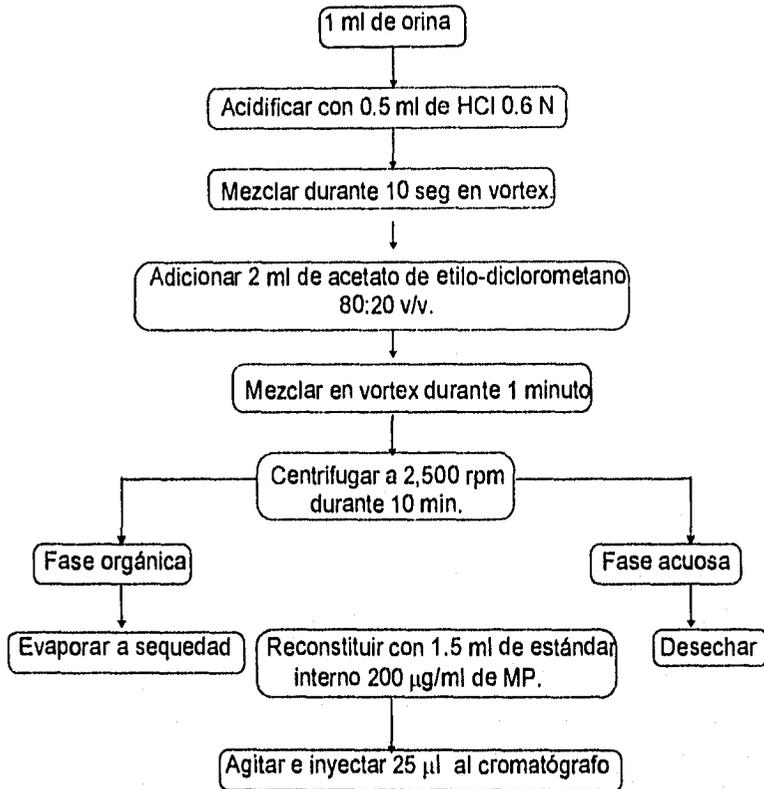


Fig 3. Diagrama de flujo de la extracción de Asu y As en orina.

Tabla I
Diluciones para construir la curva de calibración de Asu y As en metanol

Nivel de concentración de Asu $\mu\text{g/ml}$	Nivel de concentración de As $\mu\text{g/ml}$	Volumen de solución estándar	Estándar interno 2000 $\mu\text{g/ml}$.	Volumen metanol R.A
20	10	0.5 ml de B	1 ml	10 ml
80	40	1 ml de B	0.5 ml	5 ml
200	100	0.5 ml de A	1 ml	10 ml
400	200	0.5 ml de A	0.5 ml	5 ml
800	400	1 ml de A	0.5 ml	5 ml

Tabla II
Diluciones para construir la curva de calibración de Asu y As en orina

Nivel de concentración Asu $\mu\text{g/ml}$	Nivel de concentración As $\mu\text{g/ml}$	Solución estándar Asu/As en orina	Volumen de orina libre de fármaco
20	10	0.5 ml de EO-2	10 ml
80	40	1 ml de EO-2	5 ml
200	100	0.5 ml de EO-1	10 ml
400	200	0.5 ml de EO-1	5 ml
800	400	1 ml de EO-1	5 ml

III.3.0.- Validación del sistema.

III.3.1.- Linealidad.

Se construyen tres curvas de calibración de ácido salicílico y ácido salicílico en metanol R.A en un mismo día, agregando en cada caso el volumen correspondiente de estándar interno para mantener siempre constante la concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ de metilparabeno. Las concentraciones para Asu son 20, 80, 200, 400, 800 $\mu\text{g/ml}$ y de 10, 40, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ para As. En la tabla I se indica las alícuotas y aforos a realizar para tener estos niveles de concentración.

CRITERIO DE ACEPTACION

Si $r > 0.99$, $r^2 > 0.98$ y $C.V < 2\%$, entonces el sistema es lineal en el intervalo de concentraciones manejadas.⁽³⁹⁾

III.3.2.- Precisión.

Se determina al analizar por sextuplicado una solución estándar de 800 $\mu\text{g/ml}$ de ácido salicílico y de 400 $\mu\text{g/ml}$ de ácido salicílico, ajustada con 200 $\mu\text{g/ml}$ de estándar interno.

CRITERIO DE ACEPTACION

El $C.V < 2$ para que el sistema sea preciso.⁽³⁹⁾

III.4.0.- Validación del método analítico.

III.4.1.- Linealidad.

Para determinar la relación que existe entre la cantidad agregada de analitos y la cantidad recobrada después de la extracción en orina, se preparan tres curvas de calibración con 5 puntos de cantidades diferentes de Asu y As. Las cantidades de Asu y As agregadas a orinas limpias son 20, 80, 200, 400 y 800 μg para ácido salicílico y de 10, 40, 100, 200 y 400 μg para ácido salicílico. En la tabla II se muestran las diluciones para tener estas cantidades.

CRITERIO DE ACEPTACION

$r > 0.98$, $r^2 > 0.96$, y $C.V < 10\%$, para que el método se considere lineal.⁽⁴³⁾

III.4.2.- Precisión del método.

Para evaluar la precisión del método analítico bajo las mismas condiciones de operación de día, analista, y equipo. Se determina al analizar por sextuplicado una solución estándar con 800 $\mu\text{g/ml}$ de Asu y 400 $\mu\text{g/ml}$ de As en orina.

CRITERIO DE ACEPTACION

El $C.V < 10\%$ para que el método sea preciso.⁽⁴⁴⁾

III.4.3.- Exactitud.

Este parámetro se evalúa como los porcentajes de recobro de Asu y As en orina. Para determinar el porcentaje de recobro en orina construir cuatro curvas de calibración de Asu y As, una en metanol R.A y tres en orina, realizar el proceso de extracción para las muestras de orina y determinar su relación de áreas las cuales se interpolan en la curva estándar de metanol para conocer la concentración. El porcentaje de recobro de los analitos se calcula:

$$\% \text{ de recobro} = \frac{\text{Cantidad recuperada del analito} \times 100}{\text{Cantidad adicionada del analito}}$$

CRITERIO DE ACEPTACION

Los límites de confianza para la media del porcentaje de recobro debe de incluir el valor de 100 %, el valor de t calculada debe ser menor a la t de tablas y el C.V < 10%.⁽³⁴⁾

III.4.4.- Reproducibilidad.

Para determinar la reproducibilidad del método, analizar por triplicado muestras de orinas cargadas con 800 µg de Asu y 400 µg de As, por dos analistas en dos días diferentes.

CRITERIO DE ACEPTACION

El método es reproducible si no hay diferencias significativas en los porcentajes de recobro obtenidos por analista - analista, y día- día.⁽³⁴⁾ al ser evaluarlos por un ANADEVVA de 2 factores.

III.4.5.- Límite de detección.

Este parámetro se determina preparando soluciones de 10, 8, 4, 2 µg/ml de Asu y de 5, 4, 2, 1 µg/ml de As en orina, se analizan conforme al método de la sección III.2.1. Una vez analizadas determinar la concentración que de la respuesta mínima detectada. Para evaluar la repetibilidad de esta concentración, se preparan y se analizan tres soluciones de Asu/As en un día diferente.

CRITERIO DE ACEPTACION

La altura de la respuesta de la concentración mínima detectada debe ser por lo menos 2 veces más grande que el ruido del sistema cromatográfico.

III.4.6.-Especificidad.

La especificidad se evalúa con un blanco, que consiste de una mezcla de orinas libres de fármaco. Tomar 1 ml de orina blanco la cual se le somete al proceso de extracción, se resuspende con estándar interno y se inyecta para obtener su cromatograma. También se preparan soluciones estándar de ácido salicílico de 800 µg/ml y ácido salicílico de 400 µg/ml en orina, se extraen con el método propuesto y una se resuspende con metanol y otra con estándar interno para obtener sus cromatogramas. Preparar una solución de estándar interno de 200 µg/ml en metanol e inyectar.

CRITERIO DE ACEPTACION

El método es específico para Asu, As, y estándar interno, con respecto a una orina libre de fármaco, si los componentes propios de la orina blanco después de la extracción no interfieren con los tiempos de retención de los analitos a cuantificar.⁽⁴³⁾

III.4.7.- Estabilidad de ácido salicílico y ácido salicílico en orina.

Se determina por el análisis de dos muestras de orinas cargadas con 800 µg/ml de Asu y 400 µg/ml de As, almacenadas durante 1, 2, y 7 días bajo refrigeración (-10 °C). Calcular los porcentajes de recobro de las muestras de orina en base a una curva de calibración de Asu y As en metanol preparada en el mismo día del análisis de las muestras en estabilidad.

CRITERIO DE ACEPTACION

La media del factor (I) de las muestras en estabilidad para cada condición/tiempo se debe encontrar entre los valores de 98-102 %.⁽³⁹⁾

RESULTADOS

Y

ANALISIS DE RESULTADOS

IV.- RESULTADOS

IV.1.- Linealidad del sistema para ácido salicílico.

La tabla III muestra los resultados obtenidos en la prueba de linealidad y en la fig. 4 se tiene la gráfica correspondiente.

Tabla III

Concentración $\mu\text{g/ml}$	Curva 1 Ra	Curva 2 Ra	Curva 3 Ra	Promedio
20	0.2514	0.2582	0.2597	0.2564
80	1.0026	1.0209	1.0130	1.0122
200	2.6232	2.6292	2.6404	2.6309
400	5.3024	5.2728	5.1363	5.2372
800	10.6152	10.5291	10.5504	10.5649

Número de determinaciones = 15

Promedio (Respuesta /concentración) = 0.0130

Desviación estándar = 2.5×10^{-4}

C.V. global = 1.9664 %

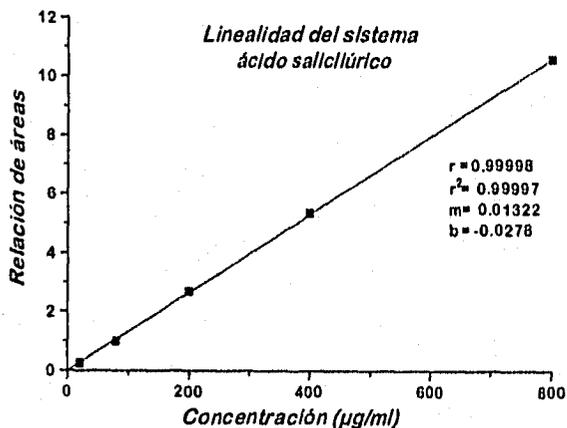


Fig 4 Gráfica promedio de tres curvas de calibración de Asu en metanol.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para demostrar en forma estadística que el sistema de Asu es lineal, se realizó un análisis de variancia, tabla IV. En esta tabla se ve que los valores obtenidos en forma experimental son explicados en su mayor parte por el modelo de regresión lineal $y = b + mx$, y que la falta de ajuste al modelo no es significativa ya que:

$$F_{\text{regresión}} (107688.7) > F_{\text{tablas}} (4.67)$$

$$F_{\text{falta de ajuste}} (0.8401) < F_{\text{tablas}} (3.71)$$

Tabla IV ANADEVIA para la linealidad del sistema en Asu.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F Calculada	F tablas $\alpha=0.05$
Regresión	208.28	1	208.27	107688.7	4.67
Error	0.02514	13	0.001934		
carencia de ajuste	0.00506	3	0.001687	0.8401	3.71
Error puro	0.020081	10	0.0020081		
Total	208.29948	14			

El siguiente cuadro muestran los intervalos de confianza y la prueba t, para la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión.

Pendiente (m)		Ordenada al origen (b)	
m	= 0.0132	b	= -0.0279
t calculada	= 341.4826	t calculada	= 1.7489
t de tablas	= 3.1825	t de tablas	= 3.1825
I.C.	= 0.0131 a 0.0134	I.C.	= -0.078 a 0.022

I.C. = intervalo de confianza con $n-2$ gl, $\alpha=0.05$

El sistema para ácido salicílico resultó ser lineal en el intervalo de 20-800 $\mu\text{g/ml}$, ya que r , r^2 , m , y b , cumplió con los criterios de aceptación.

Coefficiente de correlación (r)

Como $r_{\text{cal}} > 0.99$ se tiene que la relación entre la concentración de ácido salicílico y la relación de áreas es lineal en el intervalo de concentraciones trabajadas, como se ve en la fig.4.

Pendiente (m)

Como $t_{calculada}$ (341.4826) $>$ t_{tablas} (3.1825), se rechaza la hipótesis nula de que la pendiente de la gráfica es cero ($m=0$), lo que indica que la relación entre las variables de concentración y relación de áreas es directamente proporcional.

Ordenada al origen (b)

Como $t_{calculada}$ (1.7489) $<$ t_{tablas} (3.1825), y el valor de cero está incluido en los límites de confianza calculados, no se puede rechazar la hipótesis nula ($b= 0$), por lo que se tiene que el intercepto obtenido en forma experimental no difiere significativamente del valor de cero, por lo cual se considera que la recta de regresión pasa a través del origen.

Todo lo anterior indica que el modelo lineal, es correcto para describir la relación concentración-relación de áreas.

IV.2.- Precisión del sistema para ácido salicílico.

La tabla V muestra los resultados de la precisión del ácido salicílico en metanol.

Tabla V

Concentración $\mu\text{g/ml}$	Relación de áreas
800	10.6152
800	10.5291
800	10.5504
800	10.4911
800	10.5401
800	10.6119

Número de determinaciones = 6

Promedio = 10.5563

Desviación estándar = 0.0487

Coefficiente de variación = 0.4611 %

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Ya que el C.V \leq 2.0 % cumple con el criterio de aceptación para la precisión del sistema.

IV.3.- Linealidad del sistema para ácido salicílico.

La tabla VI muestra los resultados de la prueba de linealidad del As y en la fig.5 se muestra la gráfica correspondiente, observándose la tendencia lineal entre la concentración y la relación de áreas del As.

Tabla VI

Concentración $\mu\text{g/ml}$	Curva 1 Ra	Curva 2 Ra	Curva 3 Ra	Promedio
10	0.1398	0.1421	0.1345	0.1388
40	0.5530	0.5497	0.5363	0.5463
100	1.3912	1.4019	1.4017	1.3983
200	2.8170	2.7808	2.8262	2.8080
400	5.6534	5.6130	5.6823	5.6496

Número de determinaciones = 15

Promedio (Respuesta /concentración) = 0.0139

Desviación estándar = 2.53×10^{-4}

El C.V._{global} = 1.8153 %

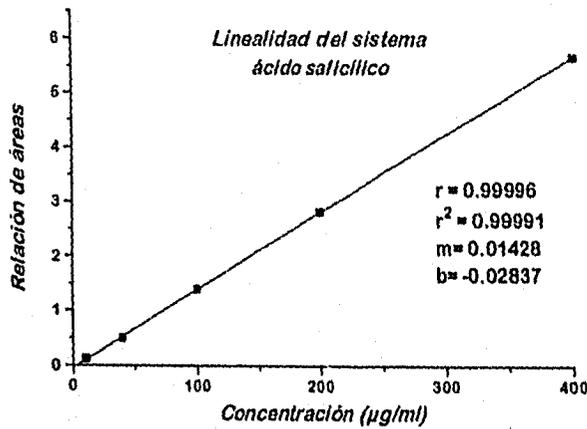


Fig 5. Gráfica promedio de 3 curvas de calibración de As en metanol.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para demostrar en forma estadística que el sistema de As es lineal, se realizó un análisis de variancia tabla VII. En esta tabla se ve que los valores obtenidos en forma experimental son explicados en su mayor parte por el modelo lineal $y = b + mx$, y que la falta de ajuste al modelo no es significativa ya que:

$$F_{\text{regresión}} (169629.8) > F_{\text{tablas}} (4.67)$$

$$F_{\text{falta de ajuste}} (0.6318) < F_{\text{tablas}} (3.71)$$

Tabla VII

Fuente de variación	Suma de cuadrados	grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	F tablas $\alpha = 0.05$
Regresión	59.56	1	59.56	169629.8	4.67
Error	0.0046	13	0.00035		
carencia de ajuste	0.00073	3	0.00024	0.6318	3.71
Error puro	0.0038	10	0.000384		
Total	59.5628	14			

El siguiente cuadro muestra los intervalos de confianza y la prueba t para la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión de As.

Pendiente (m)		Ordenada al origen (b)	
m	= 0.0143	b	= -0.0284
t calculada	= 190.4953	t calculada	= 1.8362
t de tablas	= 3.1825	t de tablas	= 3.1825
I.C.	= 0.0145 a 0.0140	I.C.	= -0.0283 a 0.0284

I.C. = intervalo de confianza con $n-2$ gl, $\alpha = 0.05$

El sistema para ácido salicílico resultó ser lineal en el intervalo de 10-400 $\mu\text{g/ml}$, ya que r , r^2 , m , y b , cumplió con los criterios de aceptación.

Coeficiente de correlación (r)

Como $r_{\text{cal}} > 0.99$ se tiene que la relación entre la concentración de ácido salicílico y su relación de áreas es lineal en el intervalo de concentraciones trabajadas, como se ve en la fig 5.

Pendiente (m)

Como $t_{calculada} (190.4953) > t_{tablas} (3.1825)$ se rechaza la hipótesis nula de que la pendiente de la gráfica es cero ($m=0$), esto indica que la relación entre las variables de concentración y relación de áreas es diferente de cero.

Ordenada al origen (b)

Como $t_{calculada} (1.8362) < t_{tablas} (3.1825)$, y los límites de confianza calculados incluyen el valor de cero, no se puede rechazar la hipótesis nula ($b=0$), ya que el valor obtenido experimentalmente no es significativamente diferente de cero, por lo que se considera que la recta de regresión pasa por el origen.

Todo lo anterior indica que el modelo lineal $y = b + mx$, es correcto para describir la relación de concentración-relación de áreas.

IV.4.- Precisión del sistema para ácido salicílico.

La tabla VIII muestra los resultados de la precisión del sistema As.

Tabla VIII

Concentración de As ($\mu\text{g/ml}$)	Relación de áreas
400	5.6534
400	5.6130
400	5.6823
400	5.7113
400	5.6837
400	5.7074

Número de determinaciones = 6

Promedio = 5.6752

Desviación estándar = 0.0369

Coefficiente de variación = 0.6501%

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se tiene que el sistema para ácido salicílico es preciso ya que el CV \leq 2.0%.

IV.5.0.- Validación del método analítico.

IV.5.1.- Tiempos de retención del ácido salicílico y ácido salicílico.

Utilizando las condiciones cromatográficas señaladas en la sección III.2.2, se tienen los siguientes tiempos de retención.

Acido salicílico (Asu)	5.7 min.
Metil parabeno (MP)	8.6 min.
Acido salicílico (As)	10.9 min.

IV.5.2.- Especificidad del método comparado con un blanco de orina.

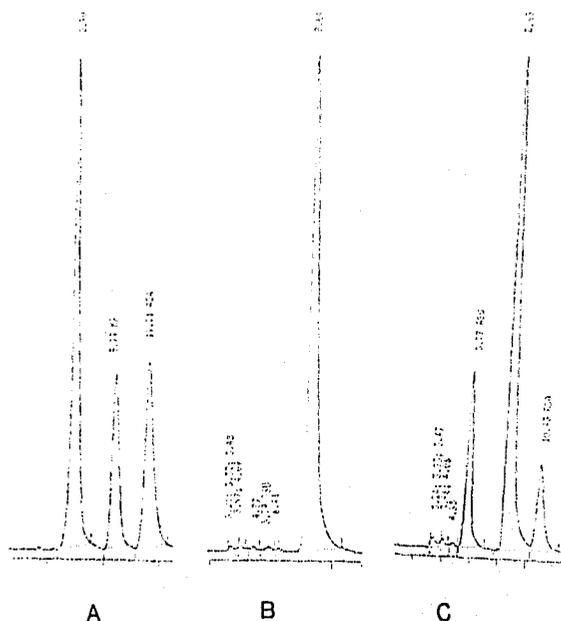


Fig 6. Muestra los cromatogramas de la especificidad del método para ácido salicílico y ácido salicílico en orina. Tomando como referencia una orina blanco.

- A) Solución estándar de Asu, As y MP en metanol.
- B) Orina blanco con proceso de extracción, resuspendida con estándar interno.
- C) Orina cargada con Asu/As, extraídas y resuspendidas con estándar interno.

ANALISIS DE RESULTADOS

Se determinó que el método es específico ya que al comparar los resultados (cromatogramas) de las muestras que contenían solamente Asu y As contra un blanco de orina, los componentes endógenos de la orina no interfieren con la respuesta de los analitos, como se aprecia en la fig 6.

IV.5.3.- Linealidad del método Asu.

La tabla IX muestra los resultados de la prueba de linealidad Asu en orina, y en la fig.7 la gráfica correspondiente, donde se observa la tendencia lineal de la cantidad agregada y cantidad recobrada después de la extracción.

Tabla IX

Cantidad agregada de Asu (μg)	Cantidad recobrada de Asu (μg)			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Promedio
20	16.2120	15.8099	16.7673	16.2631
80	68.5451	67.7862	66.2688	67.5333
200	177.1274	174.9571	169.3460	173.812
400	324.9636	350.4450	317.8840	331.095
800	663.9780	647.9178	659.9100	657.266

Número de determinaciones = 15
 Promedio de recobros = 83.5086%
 Desviación estándar = 2.9388
 El C.V._{global} = 3.5192%

En la tabla X se muestra el análisis de variancia para los datos de linealidad del método en Asu. En esta tabla se ve que los valores obtenidos en forma experimental son explicados por el modelo lineal $y = b + mx$, y que la falta de ajuste al modelo no es significativa ya que:

$$F_{\text{regresión}} (11034.3) > F_{\text{tablas}} (4.67)$$

$$F_{\text{falta de ajuste}} (0.7844) < F_{\text{tablas}} (3.71)$$

Tabla X ANADEVa de la linealidad del método en Asu.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F. calculada	F _{tablas} $\alpha = 0.05$
Regresión	798340.50	1	798340.5	11034.3	4.67
Error	940.5585	13	72.3507		
Carencia de ajuste	179.1644	3	59.7215	0.7844	3.71
Error puro	761.3941	10	76.1394		
Total	799281.06	14			

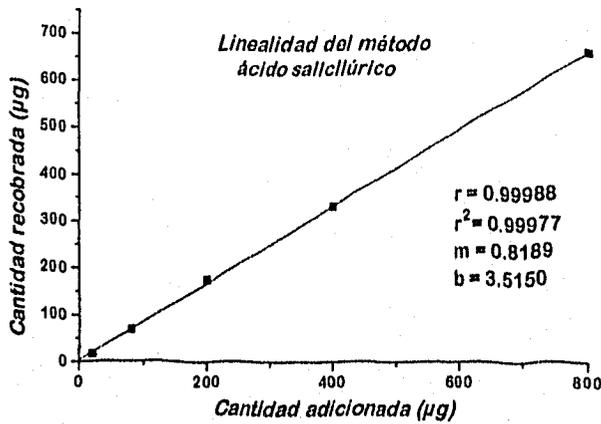


Fig 7. Gráfica promedio de 3 curvas de calibración de Asu en orina.

El cuadro siguiente muestra los intervalos de confianza y la prueba t , para la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión.

Pendiente (m)	Ordenada al origen (b)
$m = 0.8189$	$b = -3.5151$
$t_{calculada} = 115.6227$	$t_{calculada} = 1.2059$
$t_{de\ tablas} = 3.1825$	$t_{de\ tablas} = 3.1825$
I.C. = 0.7964 a 0.8415	I.C. = -5.761 a 12.791

I.C. = intervalo de confianza con $n-2$ gl, $\alpha=0.05$

ANALISIS DE RESULTADOS

El método para ácido salicílico fue lineal en el intervalo de 20-800 $\mu\text{g/ml}$, ya que r , r^2 , m , y b , cumplió con los criterios de aceptación.

Coeficiente de correlación (r)

Como $r_{calculada} > 0.99$, se tiene que la cantidad adicionada y la cantidad recuperada de Asu después de la extracción tiene un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones trabajadas, como se ve en la fig 7.

Pendiente (m)

Como $t_{calculada} (115.6227) > t_{tablas} (3.1825)$, se rechaza la hipótesis nula de que la pendiente de la gráfica es cero ($m=0$), esto indica que hay una relación entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

Ordenada al origen (b)

Como $t_{calculada} (1.2059) < t_{tablas} (3.1825)$, y los límites de confianza calculados incluyen el valor de cero, no se puede rechazar la hipótesis nula ($b=0$) ya que el intercepto obtenido en forma experimental ($b=-3.5151$) no es significativamente diferente de cero; por lo que se considera que la recta obtenida pasa por el origen.

IV.5.4.- Precisión del método en Asu.

La tabla XI muestra los resultados de la precisión del Asu en orina.

Tabla XI

Cantidad adicionada de Asu (μg)	cantidad recobrada de Asu (μg)
800	663.9780
800	647.9178
800	659.9100
800	670.3536
800	673.7730
800	655.0195

Número de determinaciones = 6
 Promedio de recobro = 661.8253
 Desviación estándar = 9.6283
 Coeficiente de variación = 1.4548%

Se tiene que el método es preciso porque el $\text{CV} \leq 10\%$

IV.5.5.- Exactitud del método en Asu.

La tabla XII muestra los porcentajes de recobros de Asu en orina.

Tabla XII

Cantidad adicionada (μg)	cantidad recobrada (μg)	Recobro (%)
20	16.2120	81.0600
20	15.8099	79.0494
20	16.7673	83.8365
80	68.5451	85.6014
80	67.7862	84.7326
80	66.2688	82.8360
200	177.1274	88.5637
200	174.9571	87.4785
200	169.3460	84.6730
400	324.9636	81.2407
400	350.4450	87.6116
400	317.8840	79.4710
800	663.9780	82.9972
800	647.9178	80.9897
800	659.9100	82.4887

Número de determinaciones = 15
Promedio de recobro = 83.5086%
Desviación estándar = 2.9388
Coeficiente de variación = 3.5192%

Contraste de hipótesis:

H_0 = Recobro = 100 %
 H_A = Recobro \neq 100 %

$$t_{\text{calculada}} = \frac{(100 - 83.5086)(15)^{1/2}}{2.9388} = 21.7337 \quad t_{\text{tablas}} (\alpha=0.05, n-1) = 2.1448$$

Intervalos de confianza para el porcentaje recobrado (I.C)

$$\begin{aligned} \text{I.C. } (\alpha=0.05, n-1) &= 83.5086 \pm 1.6275 \\ L_{\text{superior}} &= 81.8811 \\ L_{\text{inferior}} &= 85.136 \end{aligned}$$

ANÁLISIS DE RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos de la prueba t e intervalos de confianza, se tiene que el método no es exacto, ya que la $t_{\text{calculada}}$ (21.7337) > t_{tablas} (2.57) y el valor de 100% no está incluido en intervalo de confianza calculado. Lo cual indica que el método sólo es capaz de recobrar en promedio un 83% de la cantidad total de Asu adicionada, sin embargo el recobro de extracción se considera bueno, porque se trabajó con una matriz biológica en donde la variabilidad aumenta.

Además el C.V global de los recobros obtenidos es de 1.45% estando dentro del límite aceptado que es del 10%, por lo que el recobro en cada extracción es repetible.

IV.5.6.- Reproducibilidad del método Asu.

La tabla XIII muestra los resultados obtenidos al efectuar el análisis de orinas cargadas con 800 μg de ácido salicílico, por dos analistas en dos días diferentes y en la tabla XIV se tiene el análisis de variancia correspondiente.

Tabla XIII
Porcentajes de recobro de ácido salicílico en orina.

Día	Analista 1	Analista 2
1	83.0215	83.1060
1	83.7115	82.9015
1	83.5196	83.5763
2	84.4410	84.0712
2	83.7020	83.2560
2	84.2311	83.0136

Tabla XIV ANADEVIA de la reproducibilidad del método en Asu

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F _{calculada}	F _{tablas} $\alpha=0.05$
Regresión	0.6084	1	0.6084	3.484	7.571
Error	0.6905	1	0.6905	3.954	7.571
Carencia de ajuste	0.1552	1	0.1552	0.888	7.571
Error puro	1.3971	8	0.1746		
Total	2.8511	11			

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Con el fin de establecer las fuentes de variación del método se efectuó el análisis de variancia por dos vías, en base a este, se tiene que el método para Asu es reproducible tanto para diferentes días como para analista, ya que no existen diferencias significativas en los recobros obtenidos de las orinas analizadas como se ve en las F calculadas.

$$F_{\text{analista}} (3.48) < F_{\text{tablas}}(7.51)$$

$$F_{\text{días}} (3.54) < F_{\text{tablas}}(7.51)$$

$$F_{\text{analista-día}} (0.85) < F_{\text{tablas}}(7.51)$$

IV.5.7.- Estabilidad de ácido salicílico en orina.

En la tabla XV se muestran los resultados de la estabilidad de orinas cargadas con 800 µg/ml del Asu.

Tabla XV Recobros en estabilidad de Asu (condición/tiempo)

Inicial	10 °C /24 hrs	10 °C /48 hrs	10 °C /8 días
82.6315	82.1120	82.8225	78.1854
83.1128	82.9647	82.5310	79.0014

El siguiente cuadro muestra los valores del factor I, el cual se calcula:

$$\text{Factor I} = \frac{\text{Recobro en condición/tiempo} \times 100}{\text{Recobro inicial}}$$

Condiciones	10 °C/24 hrs	10 °C/48 hrs	10 °C/8 días
Factor I	99.37	99.54	94.62
Factor I	99.82	99.30	95.05
Promedio de FI	99.55	99.42	94.84

ANÁLISIS DE RESULTADOS

El ácido salicílico es estable cuando se mantiene en refrigeración (-10 °C) durante 24 y 48 horas, ya que el valor promedio del factor I correspondiente a cada condición, se encuentra dentro de los límites de aceptación que son del 98 -102%. Pero a los 8 días de almacenamiento el Asu deja de ser estable aun en refrigeración, ya que el valor promedio del factor I es 94.84 % no encontrándose dentro de los límites de aceptación.

IV.6.0.- Validación del método ácido salicílico (As)

IV.6.1.- Linealidad del método As.

La tabla XVI muestra los resultados de la prueba de linealidad del As en orina, y en la fig 8 la gráfica correspondiente, donde se observa la tendencia lineal de la cantidad agregada y cantidad recobrada de As después de la extracción.

Tabla XVI

Cantidad de As adicionada (μg)	Cantidad recobrada de As (μg)			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Promedio
10	8.1333	7.9802	8.3098	8.1408
40	31.8901	32.4930	31.9023	32.0951
100	81.1518	85.3222	82.8672	83.1137
200	160.7411	169.5204	161.0497	163.9196
400	332.779	331.4046	328.0029	330.6040

Número de determinaciones = 15
 Promedio de recobros = 81.8845%
 Desviación estándar = 1.7593
 El C.V. global = 2.1485%

La tabla XVII muestra el análisis de variancia para los datos de la linealidad del método en As. En esta tabla se ve que los valores obtenidos en forma experimental se ajustan al modelo lineal $y = b + mx$, ya que:

$F_{\text{regresión}} (35066.8) > F_{\text{tablas}} (4.67)$
 $F_{\text{falta de ajuste}} (0.3403) < F_{\text{tablas}} (3.71)$

Tabla XVII ANADEVIA para la linealidad del método en As.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	$F_{\text{calculada}}$	$F_{\text{tablas}} \alpha = 0.05$
Regresión	203601.38	1	203601.38	35066.8	4.67
Error	75.4796	13	5.80612		
Carencia de ajuste	6.9912	3	2.3304	0.3403	3.71
Error puro	68.4884	10	6.8488		
Total	203676.86	14			

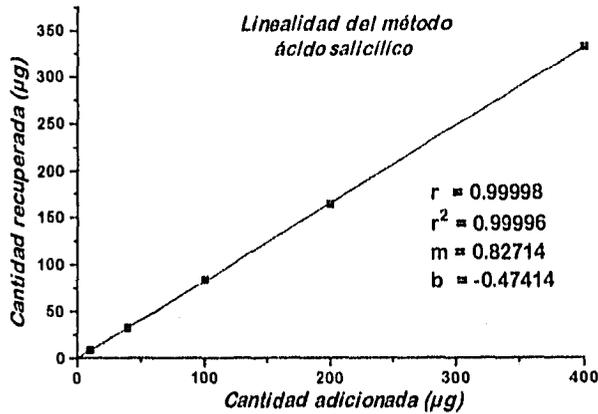


Fig 8. Gráfica promedio de 3 curvas de calibración de As en orina.

Los intervalos de confianza y la prueba t, para la ordenada al origen y pendiente de la recta de regresión se tienen en el cuadro siguiente.

<i>Pendiente (m)</i>	<i>Ordenada al origen (b)</i>
m = 0.8271	b = -0.4741
t calculada = 295.1332	t calculada = -0.8175
t de tablas = 3.1825	t de tablas = 3.1825
I.C. = 0.8182 a 0.8271	I.C. = -2.3067 a 1.363-

I.C. = Intervalo de confianza con $n-2$ gl, $\alpha=0.05$

ANÁLISIS DE RESULTADOS

El método para ácido salicílico resultó ser lineal en el intervalo de 10-400 µg/ml, ya que cumplió con los criterios de aceptación.

Coefficiente de correlación (r)

Como $r_{calculada} > 0.99$ se tiene que la cantidad adicionada y la cantidad recuperada después de la extracción es lineal en el intervalo de concentraciones trabajadas, como se aprecia en la fig 8.

Pendiente (m)

Como $t_{calculada} (295.1332) > t_{tablas} (3.1825)$, se rechaza la hipótesis nula de que la pendiente de la gráfica es cero ($m=0$), esto indica que hay una relación diferente a cero entre la cantidad adicionada y la recuperada.

Ordenada al origen (b)

Como $t_{calculada} (-0.8175) < t_{tablas} (3.1825)$, y los límites de confianza calculados incluyen el valor de cero, no se puede rechazar la hipótesis nula ($b=0$), ya que el intercepto obtenido en forma experimental ($b= -0.4715$) no difiere significativamente de cero; por lo que se considera que la recta experimental pasa por el origen.

IV.6.2.- Precisión del método en As.

La tabla XVIII muestra los resultados de la precisión del ácido salicílico en orina.

Tabla XVIII.

Cantidad adicionada de As (μg)	Cantidad recuperada de As (μg)
400	332.7790
400	331.4046
400	328.0029
400	324.4128
400	337.6093
400	335.074

Número de determinaciones = 6
 Promedio = 331.5471
 Desviación estándar = 4.7788
 Coeficiente de variación = 1.4414%

ANALISIS DE RESULTADOS

Se tiene que el método es preciso ya que el $CV \leq 10\%$.

IV.6.3.- Exactitud del método en As.

La tabla XIX muestra los resultados de la exactitud del método en ácido salicílico en orina.

Tabla XIX

Cantidad adicionada (μg)	Cantidad recobrada (μg)	Recobro (%)
10	8.1333	81.3360
10	7.9802	79.8015
10	8.3089	83.0897
40	31.8901	79.7253
40	32.4930	81.2324
40	31.9023	79.8075
100	81.1518	81.1518
100	85.3222	85.3229
100	82.8672	82.8671
200	160.7411	80.3705
200	169.5204	84.7602
200	161.4974	80.750
400	332.779	83.1941
400	331.4046	82.8511
400	328.0029	82.007

Número de determinaciones = 15
 Promedio de recobro = 81.8845
 Desviación estándar = 1.759
 Coeficiente de variación = 2.1485%

Contraste de hipótesis

$H_0 = \text{Recobro} = 100 \%$

$H_A = \text{Recobro} \neq 100 \%$

$$t_{\text{calculada}} = \frac{(100 - 81.8845)(15)^{1/2}}{1.759} = 39.8755 \quad t_{\text{tablas } (\alpha=0.05, n-1)} = 2.1448$$

Intervalos de confianza del porcentaje recobrado (I.C)

$$I.C (\alpha=0.05, n-1) = 81.8845 \pm 0.9721$$

$$L_{\text{-superior}} = 82.8845$$

$$L_{\text{-inferior}} = 80.912$$

ANALISIS DE RESULTADOS

Conforme a los resultados obtenidos en la prueba t e intervalos de confianza, se tiene que el método no es exacto, ya que la $t_{\text{calculada}}$ (39.8755) > t_{tablas} (2.14) y el valor de 100% no está incluido en intervalo de confianza calculado. Lo cual indica que el método sólo recobra en promedio 81.88% de la cantidad total de As adicionada, sin embargo el recobro de extracción se considera bueno, ya que se trabajó en fluido biológico en el cual la variación aumenta. Además el C.V de los recobros obtenidos es de 2.14% estando dentro del límite aceptado que es de 10%, por lo que el recobro en cada extracción es repetible.

IV.6.4.- Reproducibilidad del método As.

La tabla XX muestra los resultados obtenidos al efectuar el análisis de orinas cargadas con 400 μg de ácido salicílico, por dos analistas en dos días diferentes y en la tabla XXI se tiene el análisis de variancia correspondiente.

Tabla XX
Porcentajes de recobro de ácido salicílico en orina

Día	Analista 1	Analista 2
1	81.3659	79.5030
1	84.9130	81.7010
1	81.4263	82.6370
2	83.9467	82.1097
2	82.5201	80.1919
2	83.1127	83.3317

Tabla XXI ANADEVIA de la reproducibilidad del método en As.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F Calculada	F _{tablas} $\alpha = 0.05$
Analista	5.0835	1	5.0835	2.090	7.571
Día	1.1232	1	1.1232	0.461	7.571
Analista-día	5.6×10^{-4}	1	5.6×10^{-4}		7.571
Error	19.4611	8	2.4326		
Total	25.6653	11			

ANALISIS DE RESULTADOS

Con el fin de establecer las fuentes de variación del método se efectuó el análisis de variancia por dos vías, en base a este, se tiene que el método para As es reproducible tanto en días como en analistas, ya que no se encontro diferencias significativas en los recobros de las orinas trabajadas, como se ve en las F calculadas.

$$F_{analista} (2.09) < F_{tablas}(7.51)$$

$$F_{días} (0.46) < F_{tablas}(7.51)$$

IV.6.5.- Estabilidad de ácido salicílico en orina.

La tabla XXII muestra los resultados de estabilidad de muestras de orina cargadas con 800 µg/ml de As.

Tabla XXII Recobros de estabilidad de As dada en (condición/tiempo)

Inicial	10 °C /24 hrs	10 °C /48 hrs	10 °C /8 días.
82.5210	82.0753	82.1342	80.5293
83.3015	82.3420	82.0027	80.1740

El siguiente cuadro muestra los valores del factor I, el cual se calcula como.

$$\text{Factor I} = \frac{\text{Recobro en condición/tiempo} \times 100}{\text{Recobro inicial}}$$

Condiciones	10 °C /24 hrs	10 °C /48 hrs	10 °C/8 días
Factor I	99.46	99.53	97.58
Factor I	98.85	98.44	96.25
Promedio de FI	99.15	98.98	96.92

ANALISIS DE RESULTADOS

El ácido salicílico es estable cuando se mantiene en refrigeración a -10 °C durante 24 y 48 horas, ya que el valor promedio del factor I a esos tiempos se encuentra dentro de los límites de 98-102%, que son los aceptados. Pero a los 8 días de almacenamiento las muestras de As dejan de ser estables, ya que el valor promedio del factor I es de 96.92% no encontrándose dentro del intervalo de aceptación.

IV.7.0.- Límite de detección para ácido salicílico y ácido salicílico.

La mínima concentración que se puede determinar de ácido salicílico es de 8 $\mu\text{g/ml}$ y 4 $\mu\text{g/ml}$ de ácido salicílico, dado que da una respuesta aproximada de 2 veces más grande que el ruido cromatográfico. En la fig 9 se muestra el cromatograma correspondiente.

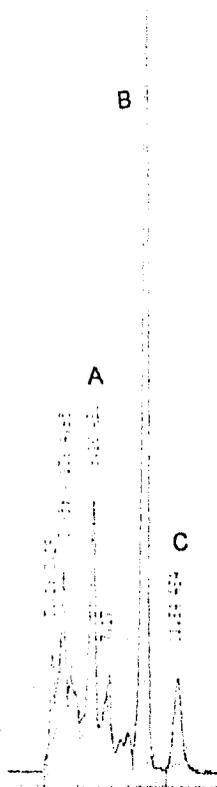


Fig 9. Cromatograma de una muestra de orina cargada con 8 $\mu\text{g/ml}$ de ácido salicílico y 4 $\mu\text{g/ml}$ de ácido salicílico.

A) Acido salicílico

B) Estándar interno

C) Acido salicílico

CONCLUSIONES

V.O.- CONCLUSIONES

El método analítico implementado en el laboratorio para determinar ácido salicílico y ácido salicílico en orina por cromatografía de líquidos de alta resolución es adecuado ya que cumplió con los criterios de validación.

El método fue específico, lineal, repetible, y reproducible, de esta forma se demostró la confiabilidad del método analítico para cuantificar dos productos de biotransformación de aspirina en orina.

El método para ácido salicílico y ácido salicílico resulto ser específico ya que los cromatogramas de blancos de orina no interfieren con ningún pico de los analitos a cuantificar.

El método resulto ser lineal en el intervalo de concentraciones de 20-800 $\mu\text{g/ml}$ para ácido salicílico y de 10-400 $\mu\text{g/ml}$ para ácido salicílico, este intervalo se propuso porque son las concentraciones que se esperan al efectuar el estudio de bioequivalencia del ácido acetilsalicílico.

El porcentaje de recobro de los dos analitos después de la extracción es en promedio de 82-83 % siendo este repetible en cada extracción.

Las ventajas que presentó el método implementado son:

Es sencillo y rápido ya que no requiere de un tratamiento complicado de muestras lo que lo hace adecuado para un estudio de bioequivalencia.

Con respecto a otros métodos analíticos reportados vemos que el volumen de disolvente para extraer a los analitos es de 2 ml y la fase móvil empleada evita el uso de sales y de acetonitrilo.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Celdric M, Smith M, Farmacología, Ed. Panamericana, Buenos Aires, 1993, p. 411.
- 2.- Bowman W, Farmacología, 2 ed. Ed. Interamericana, México, 1984, p.16.
- 3.- Bevan J, Fundamentos de farmacología, 2ed, Ed. Harla, México, 1982, p.294.
- 4.- Dipalma J, Farmacología básica y terapéutica medica, Ed. Prensa Medica Mexicana, México, 1976, p. 193.
- 5.-The Merck index encyclopedía of chemicals drugs and biological, Published by Merck Co. Inc, eleventh ed. Ed. Rahway U.S.A, 1989, pp. 134, 1324.
- 6.- Goodman y Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica, 8 ed. Ed. Medica Panamericana, México, 1993, pp. 626-627, 630, 634-636.
- 7.- Shen J, Novel direct high performance liquid chromatographic method for determination of salicylate glucuronide conjugates in human urine, J. Chrom. (1991), No. 565, pp. 309-320.
- 8.- O'Kruk J, Rapid and sensitive determination of acetylsalicylic acid and its metabolites using reverse phase high performance liquid chromatography, J. Chrom. (1984), No. 310, pp. 343-352.
- 9.- Rumble R, Determination of Aspirin and its major metabolites in plasma by high performance liquid chromatography without solvent extraction, J. Chrom. (1981), No. 225, pp. 252-260.
- 10.- Harrison L, Funk M, High pressure liquid chromatographic determination of salicylsalicylic acid, Aspirin, and salicylic acid in human plasma and urine, J. Chrom. (1980), No. 11, pp. 1268-1270
- 11.- Sedgwick A, Studies into the mode action of non steroidal anti inflammatory drugs using a model of facsimile synovium, J. Pharm. Pharmacol, (1984), No. 36, pp. 171-174.
- 12.- Goth, Farmacología Clínica, 12 ed. Ed. Panamericana, México, 1990, pp. 299-300.
- 13.- Meyers F, Jawetz E, Review of medical pharmacology, Ed. Lange Medical Publications, Los Altos California, 1980, p. 281.
- 14.- Manson W, Kinetics of Aspirin, salicylic acid, and salicylic acid following oral administration of Aspirin as a tablet and two buffered solutions, J. Pharm. Scie. (1981), No. 3, pp. 262-265.

- 15.- Levine R, Farmacología acciones y reacciones medicamentosas, Ed. Salvat editores, España, 1982, pp. 140-143, 212-214.
- 16.- Koch P, Influence of food and fluid ingestion on Aspirin bioavailability, J. Pharm. Sci. (1978), No. 11, pp.1533-1535.
- 17.- Litter M, Compendio de Farmacología, 4 ed. Ed. El Ateneo, Argentina, 1988, p. 619.
- 18.- Katzung B, Farmacología básica y clínica, 3 ed. Ed. El manual Moderno, México, 1987, pp. 412- 413.
- 19.- Bedford A, Capacity limited Salicylurate formation during prolonged administration of Aspirin healthy human subjects, J. Pharm. Sci. (1969), No.4, pp. 503-504.
- 20.- Drill's, Pharmacology in medicine, Fourth edition, Mc Graw Hill Book Company, printed in United States of America, 1971, pp. 394-395.
- 21.- Lippincott's, illustrated Reviews Pharmacology, Ed. Harwey, Philadelphia, New York, 1992, pp. 362-364, 367- 368.
- 22.- Dearden J, Nicholson M, Correlation between gastric irritancy and anti-inflammatory activity of non steroidalanti inflammatory drugs, J. Pharm. Pharmacol. (1984), No. 36, pp. 713-715.
- 23.- Junzo M, Decrease of gastrointestinal mucosa damage by salicyluric acid compared with salicylic acid in rabbits, J. Pharm. Pharmacol. (1991), No. 43, pp. 766-773.
- 24.- Mays D, Sharp C, Improved method for the determination of Aspirin and its metabolites in biological fluids by high performance liquid chromatography aplications to human and animal studies, J. Chrom. (1984), Vol. 311, pp. 301-309.
- 25.- Clarke's, Isolation and identification of drugs, 2 ed. Ed. The Pharmaceutical Press London, 1986, p. 96.
- 26.- Exfeld H, Nelson J, Salicylate determined with a microcentrifugal analizer and compared with Du Pont, Trinder and liquid chromatographics method, Clin. Chem. (1983), No. 5, pp. 839-841.
- 27.- Geoffrey W, Simple and rapid high Pressure liquid chromatographic simultaneous determination of Aspirin, salicylic acid, and salicyluric acid in plasma, J. Pharm. Sci. (1978), No. 5, pp. 710-712.
- 28.- Morris H, Christlan E, Gas-liquid chromatography of salicylate metabolites, J. Pharm. Sci. (1970), No. 2, pp. 270-271.
- 29.- Seeger A, Interations of Aspirin with Acetominophen and Caffeine in rat stomach. pharmacokinetics of absorption on accumulation in gastric mucosa, J. Pharm. Sci. (1980), No. 8, pp. 832-836.

- 30.- Buskin N, Robert A, Improved liquid chromatography of Aspirin, salicylate and salicylic acid in plasma with a modification for determining Aspirin metabolites in urine, *Clin. Chem.* (1982), pp. 1200-1203.
- 31.- Winthrop E, Fluorometric determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in blood, *J. Pharm. Sci.* (1966), No. 4, pp. 380-389.
- 32.- Kanter L, Williams R; Direct measurements of Aspirin, *J. Pharm. Sci.* (1971), No. 12, pp. 1898-1900.
- 33.-Gerald L, Hawk, *Biological biomedical applications of chromatography*, Ed. Marcel Dekker inc, printed in the united States of American, pp. 625-632.
- 34.-Harold M, Nair Nc, *Cromatografía líquida de alta presión*, Ed. OMS, Washington D.C, Monografía No. 10, 1980, pp. 1, 16, 18, 22, 27.
- 35.- Garrido F, Sugerencias importantes en el manejo de su HPLC, *Pharma. News*, (1991), Vol. 2, No.1, pp. 18-20.
- 36.- Bello G, La cromatografía de líquidos de alta resolución, *Pharma News*, (1991), Vol. 2, No. 1, pp. 23-26.
- 37.- Vera E, Thiberts M, *Manual de Cromatografía de líquidos de alta eficiencia*, México, 1989, pp. 15, 18-20.
- 38.- Gough T, *The analysis of drugs of abuse*, John Wiley & Sons, Printed in Great Britain, 1991, pp. 129, 138.
- 39.- *Manual de validación de métodos analíticos*, editado por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos biólogos, México.
- 40.- Hirtz J, *Biopharmaceuticals and drug disposition*, Vol. 7, 1986, pp. 315-326.
- 41.- Chamberlain J, *Analysis of drugs in biological fluids*, Ed. library of congress cataloging in publication data, EEUU, 1987.
- 42.- Day R, Formation of methyl ester of salicylic acid during quantitation of salicylic acid in urine by high pressure liquid chromatography, *J. Pharm. Sci.* (1981), No. 9, pp. 1990-1992.
- 43.-Karnes T, Shiu G, Validation of bioanalytical methods, *Pharmaceutical Research*, (1991), No. 4, pp. 421-426.
- 44.-Karnes T, Clark M, Precision, accuracy, and data acceptance critario in biopharmaceutical analysis, *Pharmaceutical Research*, (1993), No. 10, pp. 1420-1426.
- 45.- Anerson R, *Practical statistics for analytical chemistry*, printed in the United States of American, 1987, pp. 94-100, 102-103.