

00524
102



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**"DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA
LA CUANTIFICACION DE DICLOFENACO EN PLASMA".**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A N ,
SERGIO MARES SAMANO
GONZALO OVIEDO SALAZAR



MEXICO, D. F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

2003



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:

VOCAL:

SECRETARIO:

PRIMER SUPLENTE:

SEGUNDO SUPLENTE:

Prof. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado

Prof. José Manuel Morales Hernández

Prof. Myriam Cortés Fuentes

Prof. Liz Jannet Medina Reyes

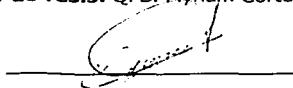
Prof. María de Lourdes Cervantes Ayala

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Centro A. F. De Estudios Tecnológicos

Departamento de Analítica

Asesor de Tesis: QFB. Myriam Cortés Fuentes



Sergio Mares Sámano

Sustentantes:



Gonzalo Oviedo Salazar

*El alquimista piensa en las secretas leyes que unen
planetas y metales. Y mientras cree tocar enardecido
el oro aquél que matará la Muerte, Dios, que sabe de
alquimia, lo convierte en polvo, en nadie, en nada y
en olvido.*

Jorge Luis Borges

A mi Familia

**PREGUNTAS DE UN OBRERO
QUE LEE.**

*¿Quién construyó Tebas, la de las siete
puertas? En los libros de historia
figuran sólo nombres de reyes. ¿Acaso
arrastraron ellos los bloques de piedra?*

*Y Babilonia, mil veces destruida. ¿quién
la volvió a levantar otras tantas?*

*Quiénes edificaron la dorada Lima, ¿en
qué casas vivían? ¿Adonde fueron sus
albariles la noche en que se terminó la
Gran Muralla China?*

*Llena está de arcos triunfales Roma la
grande. ¿Quién los levantó? Sus césares,
¿sobre quienes triunfaron?*

*Bizancio, tantas veces laada, para sus
habitantes. ¿sólo tenía Palacios?*

*Hasta la legendaria Atlántida, la noche
en que el mar se la tragó, los que se
ahogaban pedían, bramando, ayuda a
sus esclavos.*

El joven Alejandro conquistó la India. ¿él solo?

*César venció a los galos. ¿No llevaba siquiera un
cocinero?*

*Felipe II lloró al saber su flota hundida. ¿No lloró
nadie más que él?*

*Federico de Prusia ganó la guerra de los treinta años.
¿Quién la ganó también?*

*Un triunfo en cada página. ¿Quién preparaba los
festines?*

*Un gran hombre cada diez años. ¿Quién pagaba los
gastos.*

Tantas historias.

tantas preguntas.

Bertolt Brecht

***Sin Ustedes nada sería, gracias.
Los quiere mucho
Sergio***

Dedicatorias

A mis Padres Gonzalo y Rosa quienes con su amor y sacrificios me han impulsado a alcanzar una meta muy importante de mi vida.

A mis hermanos Maira y Erick que han confiado en mí y de los que he recibido apoyo incondicional.

A mis primos y amigos con quienes he compartido momentos inolvidables y para que constituya un ejemplo a seguir.

A ti Perla que con tu amor has engrandecido mi vida y con quien he aprendido a compartir momentos de tristeza y alegría.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y especialmente a la Facultad de Química.

Al personal del Centro A. F. de Estudios Tecnológicos y sobretodo a nuestros compañeros del Departamento de Analítica por brindarnos la oportunidad, el apoyo y los buenos consejos para realizar el presente trabajo.

A los integrantes del jurado y de manera especial a Myriam Cortés por sus enseñanzas y sus atinados consejos que contribuyeron en la realización de este trabajo.

I N D I C E

0. Resumen	1
1. Introducción	1
1.1. Retrospectiva(1-4).....	1
1.2. Objetivos.....	2
2. Fundamentos teóricos	3
2.1. Monografía del fármaco (5-7).....	3
2.1.1. Descripción.....	3
2.1.2. Propiedades Físicoquímicas.....	3
2.1.3. Farmacología.....	5
2.1.4. Toxicología.....	5
2.2. Generalidades sobre biodisponibilidad y bioequivalencia (4,8,9).....	7
2.3. Generalidades sobre Cromatografía (10-21).....	9
2.3.1. Parámetros Cromatográficos.....	10
2.3.2. Equipo utilizado en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	15
2.3.3. Cromatografía Bidimensional (Column Switching).....	20
2.4. Extracción en fluidos biológicos.....	24
2.4.1. Generalidades.....	24
2.4.2. Precipitación de Proteínas.....	25
2.4.3. Extracción líquido – líquido.....	26
2.4.4. Extracción en Fase Sólida.....	27
2.5. Generalidades sobre validación de métodos analíticos (22 – 25).....	30
2.6. Métodos reportados para Diclofenaco (26 – 30).....	32
3. Planteamiento del Problema	34

4. Metodología Experimental	34
4.1. Sustancia de Referencia.....	34
4.2. Reactivos y Equipo.....	34
4.3. Desarrollo del método.....	36
4.4. Descripción del método.....	40
4.4.1. Reactivos, soluciones y equipo.....	40
4.4.2. Metodología Analítica.....	42
4.4.3. Condiciones de Trabajo.....	42
4.5. Cálculos.....	45
4.6. Criterios de Aceptación de la corrida analítica.....	45
5. Parámetros de Validación determinados	46
5.1. Selectividad.....	46
5.2. Recuperación Absoluta.....	46
5.3. Exactitud, precisión y linealidad.....	46
5.4. Rango.....	48
5.5. Estabilidad de la muestra en el disolvente de inyección.....	48
5.6. Estabilidad de la muestra a ciclos de congelación / descongelación.....	48
5.7. Límite de detección.....	49
5.8. Límite de cuantificación.....	49
6. Resultados y discusión	50
6.1. Resultados del desarrollo del método.....	50
6.1.1. Precipitación Selectiva.....	50
6.1.2. Extracción líquido – líquido.....	51
6.1.3. Extracción en fase sólida.....	52
6.1.4. Extracción en línea.....	53
6.2. Resultados de los parámetros de Validación Determinados.....	56
6.2.1. Selectividad.....	56
6.2.2. Recuperación Absoluta.....	57
6.2.3. Exactitud, precisión y linealidad.....	57
6.2.4. Rango.....	61
6.2.5. Estabilidad de la muestra en el disolvente de inyección.....	61

6.2.6. Estabilidad de la muestra a ciclos de congelación /descongelación.....	62
6.2.7. Límite de detección.....	62
6.2.8. Límite de cuantificación.....	63
7. Conclusiones.....	64
8. Referencias.....	65

0. RESUMEN

Un método basado en cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) altamente sensible y específico fue desarrollado para la determinación de Diclofenaco en plasma humano. En virtud de la sencillez del tratamiento de la muestra no fue necesario el empleo de un estándar interno. La muestra fue sometida inicialmente a una precipitación selectiva con acetonitrilo para remover proteínas, enseguida, se evapora la muestra y luego se reconstituye. Posteriormente se analiza en un sistema cromatográfico que incluye un sistema de limpieza en línea en una guarda columna X Terra C18 (5µm de tamaño de partícula y de 25*3.9 mm), previo a su ingreso en la columna analítica X Terra RP 8 (5µm de tamaño de partícula y de 150 *3.9 mm). Se empleó un sistema de detección UV a 280 nm. Finalmente, se determinaron algunos parámetros de validación que mostraron que el método es lineal, exacto y preciso.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Retrospectiva (1 – 4)

El primer uso de medicamentos del que se tiene registro ocurrió hace aproximadamente 4000 años, en las culturas babilónica, asiria y egipcia. Documentos de esos tiempos mencionan un gran número de sustancias, algunas farmacológicamente activas y otras inertes. La administración de éstos medicamentos fue a menudo acompañada de rituales, indicando que la magia y lo sobrenatural jugaron un papel importante en el desarrollo del concepto de las enfermedades y sus respectivos tratamientos. La preparación de tales remedios y el control de su uso estuvo generalmente en manos de los sacerdotes, quienes sirvieron como exorcistas, adivinos, curanderos y además funcionaron como agencia reguladora del uso de los medicamentos. En la Grecia antigua y durante el imperio romano, la responsabilidad de la manufactura de los medicamentos y la regulación de su uso permaneció aún en manos de los médicos, aunque algunas veces distribuidores les suministraron medicamentos ya preparados. Esta situación imperó durante un periodo de tiempo bastante amplio lo que provocó que se tuvieran una gran cantidad de dificultades relacionadas con el suministro y fabricación de medicamentos, tales problemas, alcanzaron dimensiones catastróficas en la década de los 60's, cuando ocurrió el incidente de la talidomida. Se demostró la teratogenicidad de dicho medicamento promovido para ser usado en el primer trimestre del embarazo. También en 1960 se informó sobre la ineficacia del medicamento dicumarol en un grupo de pacientes, investigaciones posteriores revelaron que dicha situación se debió a que se aumentó la cantidad de excipientes en la formulación para favorecer que la tableta pudiera desintegrarse fácilmente, esto disminuyó la liberación del fármaco. En 1963 se reportó que al sustituir una marca por otra del medicamento prednisona, el nuevo producto no dio la eficacia esperada en pacientes con artritis. En 1968 el cambio de sulfato de calcio por lactosa como excipiente en las tabletas de fenitoína provocó una mayor absorción lo que también aumentó la incidencia de efectos secundarios.

Estos casos condujeron a que organismos gubernamentales competentes en el ámbito de la salud (particularmente la F.D.A. Food and Drug Administration en los Estados Unidos) requirieran, por un lado que se comenzaran a implementar estudios de toxicidad en animales (estudios preclínicos) y posteriormente en humanos (estudios clínicos) así como la

aprobación de una solicitud de fármaco nuevo (New Drug Application, NDA) antes de que el medicamento pudiera ser comercializado. Por otra parte, en el caso de dos productos que contienen el mismo principio activo en la misma dosis y en la misma forma farmacéutica, la necesidad de demostrar la ausencia de una diferencia significativa en la velocidad y la medida en que el ingrediente activo o la fracción activa se hace disponible en el sitio de acción farmacológico, dio lugar a los estudios de bioequivalencia, además del requerimiento de aprobación de la solicitud ANDA (abbreviated new drug application). También se requieren de estudios de bioequivalencia cuando el medicamento innovador se reformula en cuyo caso, también se requiere un suplemento de NDA.

Ante esta perspectiva, el desarrollo de métodos analíticos se torna fundamental, porque finalmente son la herramienta principal mediante la cual se determina si un medicamento es seguro y eficaz o en su caso terapéuticamente equivalente a otro.

Hasta hace unos años, el desarrollo de métodos analíticos para cuantificar fármacos en fluidos biológicos se aplicaba sólo a la medicina forense, pero en la actualidad las aplicaciones han crecido y se pueden encontrar en estudios de sobredosis, monitorco en estudios clínicos y sobre todo en el desarrollo de nuevos fármacos desde que es una nueva entidad química hasta que finalmente se comercializa.

De una manera sencilla, el análisis de fármacos consiste en presentar la muestra ante un dispositivo medidor, el cual posteriormente arrojará las respuestas "*que es*" y "*cuanto es*". Sin embargo, un fluido biológico no es una mezcla simple, sino una mezcla muy compleja de lípidos, carbohidratos, proteínas, y otros componentes que pueden interactuar entre sí, interfiriendo con la determinación del analito, por ejemplo, elevando la respuesta, enmascarándola, o alterando sus niveles debido a una degradación (factores de pH, enzimas).

Indudablemente, la técnica de análisis de mayor aceptación para analizar fármacos en fluidos biológicos es la cromatografía, esto es por sus características cuantitativas y cualitativas. Dentro de la cromatografía, uno de los métodos mas utilizados es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución o CLAR. (HPLC, High Performance Liquid Chromatography).

En este trabajo se presenta el desarrollo de un método analítico mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, sencillo y específico para la determinación rápida de Diclofenaco sódico en plasma humano.

1.2. Objetivos

Establecer las condiciones experimentales que permitan cuantificar Diclofenaco sódico en plasma humano mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), de tal manera que la aplicación eventual del método desarrollado en un estudio de bioequivalencia sea factible.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

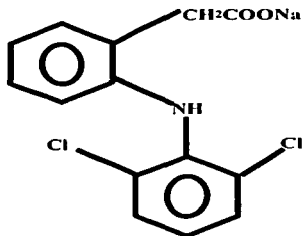
2.1. Monografía del Fármaco (5 – 7)

2.1.1. Descripción

2.1.1.1. Nombre

- Nombre genérico: Diclofenaco sódico.
- Nombres químicos: Sal monosódica del 2-[(2,6-Diclorofenil) amino]ácido bencenacético, Sal monosódica del [*o*-(2,6-dicloroanilino) fenil] ácido acético, y [*o*-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil] acetato de sodio.
- Nombres comerciales: Diclofenac, Voltaren, Voltarol.

2.1.1.2. Fórmula y Peso molecular



La fórmula condensada del Diclofenaco es $C_{14}H_{10}Cl_2NO_2Na$. Su peso molecular es 318.13 g / mol

2.1.1.3. Apariencia

Pólvo cristalino blanco opaco, inodoro y ligeramente higroscópico.

2.1.2. Propiedades Físicoquímicas

2.1.2.1. Absorción Ultravioleta

En la figura 1, se muestra el espectro ultravioleta del Diclofenaco sódico en dos disolventes, metanol (i) y buffer de fosfatos pH = 7.2 (ii).

Se puede observar la característica de absorción del grupo aromático. Las longitudes de onda de máxima absorción son 283 y 276 nm en metanol y en buffer respectivamente.

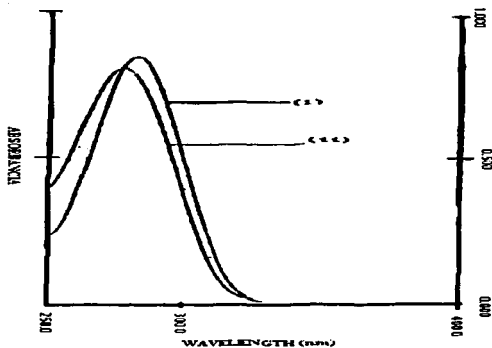


Figura 1. Espectro de Absorción al UV del Diclofenaco sódico.

2.1.2.2. Solubilidad

Los equilibrios de solubilidad llevados a cabo en diversos solventes a temperatura ambiente se muestran en la tabla 1.

DISOLVENTE	SOLUBILIDAD (mg. / mL)
Metanol	> 24
Agua desionizada (pH = 5,2)	> 9
Acetona	6
Buffer de fosfatos pH = 7,2	6
Acetonitrilo	< 1
Ciclohexano	< 1
Acido clorhídrico pH = 1,1	< 1

Tabla 1. Solubilidad del Diclofenaco Sódico.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2.1.2.3. Punto de Ebullición, Constante de Acidez y Coeficiente de partición

El punto de fusión se encuentra entre 283° y 285 ° C.

pKa = 4 (en agua).

Coeficiente de partición = 13.4 (en n-octanol / buffer).

2.1.3. Farmacología

2.1.3.1. Farmacocinética

El Diclofenaco sódico se absorbe completamente desde el tracto gastrointestinal después de una administración oral. Tiene un tiempo de vida media de 1 a 2 horas aproximadamente con concentraciones plasmáticas medias de 1.5 mcg / mL con dosis simples de 50 mg. Esto es con un tiempo máximo de 2 horas.

Después de 2-4 horas de alcanzar la Concentración Plasmática Máxima (C_{pmax}), se almacena en líquido sinovial, en donde tiene un tiempo de vida media de 3-6 horas.

Sufre un metabolismo primario en el hígado de cerca del 50% de la dosis ingerida. Además se une ampliamente a proteínas plasmáticas (99%), principalmente a la albúmina sérica humana (94%).

Sus productos metabólicos son principalmente el de hidroxilación que es el derivado "4-hidroxiciclofenaco" y después el de conjugación con el ácido glucurónico.

En cuanto a su excreción, la excreción renal es cerca del 60%, después la excreción biliar con 35%, ambas como metabolitos y por último la excreción inalterada del compuesto con un 5%.

2.1.3.2. Farmacodinámica

El Diclofenaco Sódico, es un potente agente antiinflamatorio, analgésico, antipirético y antirreumático, utilizado frecuentemente en el tratamiento de la artritis reumatoide.

La aplicación antiinflamatoria, se ejerce gracias a que inhibe la acción de la enzima Ciclooxigenasa, la cual se encarga de convertir el ácido araquidónico en prostaglandinas.

Las Prostaglandinas que resultan más inhibidas son la PGE-2 (50%), la PGF (30%), y el Tromboxano TXB-1 (60%), además de reducir las concentraciones intracelulares de araquidonato libre.

Otra propiedad importante del Diclofenaco Sódico es que inhibe parcialmente la agregación plaquetaria.

2.1.4. Toxicología

El Diclofenaco produce efectos adversos en 20% de los pacientes y en promedio, 2% de ellos interrumpen su uso como consecuencia de dicha situación. Los efectos en vías gastrointestinales son los más habituales; se han observado hemorragia, úlcera o perforación de la pared intestinal. En el 15% de los enfermos, hay incremento de las actividades de aminotransferasa hepática en plasma; aunque casi siempre el incremento es moderado, las cifras pueden ser de más de tres tantos en un porcentaje pequeño de pacientes, a menudo los que reciben el fármaco para combatir la osteoartritis. Los

incrementos de la cifra de aminotransferasa suelen ser reversibles y sólo en contadas ocasiones se acompañan de manifestaciones clínicas de hepatopatía. En las primeras ocho semanas de proporcionar Diclofenaco, se tienen que evaluar las actividades de la aminotransferasa e interrumpir el uso del fármaco si persisten cifras anormales o si surgen nuevos signos o síntomas.

Otras respuestas adversas a él incluyen efectos en el sistema nervioso central (SNC), erupciones cutáneas, reacciones alérgicas, retención de líquidos y edema y en ocasiones frecuentes, trastornos de la función renal. No se recomienda usarlo en niños ni en mujeres que amamantan o embarazadas.

2.2. Generalidades sobre Biodisponibilidad y Bioequivalencia (4, 8, 9)

Ya en el siglo VI a. C., Theophrastus observó que la calidad de las sustancias de origen vegetal, empleadas con fines medicinales, estaban en relación con el origen geográfico, variedad, edad y parte de la planta utilizada como remedio.

No obstante, a principios del siglo XIX, el concepto de calidad de un medicamento se limitaba a la identificación físico química de algunas sustancias.

En 1938, a raíz de la muerte de varias personas debida al empleo de dietilenglicol como disolvente para un medicamento de sulfanilamida, se generó en EUA la primera legislación específica sobre seguridad de medicamentos. Años después, otro grave problema, derivado del uso de la talidomida, obligó a la revisión y establecimiento de una nueva legislación respecto a la seguridad y eficacia de los medicamentos.

Actualmente, se han establecido cuatro criterios de calidad que debe cumplir todo medicamento: identificación del principio activo, cuantificación del mismo, pureza de los componentes y seguridad del medicamento; todo lo anterior garantizado durante el periodo útil o fecha de caducidad de los mismos.

Además, debido al gran avance en las disciplinas farmacéuticas aplicadas para el óptimo cuidado de la salud, el objetivo es que todo medicamento, durante su periodo útil conserve su calidad biofarmacéutica, es decir, que sea un medicamento seguro, eficaz y con una biodisponibilidad adecuada, de acuerdo con su acción farmacológica.

Durante años anteriores a la década de los 60, pero particularmente durante ésta, se observaron variaciones en la respuesta clínica a un mismo fármaco, cuando se administraba a través de medicamentos provenientes de dos o más fabricantes distintos. En el inicio de la década de los 70, éste fenómeno de bioinequivalencia clínica fue reconocido por comités y agencias reguladoras en EUA. En 1977 y después en 1981, se publicaron en el Federal Register de EUA los requerimientos de biodisponibilidad y bioequivalencia para medicamentos. Legislaciones semejantes existen a la fecha en Canadá, Francia, Holanda, Bélgica y otros países. En México, ésta legislación ya existe y es la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA-1997.

La biodisponibilidad se define como la velocidad y la medida en que se absorbe el ingrediente activo o la fracción activa de un fármaco y se hace disponible en el sitio de acción. Para los productos farmacéuticos no destinados a ser absorbidos en la corriente sanguínea, se puede evaluar la biodisponibilidad por medio de mediciones indicadas para reflejar la velocidad y la medida en que el ingrediente activo o la fracción activa se hace disponible en el sitio de acción. Esta definición enfoca los procesos por los cuales se liberan los ingredientes activos o las fracciones activas de una formulación farmacéutica oral y se desplazan al sitio de acción.

Desde una perspectiva farmacocinética, los datos de biodisponibilidad para una formulación dada, proveen un cálculo de la fracción relativa de la dosis administrada oralmente absorbida en la circulación sistémica cuando se comparan con los datos de biodisponibilidad para una formulación farmacéutica en solución intravenosa y además, los estudios de biodisponibilidad proveen otra información farmacocinética útil en relación con la distribución, la eliminación, los efectos de los nutrientes en la absorción del fármaco, la proporcionalidad de la dosis, la linealidad farmacocinética de las fracciones activas y donde corresponda, las fracciones inactivas. Los datos de biodisponibilidad también pueden proveer información indirecta acerca de las propiedades del fármaco antes de entrar en la

circulación sistémica, tal como la permeabilidad y la influencia de enzimas y/o transportadores presistémicos. Cuando el concepto de biodisponibilidad se aplica a la concepción y desarrollo de nuevos fármacos y medicamentos, permite una rigurosa selección del fármaco, su forma farmacéutica y vía de administración, para resolver del mejor modo los problemas terapéuticos, en otras palabras llegar a optimizar la farmacoterapia.

Otro aspecto importante relacionado al concepto de biodisponibilidad es el de bioequivalencia, el cual se deriva de lo siguiente: en general, se acepta que la respuesta de los pacientes a un medicamento puede ser variable. Esta variabilidad depende de factores tales como la gravedad de la enfermedad y de la rapidez con que se metaboliza y excreta el fármaco, así como de otros factores farmacocinéticos. Sin embargo, una fuente importante y a menudo inadvertida de variación es la biodisponibilidad del fármaco en la forma medicamentosa usada, es decir, la rapidez y la magnitud de su absorción. Toda variabilidad inadvertida de la absorción del fármaco, puede tener graves consecuencias clínicas. Las diferencias de absorción de los ingredientes medicinales de los productos farmacéuticos procedentes de fuentes o lotes de producción diferentes o preparados en distintas formas medicamentosas también pueden dar lugar a que el paciente reciba una medicación excesiva o insuficiente. El resultado puede ser un fracaso terapéutico o la aparición de efectos adversos graves, especialmente si se trata de medicamentos con correlación muy estrecha entre la intensidad del efecto y la concentración en el plasma y un índice terapéutico bajo.

Así el término "bioequivalente" es aplicado a aquellos equivalentes químicos o farmacéuticos (medicamentos genéricos), que presentan una biodisponibilidad comparable cuando se administran a los mismos individuos, bajo el mismo régimen de dosificación.

Las definiciones de biodisponibilidad y bioequivalencia, expresadas en términos de velocidad y medida de absorción del ingrediente activo o la fracción activa en el sitio de acción, enfatizan el uso de medidas farmacocinéticas en una matriz biológica accesible como la sangre, el plasma y/o el suero para indicar la liberación de la sustancia farmacológica del medicamento en la circulación sistémica. Este enfoque se apoya en el entendimiento de que por lo general no es posible medir la fracción activa o el ingrediente activo en el sitio de acción y además, que existe cierta relación entre la eficacia / inocuidad y la concentración de la fracción activa y/o su metabolito o metabolitos importantes en la circulación sistémica.

Para medir la biodisponibilidad del producto y establecer la bioequivalencia, se podrá considerar la confianza de las mediciones farmacocinéticas como un bioensayo que evalúa la liberación de la sustancia farmacológica del medicamento en la circulación sistémica. Un estudio típico se realiza mediante un estudio de diseño cruzado. En este tipo de estudio, se supone que la eliminación, el volumen de distribución y la absorción, según lo determinado por variables fisiológicas (p.ejm., vaciado gástrico, movilidad, pH) tienen menos variabilidad entre ocasiones, en comparación con la variabilidad que resulta del desempeño de la formulación. Por lo tanto, se puede determinar diferencias entre los dos productos debido a factores de formulación.

2.3. Generalidades sobre Cromatografía (10 – 21)

Pocos métodos aplicados al análisis químico, son realmente específicos para un analito en particular y se torna más complicado cuando el analito de interés tiene que ser separado de una matriz compleja. Una de las herramientas más poderosas y útiles en este tipo de casos es la cromatografía. La cromatografía se define como un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen en dos fases, una de las cuales constituye un lecho estacionario, y la otra un fluido que pasa a través o a lo largo del lecho estacionario (fase móvil).

La palabra cromatografía ("kromatos", color y "graphos", escrito) fue utilizada por vez primera por el botánico ruso M. Tswett en 1906 para designar una técnica empleada por él para separar pigmentos vegetales; hizo pasar por una columna de vidrio, rellena de carbonato cálcico, un extracto de hojas verdes en éter de petróleo, adicionando posteriormente el disolvente puro por la parte superior de la columna obtuvo una serie de bandas horizontales diversamente coloreadas, debido a la diferencia de adsorción por el carbonato cálcico de los colorantes de la planta. Actualmente se sabe que la separación no está condicionada por el color, sin embargo, se sigue utilizando el nombre de cromatografía por motivos históricos. En la separación de pigmentos realizada por Tswett, la fase estacionaria es el relleno de carbonato cálcico, el éter de petróleo es la fase móvil y los pigmentos los componentes a separar que se encuentran sometidos a dos fuerzas contrarias: el disolvente tiende a arrastrar a los componentes hacia la salida de la columna y el carbonato cálcico, adsorbiéndolos, tiende a retenerlos; como estos efectos son de diferente intensidad para los distintos pigmentos, el resultado es que se desplazan a distinta velocidad por la columna, pudiendo llegar a separarse.

En la Tabla 2, se presentan los cuatro principios de separación en la técnica de cromatografía de líquidos, cada principio se presenta de acuerdo al fenómeno que propicie la retención de las moléculas en la fase estacionaria.

Tipo de Cromatografía	Fase Móvil	Fase Estacionaria	Principio de la separación
Líquido / líquido	Líquido	Líquido	Cromatografía de partición
Sólido / líquido	Líquido	Sólido	Cromatografía de adsorción
			Cromatografía de exclusión molecular
			Cromatografía de intercambio iónico

Tabla 2. Clasificación de los principios de separación cromatográficos.

2.3.1. Parámetros Cromatográficos

▪ Distribución del analito entre las fases:

La distribución del analito entre las fases puede ser descrita de una manera muy simple. Un analito está en equilibrio entre las dos fases:



La constante de equilibrio, K , ó coeficiente de partición, se define como la concentración molar del analito en la fase estacionaria dividida entre la concentración molar del analito en la fase móvil.

El tiempo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta que se obtiene la máxima altura del pico que corresponde al analito cuando es detectado al final de la columna es el denominado "Tiempo de Retención" (t_R) y por consiguiente, el volumen de fase móvil necesario para eluir el centro de esa banda cromatográfica se denomina "Volumen de Retención" (V_R). Idealmente, cada analito en una muestra tendrá un tiempo de retención diferente. El tiempo que se requiere para que la fase móvil pase a través de la columna se denomina "Tiempo Muerto" (t_0). Se determina indirectamente considerando el tiempo que tarda en eluir un compuesto no retenido por el sistema cromatográfico. El volumen que la fase móvil ocupa en la columna se denomina "Volumen Muerto" (V_0).

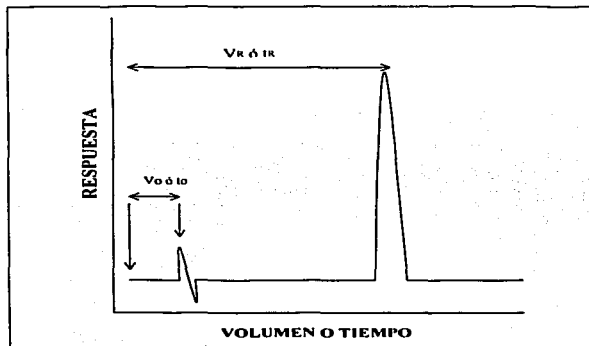


Figura 2. Se muestra de manera esquemática el concepto de tiempo de retención y tiempo muerto.

El término llamado "Factor de Retención o Factor de Capacidad2 (k')", es frecuentemente utilizado para describir la relación entre la cantidad de sustancia en la fase estacionaria y la fase móvil. Está relacionado con el coeficiente de partición del soluto y a diferencia del tiempo de retención, es un parámetro que no se ve influido por cambios en la velocidad de flujo o en el tamaño de la columna. Se calcula de la siguiente manera:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

t_R y t_0 se obtienen fácilmente de un cromatograma. Un valor ideal para k' se encuentra entre 1 y 20. Cuando el factor de capacidad de un analito es menor a uno, significa que su elución es tan rápida que la determinación exacta de este parámetro es muy difícil; en cambio altos factores de capacidad (superiores a 20) implican que la elución toma un tiempo muy largo, y por consecuencia se corre el riesgo de tener picos demasiado anchos en su base y difíciles de detectar, además de tener tiempos de corrida demasiado prolongados.

También se define la "Selectividad o Factor de Separación" (α), la cual describe la separación de dos especies A y B:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

Si el valor de α es 1, las dos especies no se resuelven, si $\alpha > 1$ indica que los dos picos están resueltos.

- *Ancho de Pico y Eficiencia de la Columna.*

Para obtener separaciones óptimas, es fundamental lograr picos cromatográficos agudos y simétricos. Esto significa que el ancho de la banda cromatográfica debe ser lo más angosta posible. De esto se deriva que sea importante medir la eficiencia de la columna. Idealmente, los picos cromatográficos presentan un comportamiento similar a una campana de Gauss, pero en la práctica, la mayoría de los picos presentan alguna desviación a este comportamiento, siendo una de las más comunes lo que se denomina como "Coleo" (T) Hay que puntualizar que cuando el ancho de la base del pico aumenta, indica que mas de un mecanismo de retención se está presentando, lo cual no es deseable. Al igual que otros parámetros cromatográficos, existen diversas maneras de calcular la simetría de un pico y cuando el coleo es mínimo, las diferencias en los resultados son casi imperceptibles.

- *Modelo Cromatográfico del Plato Teórico.*

El modelo del plato teórico, representado en la figura 3, supone que la columna cromatográfica, consiste de un número de capas separadas, llamadas platos teóricos. En estos "platos" ocurren equilibrios independientes de la muestra entre la fase estacionaria y

la fase móvil. El analito se mueve a través de la columna debido a equilibrios de transferencia entre la fase móvil y el próximo plato.

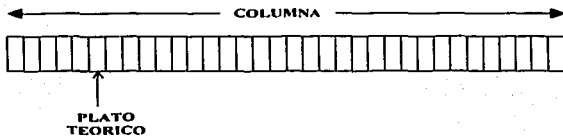


Figura 3. Representación esquemática del plato teórico.

Es importante remarcar que los platos teóricos realmente no existen, sólo son una invención humana que ayuda a comprender el proceso mediante el cual una columna realiza su función de separación. También sirven como una medida de la eficiencia de la columna, mediante el conocimiento de la cantidad de platos teóricos que posee. El número de platos teóricos es representado por la letra N , y evidentemente es deseable un mayor número de platos teóricos ya que la separación es más eficiente.

También se define la "Altura Equivalente del Plato Teórico o HEPT" (H), a medida que este parámetro es más pequeño, existe un mayor número de platos teóricos en la columna. Si la longitud de la columna es L , entonces la altura equivalente del plato teórico es:

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

El número de platos teóricos de una columna puede ser calculado mediante diversas expresiones matemáticas, sin embargo la siguiente expresión evita el riesgo asociado al momento de dibujar las tangentes para la determinación del ancho en la base del pico:

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

Donde $W_{1/2}$ es la distancia que se mide entre las líneas del pico a una altura del 50% del máximo.

Como se puede deducir de la explicación anterior, el desempeño de las columnas está directamente relacionado con el número de platos teóricos, es decir entre menor sea la altura del plato teórico, mayor será el número de ellos y por lo tanto la eficiencia será mayor.

▪ *Teoría de las Velocidades de la Cromatografía y Ecuación de Van Deemter:*

Una descripción más real del proceso de separación dentro de la columna, considera el tiempo tomado por el analito en los equilibrios que tiene entre la fase estacionaria y la fase móvil. La forma de la banda que resulta de un pico cromatográfico es afectada por la velocidad de elución. También es afectada por las distintas rutas disponibles por las cuales las moléculas de soluto pueden desplazarse dentro y entre las partículas que conforman la fase estacionaria.

Si consideramos los distintos mecanismos que contribuyen al ensanchamiento de la banda cromatográfica, necesariamente llegamos a la ecuación de Van Deemter que se refiere a la altura del plato teórico (H):

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Donde "u" es la velocidad lineal promedio de la fase móvil. "A, B y C" son factores que contribuyen al ensanchamiento de la banda:

A. Difusión de remolino:

La fase móvil se desplaza a través de la columna, la cual está empacada con la fase estacionaria. Las moléculas de soluto tomarán distintas trayectorias (de manera aleatoria) a través de la fase estacionaria. Esto tiene como consecuencia que la banda se ensanche debido a que las distintas trayectorias son de diferente longitud. Este parámetro está directamente relacionado con el tamaño de las partículas, la geometría y lo compacto del empaque de la fase estacionaria.

B. Difusión Longitudinal:

La concentración del analito es menor al final de la banda que en el centro y esto se debe a que las moléculas del analito tienden a migrar desde la porción central concentrada de la banda a las regiones más diluidas a ambos lados de ella. Este fenómeno ocurre tanto en la fase móvil como en la estacionaria, y su magnitud aumenta con la velocidad de la fase móvil, es decir, si la velocidad de la fase móvil es alta, los efectos de la difusión longitudinal decrecen.

C. Resistencia a la transferencia de masa:

Al analito le toma un cierto tiempo alcanzar el equilibrio entre las fases, si la velocidad de la fase móvil es alta no se logran verdaderos estados de equilibrio y el soluto que está relativamente distante de la fase estacionaria, tenderá a desplazarse más rápido, lo que contribuye a que la banda cromatográfica se ensanche, sobre todo cuando la velocidad de la fase móvil es alta.

Con la ecuación de Van Deemter se obtiene la gráfica mostrada en la Figura 4, que relaciona la altura del plato teórico (H) con el promedio de la velocidad lineal de la fase móvil.

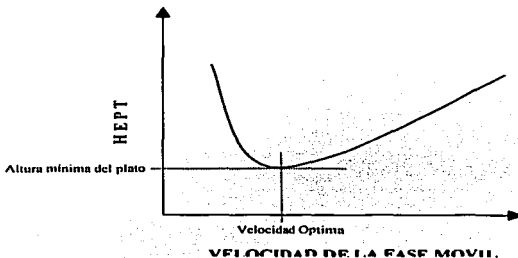


Figura 4. Gráfico típico de Van Deemter.

Este gráfico es sumamente útil en la determinación de la velocidad óptima de la fase móvil.

- **Resolución.**

Aunque la selectividad α describe la separación de los centros de las bandas cromatográficas, no considera el ancho de las mismas. Otra medida de qué tan eficiente ha sido la separación entre las especies es el parámetro que se denomina "Resolución" (R). La resolución de dos especies, A y B está definida por la siguiente expresión:

$$R = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

Normalmente en la mayoría de las separaciones cromatográficas, una resolución adecuada se con valores de $R > 1.5$.

Los parámetros hasta ahora revisados como la resolución, el número de platos teóricos, la selectividad y el factor de capacidad pueden ser relacionados de una manera sencilla mediante la siguiente expresión matemática:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)$$

Para obtener alta resolución, los tres parámetros deben ser maximizados. Un incremento en N, el número de platos teóricos, mediante el empleo de una columna de longitud mayor, también provoca un incremento en el tiempo de retención, y por consecuencia la banda se ensancha, lo cual no es deseable. En lugar de incrementar de esta manera el número de platos teóricos, la altura equivalente de un plato teórico (H) puede ser reducido mediante el empleo de columnas cuya fase estacionaria tenga un tamaño de partícula menor.

Es frecuente que controlando el factor de capacidad k' , las separaciones mejoren notablemente. Este objetivo puede ser alcanzado cambiando la composición ya sea de la fase móvil o estacionaria o ambas.

La selectividad puede ser manipulada para mejorar las separaciones. Cuando su valor se encuentra cercano a la unidad, la optimización de k' y el incremento de N no es suficiente para proporcionar separaciones adecuadas en un tiempo razonable. En los casos en que k' es optimizado en primera instancia, la selectividad puede ser incrementada mediante alguno de los siguientes procedimientos:

- Cambiar la composición de la fase móvil.
- Cambiar la composición de la fase estacionaria.
- Cambiar la temperatura de la columna, lo cual solo provoca cambios en el tiempo de retención, sobre todo en el caso de analitos iónicos, en los que la temperatura influye en sus características de ionización, en sus interacciones con grupos silanoles y en su pKa.
- Adición de modificadores orgánicos.
- Implementar reacciones de derivatización (como la incorporación de especies que complejen con el analito.)

Los conceptos antes revisados son los más empleados en cromatografía porque describen como es que ocurre el proceso de separación y las condiciones que pueden ser manipuladas para obtener separaciones óptimas y con tiempos de elución mínimos.

2.3.2. Equipo Utilizado en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

De manera general el equipo básico que se necesita para implementar métodos analíticos por cromatografía de líquidos de alta resolución es el siguiente:

+ *Reservorio para fase móvil.*

Debe tener las características adecuadas de tal manera que no interactúe químicamente con las fases móviles las cuales son generalmente mezclas de disolventes acuosos y orgánicos.

+ *Bomba.*

El sistema de bombeo constituye una parte fundamental para el cromatógrafo de líquidos y sus características de operación afectan directamente el resultado del análisis. Las bombas deben de estar construidas de un material no absorbivo (que no absorban los compuestos con los que está en contacto), no aditivo (que no desprenda componentes), y no reactivo (que no reaccione al estar en contacto con los componentes de la muestra y de la fase móvil).

Las bombas se pueden clasificarse en cuatro grupos : no reciprocantes y reciprocantes de una, dos y tres cabezas. Actualmente, cerca del 90 % de los sistemas de bombeo empleados son del tipo reciprocante, ya que con ellas se pueden alcanzar de una manera segura presiones de hasta 5000 psi, por lo tanto el material del cual está constituida la bomba debe ser muy resistente.

Otro aspecto a considerar son los sistemas de gradiente, para los cuales, las bombas se dividen en dos grupos, dependiendo de la forma en que se lleva a cabo la mezcla de los disolventes. El primer grupo se denomina de baja presión, ya que los disolventes se mezclan a una velocidad dada a una baja presión, para luego ser bombeados a la columna a una presión más elevada; el segundo grupo se denomina de alta presión ya que los disolventes son bombeados por separado a altas presiones para luego ser mezclados.

+ *Inyector.*

El sistema de introducción de la muestra debe de ser reproducible y preciso, debe de contribuir lo menos posible al ensanchamiento de las bandas cromatográficas, debe de operar a altas presiones y debe de ser químicamente inerte tanto con la fase móvil como con la muestra.

Hasta hace poco tiempo, los sistemas de introducción de la muestra se clasificaban en dos grupos: inyectores de jeringa y válvulas muestreadoras, actualmente ya no es posible separar de esta manera los sistemas de introducción de muestra ya que las válvulas más recientes hacen uso de jeringas para determinar de manera precisa el volumen de muestra a inyectar.

+ *Columna.*

Es el espacio físico donde se produce la separación, debe ser físicamente resistente y químicamente estable. Mas adelante se tratarán con mayor detalle las características acerca de las columnas empleadas en CLAR.

+ *Detector.*

El detector para un equipo de CLAR es el componente que emite una respuesta como resultado de la elución de la muestra. Existen básicamente dos tipos de detectores:

- Detectores sensibles a la concentración del soluto: La señal es proporcional a la concentración del soluto en el eluyente e independiente de la velocidad de flujo de la masa del soluto a través del detector. La señal detectada se manifiesta como un pico cromatográfico debajo del cual se mide una cierta área integrada, esta área es proporcional al tamaño de la muestra inyectada y es inversamente proporcional a la velocidad de flujo de la fase móvil. El ancho y la altura del pico, usualmente pueden ser ajustados mediante el correcto empleo de los controles de los parámetros de sensibilidad. Dentro de este grupo existen varios tipos de detectores, algunos de los más comunes son: índice de refracción, ultravioleta, fluorescencia, radioquímicos, infrarrojo. En lo que se refiere a la detección ultravioleta se puede asegurar que es el método de detección más empleado. Para emplear este detector, se requiere que el analito tenga la capacidad de absorber luz ultravioleta. El detector de éste tipo puede tener la capacidad de funcionar a una o a varias longitudes de onda:

- Detector de onda fija. Mide solamente a una longitud de onda, dependiendo del filtro que tenga, los filtros se pueden adquirir comercialmente para distintas longitudes de onda.
 - Detector de longitud de onda variable. Puede ajustarse para medir a distintas longitudes de onda.
 - Detector de arreglo de fotodiodos. Con este tipo de detector es posible obtener cromatogramas leídos a cualquier longitud de onda normalmente dentro del espectro UV-Visible.
- Detectores sensible a la velocidad del flujo de masa del soluto hacia el detector: En este caso, la señal registrada es el producto de la concentración del soluto por la velocidad de flujo de la fase móvil, es decir, si la velocidad de flujo es cero, la señal será nula, sin importar la concentración del soluto. El área del pico es independiente de la velocidad de flujo. Ejemplos de este tipo de detectores son los detectores electroquímicos y los espectrómetros de masas.

Además del equipo antes mencionado, existe equipo adicional que se emplea algunas veces para mecanizar el tratamiento de la muestra o para mejorar la separación, como es el caso de los módulos de temperatura o de las válvulas intercambiadoras de flujo, sobre las que se profundizará más adelante.

Como se había dicho anteriormente, la columna cromatográfica representa el sitio en donde se lleva a cabo la separación, por lo tanto juega un papel importante en el desarrollo de sistemas cromatográfico, de ahí que la elección de sus características debe de ser la adecuada.

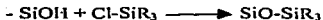
Vistas de una manera muy simple, las columnas empleadas en CLAR son tubos de acero inoxidable (la mayoría de las veces) en los cuales se encuentra empacado un soporte que puede ser de naturaleza inorgánica como es el caso de la sílica o de naturaleza orgánica como es el caso de los empaques poliméricos. Cada tipo de empaque posee sus ventajas pero de igual manera presenta ciertas desventajas que deben de considerarse al momento de la elección del tipo de empaque.

La calidad de las fases estacionarias empleadas en Cromatografía de Líquidos de Alta resolución (CLAR) es determinada por sus propiedades físicas y químicas. Las propiedades físicas como la porosidad, área superficial específica, tamaño de poro, tamaño y forma de partícula son las que inciden directamente en la eficiencia del empaque. Las propiedades químicas, que evidentemente dependen de la naturaleza de la fase estacionaria en cuestión también dependen de los grupos unidos químicamente al soporte utilizado y son la base de las propiedades de retención y selectividad.

Durante las últimas tres décadas se han estudiado diferentes materiales que eventualmente puedan emplearse como empaques, entre los más importantes se encuentran óxidos inorgánicos y polímeros orgánicos.

Los empaques clásicos empleados en CLAR son los basados en soportes de sílica. Los materiales de este tipo pueden ser sintetizados a través de distintos procesos. Uno de estos procesos parte de la síntesis de un hidrogel, el cual es obtenido de silicatos inorgánicos o alcoxi silanos. De estos hidrogeles, el más común es el xerogel que es obtenido después de una molienda y posterior tamización de partículas irregulares de sílica. Otro grupo de procesos sintéticos proporcionan formas de partículas esféricas.

Para cambiar la polaridad de este tipo de fases estacionarias, es común que se ligen químicamente mediante enlaces covalentes cadenas hidrocarbonadas a los grupos silanoles de la sílica. El soporte de sílice se hace reaccionar con organoclorosilano, o algún compuesto similar para generar una fase estacionaria de la polaridad deseada.



Sin embargo, no todos ellos logran reaccionar, por lo que la actividad de los silanoles residuales puede ser importante. Para suprimir este inconveniente, se implementa un paso de síntesis secundario que se denomina de sello terminal que permite enmascarar a los silanoles residuales. El bloqueo de silanoles residuales (capa de sello terminal o "end capping") se emplea en la cromatografía en fase reversa, particularmente cuando el soporte es sílica. Este bloqueo permite mejorar de manera importante la forma del pico, ya que se impiden equilibrios secundarios entre los silanoles libres y compuestos básicos principalmente. Además provoca que se amplíe el intervalo de pH en el cual la fase estacionaria es estable, debido a que queda protegido el sitio de unión de la cadena hidrocarbonada con el soporte de sílica de sustancias que tienen propiedades ácido-base.

En general, estos empaques son mecánicamente fuertes, ya que pueden soportar presiones de hasta 6000 psi, además otro factor importante que favoreció su crecimiento es el hecho de que se pueden diseñar superficies con muy diversos comportamientos químicos entre el analito y la fase estacionaria. Estas capas de la superficie de la sílica son muy delgadas, casi del orden de capas monomoleculares, lo que permite una rápida transferencia de masa entre la fase estacionaria y el analito. Generalmente, los empaques empleados en CLAR son porosos para maximizar la superficie de contacto con el analito. En los últimos años, ha aumentado el entendimiento de la tecnología empleada para manipular el tamaño y volumen del poro, así como el área superficial.

Sin embargo los empaques basados en sílica tienen una desventaja muy grande que es la disolución de la sílica en valores de pH alcalinos, la mayoría de las columnas de soporte de sílica soportan hasta un pH de 9. El tiempo que tarde en disolverse la sílica hasta volver inútil la columna dependerá de otros factores como son la proporción del modificador orgánico y la temperatura de trabajo, entendiéndose que a menor proporción de modificador orgánico así como a mayor temperatura, el grado de disolución de la sílica será mayor.

Otros óxidos inorgánicos utilizados son los de Aluminio, Titanio y Zirconio, los cuales tienen mejores propiedades de dureza y de transferencia de masa que las sílicas, y también son más estables a pH's extremos, desde 0 hasta 13. Estas características han propiciado que sean seriamente considerados como alternativas para de fases estacionarias. Sin embargo, su alta actividad superficial favorece el establecimiento de equilibrios secundarios que finalmente tienen como consecuencia señales cromatográficas distorsionadas. Por otra parte, se carece de procedimientos para ligarlos químicamente con otros grupos y poder cambiar su polaridad. Esto hace que se emplee se vea ampliamente reducido. Para salvar estos inconvenientes, se están buscando alternativas para recubrir a los óxidos en lugar de unirlos químicamente con los ligandos deseados.

Por el contrario, existe otro tipo de empaques llamados poliméricos. La gran mayoría de las actuales fases estacionarias poliméricas están hechas a base de empaques de estireno-divinilbenceno, metacrilato o polivinilalcohol. Estos materiales pueden ser manufacturados en un amplio intervalo de porosidades y tamaños de partícula, los cuales

son comparables con los de las fases estacionarias de sílica. Una de las causas que llevaron a la implementación de este tipo de fases estacionarias fue la necesidad de trabajar en intervalos amplios de pH, y es que éstos materiales, son resistentes a las hidrólisis ácido-base. Los empaques de divinilbenceno son estables desde pH 0 a 14. Adicionalmente estos materiales son susceptibles de ser modificados químicamente y con ello proporcionar fases estacionarias con una amplia variedad de polaridades. Por ejemplo, las fases de estireno-divinilbenceno son muy hidrofóbicas, por lo que su uso en la cromatografía de fase reversa es adecuado; pero dado que el anillo bencénico puede reaccionar, se pueden adicionar grupos químicos y de ésta manera cambiar la polaridad. El metacrilato se utiliza fundamentalmente en la cromatografía de exclusión molecular, sin embargo, también puede modificarse y ser empleado en cromatografía de fase reversa.

A pesar de las ventajas mencionadas, estos polímeros presentan las siguientes desventajas importantes: presenta baja resistencia a la presión comparada con la de las fases estacionarias de óxidos inorgánicos, lo cual limita su uso por las altas presiones generadas en la cromatografía de líquidos de alta resolución. Debido a la estructura de los poros, la transferencia de masa no es adecuada, es entorpecida. Las partículas de estos materiales son elásticas, es decir, se dilatan y se contraen, el grado de éste efecto depende de la composición de la fase móvil. Esta situación es la responsable de una significativa menor eficiencia de estos empaques comparados con los óxidos inorgánicos.

2.3.3. Cromatografía Bidimensional (Column Switching)

La preparación de muestras biológicas para ser analizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución, típicamente se lleva a cabo mediante extracción en fase sólida o extracción líquido-líquido. Frecuentemente estas técnicas son laboriosas y susceptibles a muchos errores experimentales.

Ante esta situación, actualmente una herramienta de mucha utilidad es el empleo de la cromatografía bidimensional. En esta técnica, prácticamente, la muestra puede ser inyectada directamente o con un mínimo de tratamiento previo.

La cromatografía bidimensional hace uso de dos o más columnas acopladas para conseguir separaciones no alcanzables con un único sistema. Se define esta técnica como un proceso de separación en el que una muestra es sometida a una secuencia de separaciones, cada una de las cuales actúa sobre todos o parte de los componentes separados en una etapa previa cromatográfica, que difieren en su selectividad relativa y/o capacidad. En las técnicas cromatográficas acopladas se efectúa una preseparación de la muestra en una primera columna cromatográfica; posteriormente, una parte muy pequeña de la muestra conteniendo los analitos se transfiere "on-line" por medio de una interfase hacia la segunda columna cromatográfica en la que tiene lugar la separación de los mismos. Las técnicas cromatográficas acopladas se encuentran entre las técnicas más sensibles y selectivas disponibles. Las más utilizadas en la actualidad son la cromatografía líquida acoplada a cromatografía líquida (CL-CL) también denominada CL con "column switching".

Los procedimientos cromatográficos con columnas acopladas consisten generalmente en cuatro etapas:

- Introducción de un volumen de muestra relativamente grande en la primera columna del sistema, mejorando, de este modo, la sensibilidad global del procedimiento analítico. En combinación con una apropiada compresión de pico durante la etapa de transferencia (tercera etapa) los volúmenes de inyección pueden aumentarse desde microlitros hasta mililitros, pudiendo mejorar la sensibilidad en varios órdenes de magnitud.
- Preseparación de una gran parte de los interferentes de la muestra de los analitos de interés en la primera columna, mejorando la selectividad del procedimiento al descartar la mayor parte de los interferentes. Para mejorar lo más posible la selectividad es importante que el mecanismo de separación de ambas columnas difiera considerablemente. Esto se puede conseguir fácilmente acoplando CL con CG, pero es menos obvio en acoplamiento CL-CL.
- Transferencia de la fracción de interés a la segunda parte del sistema de separación por medio de una técnica de compresión de pico, de modo que aumente tanto la selectividad, minimizando el volumen de transferencia, como la sensibilidad, mejorando la forma del pico cromatográfico.
- Análisis de la muestra transferida a la segunda columna realizándose una separación y detección convencional de los analitos de interés, después de haber eliminado la mayor parte de los interferentes.

Además de la mejora en selectividad y sensibilidad, las técnicas cromatográficas acopladas permiten integrar la preparación de muestra, la separación y la detección en un único

sistema cromatográfico, ofreciendo un alto grado de automatización para el procedimiento analítico global.

Como se ha comentado anteriormente, una de las características importantes de la CL es la capacidad de aplicar la técnicas de columnas acopladas ("column-switching"), que ofrece la posibilidad de integrar la preparación de la muestra y la purificación de la misma en el procedimiento cromatográfico. Cualquier procedimiento de acoplamiento CL-CL se encuentra diferenciado en cuatro etapas:

1) **Inyección.** Durante esta etapa se toma la muestra y se carga en el "loop" del inyector, mientras la fase móvil M-1 circula por la columna C-1, y la fase móvil M-2 por C-2. Se activa la válvula del inyector y comienza el análisis, pasando a la etapa de purificación.

2) **Purificación.** Durante esta etapa se realiza una purificación de la muestra o extracto con un cierto volumen de fase móvil M-1; los interferentes menos retenidos (I1) se eliminan a los desechos. Cuando el primer analito comienza a eluir de la columna C-1, se activa la válvula que actúa como interfase entre los dos sistemas CL, finalizando la etapa de purificación y comenzando la transferencia.

3) **Transferencia.** La primera columna se coloca en línea con la segunda, y se utiliza un cierto volumen de fase móvil M-2 para eluir de la columna C-1 hacia la C-2 la fracción que contiene los compuestos de interés (A). Cuando el último analito ya ha sido transferido desde C-1 a C-2, se activa nuevamente la válvula, finalizando la transferencia.

4) **Análisis y lavado.** Durante esta etapa la fracción transferida desde C-1 a C-2 se separa mediante la fase móvil M-2, siguiendo una CL convencional. Simultáneamente, la primera columna (C-1) vuelve a ser eluida por la fase móvil M-1 que eliminará las interferencias que muestren mayor retención (de cola). Si la fase móvil no es capaz de eluirlos completamente mientras tiene lugar la separación en C-2, se puede lavar la primera columna con un eluyente más fuerte, como metanol, acetonitrilo. etc., reacondicionándola posteriormente con M-1, antes de la próxima inyección.

Estrategia para implementar el acoplamiento CL-CL.

1. Selección de la configuración del switching.

Los dos parámetros más importantes que se han de optimizar en un procedimiento de acoplamiento CL-CL son:

- a) La selección de la primera columna separadora (C-1).
- b) La fuerza eluotrópica de la fase móvil utilizada en la purificación (M-1).

Como ya se ha indicado, la elección de la fase móvil 1 (M-1) es crucial. Se debe llegar a una situación de compromiso, ya que por un lado, una fase móvil M-1 con una fuerza eluotrópica baja permitiría la inyección de volúmenes mayores de muestras acuosas sin un apreciable ensanchamiento de bandas, aunque restringiría la eliminación eficaz de las interferencias poco retenidas (I1). Mientras que, por otro lado, una fase móvil M-1 con una elevada fuerza eluotrópica mejoraría la resolución entre I1 y la fracción de analitos (A), pero disminuiría el tiempo de purificación. La mejora en la selectividad al emplear una fase móvil M-1, con una correcta fuerza eluotrópica para mejorar la etapa de purificación se ha demostrado en varias aplicaciones.

Después de la elección de la columna C-1 y de la composición de la fase móvil M-1, las condiciones finales del acoplamiento CL-CL se pueden determinar fácilmente mediante dos experiencias:

a) Determinación del volumen de purificación. Este valor se puede determinar conectando directamente al detector la primera columna separadora (C-1) e inyectando el compuesto de interés que presente una menor retención con la fase móvil M-1 (A0). El volumen de ruptura que presente este analito en estas condiciones determinará el volumen máximo de purificación a aplicar en el método. Este volumen de purificación debe verificarse rutinariamente para asegurarse de que se realiza la purificación de modo correcto, sin pérdidas del analito A0.

b) Determinación del volumen de transferencia. Este valor se determina conectando directamente al detector la primera columna separadora (C-1) e inyectando el analito que presente una mayor retención (An), pero siendo eluido con la fase móvil M-2 que es la que realiza la transferencia. El volumen de ruptura que posca este analito en estas condiciones fijará el volumen máximo de transferencia a utilizar. Este volumen de transferencia, también debe verificarse rutinariamente para que la transferencia se realice de modo correcto, sin pérdidas del analito An. Además, como ya se ha comentado anteriormente, interesa que esta fracción transferida desde C-1 hacia C-2 tenga el menor volumen posible, para minimizar el ensanchamiento de bandas y aumentar la sensibilidad.

2. *Elección del medio de Separación.*

De acuerdo con las características de la separación se deben elegir la guardacolumna y columna adecuados.

3. *Preparación de la muestra.*

El fluido biológico en el caso más simple sólo es centrifugado o diluido previo a la inyección.

Ventajas y limitaciones del acoplamiento CL-CL.

Las ventajas más importantes del acoplamiento CL-CL ya se han comentado en puntos anteriores, y se pueden resumir como mejora de selectividad, aumento de sensibilidad y posibilidad de automatización, lo que hace que esta técnica tenga un gran futuro. Su mayor campo de aplicación se encuentra en el análisis de compuestos "difíciles" como son compuestos polares en muestras acuosas en las que resulta difícil o tedioso su aislamiento (preconcentración). Además, mediante la adecuada optimización de las condiciones se pueden llegar a inyectar grandes volúmenes de muestra si el analito presenta una buena retención sobre C-1 y cluye sin ensanchamiento de bandas. Por consiguiente, otra ventaja adicional que presenta la CL de columnas acopladas es su gran capacidad de análisis, pudiéndose analizar un elevado número de muestras por día (*sample throughput*), ya que en la mayoría de los casos el pretratamiento es mínimo y el análisis por CL muy rápido.

Por otro lado, una importante función adicional que realiza el acoplamiento CL-CL es la protección de la columna separadora principal en aquellos casos donde se tienen matrices complejas. Para el análisis de muestras o extractos más limpios, con los que no se esperan problemas de obturación o de selectividad, se podría pensar en eliminar el acoplamiento CL-CL, sin embargo, en muchos casos el uso del mismo es beneficioso al

reducir el tiempo total de análisis, ya que ningún pico interferente que eluya muy tarde (12) se transfiere a la segunda columna separadora.

En cuanto a las limitaciones, cabe citar que, en comparación con los procedimientos "off-line", se debe realizar una inversión en equipamiento y se requiere destreza y práctica habitual en procedimientos de CL para diseñar y aplicar el acoplamiento CL-CL. Probablemente es ésta la razón por la que todavía no se utiliza ampliamente esta técnica.

En segundo lugar, la primera columna debe ser muy estable, ya que la inyección de extractos de muestra sin purificar combinados con continuas aplicaciones de disolventes de baja y elevada fuerza eluotrópica afecta su vida media. Para la mayoría de las aplicaciones, es posible utilizar durante una semana continuamente la misma columna sin apreciar una disminución de la selectividad, antes de someterla a una limpieza rutinaria.

Otro aspecto a tener en cuenta es la necesidad de realizar una comprobación, más o menos diaria, de los volúmenes de purificación y transferencia antes de procesar una nueva serie de muestras ya que, aunque los rellenos se fabriquen con la más alta tecnología, siempre existe una pequeña variación en la retención, observable a lo largo de un cierto período de utilización.

Conclusiones.

- Esta técnica se puede aplicar a una gran variedad de moléculas de gran utilidad, sobre todo por el alto grado de automatización del tratamiento de la muestra y porque el tiempo de análisis disminuye considerablemente.
- Existen menores posibilidades de pérdida de la muestra o de eventual riesgo ante la manipulación de la muestra, pues fundamentalmente se lleva a cabo en un sistema cerrado.
- Implica una limpieza en línea que esencialmente es una extracción en fase sólida integrada al sistema CLAR.
- Se aplica cuando el analito se encuentra en una muestra químicamente compleja o en una matriz biológica.
- Permite enviar el analito de interés a la columna analítica libre de solutos que interfieran con el análisis o afecten la integridad de la columna y el detector.
- Permite el análisis automatizado rápido, robusto, sensible, selectivo, exacto y preciso de muestras complejas.

2.4. Extracción en Fluidos Biológicos

2.4.1. Generalidades

Como se había dicho anteriormente, los fluidos biológicos no son una mezcla simple sino compleja en todos los sentidos, ya que contienen una multitud de componentes que interactúan con el compuesto de interés y alteran su comportamiento.

Los fluidos biológicos que comúnmente son analizados con la sangre total, el plasma (o suero) y la orina, por el contrario, los fluidos en los que raramente se requiere un análisis son la bilis, saliva, leche materna, etc.

El mayor problema consiste en separar el fármaco de la mayor cantidad posible de material endógeno. Para esto, se han diseñado diversas técnicas como la sonicación, el tratamiento químico, etc, sin embargo se debe tener cuidado en el tratamiento a elegir ya que pueden originar diversos problemas como el hecho de cambiar la concentración del fármaco en la muestra o dar lugar a la formación de emulsiones o coagulaciones que dificultan el tratamiento de la muestra.

De cualquier manera debe existir un medio en el cual se desarrolle el pretratamiento de la muestra y la elección de la naturaleza de éste se vuelve crítica; en la tabla 3 se encuentra una descripción general de las ventajas y desventajas de algunas de las soluciones acuosas más empleadas en el pretratamiento de fluidos biológicos.

Soluciones	Ventajas	Desventajas
Agua Destilada	Relativamente buen solvente No destruye tejidos pH final cercano a 7.0	Grado de ionización variado No hay desnaturalización consistente de enzimas El pH final puede variar dependiendo del tipo de tejido
Ácido diluido (<0.5N)	Relativamente buen solvente Desnaturaliza la mayoría de las enzimas pH final < 7.0 Mínima formación de espuma	Considerable desnaturalización de proteínas Afecta compuestos ácido - sensibles
Ácido fuerte (>0.5N)	Buen solvente Desnaturalización completa Precipitación de proteínas pH final < 4.0	Puede ocurrir agregación de componentes Afecta considerablemente a compuestos ácido - sensibles Los tejidos pueden llegar a deshacerse
Bases diluidas (<0.5N)	Relativamente buen solvente Desnaturaliza la mayoría de las enzimas pH final > 7.0	Considerable desnaturalización de proteínas Afecta compuestos sensibles a bases Puede llegar a ocurrir la saponificación de los lípidos
Bases fuertes (>0.5N)	Relativamente buen solvente Desnaturalización completa Precipitación de proteínas pH final > 10.0	Puede ocurrir agregación de componentes Afecta considerablemente compuestos sensibles a bases Los tejidos pueden llegar a deshacerse Saponificación segura de lípidos

Tabla 3. Características de soluciones acuosas empleadas en el pretratamiento de fluidos biológicos.

Una de las principales características del suero y del plasma es la gran cantidad de proteínas, que si bien son física y químicamente muy diferentes a las moléculas de los fármacos que se desean medir, tienen una gran afinidad por ellas, por lo tanto una remoción de esas proteínas mediante ultrafiltración o diálisis pudiera dar origen a la obtención de recobros del fármaco extremadamente bajos, además una medición del fármaco directamente en la matriz sin haberlo separado de las proteínas, pudiera ser en realidad una medición de la fracción libre y no una medición de la cantidad total del fármaco presente en el fluido; aunque hay que señalar que en estudios microbiológicos la fracción que realmente importa conocer su concentración es la fracción libre, ya que es la que va a realizar la acción terapéutica en contra de los microorganismos.

2.4.2. Precipitación de Proteínas

El primer paso en la preparación de la muestra consiste en la obtención de una solución acuosa teóricamente libre de proteínas y uno de los métodos más simples y de mayor empleo es la precipitación de las proteínas y el aislamiento del filtrado. Al precipitar la proteína ésta se desnaturaliza, por lo tanto el enlace que la mantenía unida al fármaco se destruye y en teoría el fármaco queda libre en solución. Los reactivos ácidos comúnmente empleados para precipitar proteínas son el ácido tricloroacético, ácido perclórico, ácido lúgstico y el ácido clorhídrico, sin embargo se ha demostrado en numerosos experimentos que el empleo de estos ácidos fuertes tiene efectos negativos en el fármaco a ser extraído, la mayoría de las veces porque además de precipitar proteínas, precipita también el fármaco y en el peor de los casos ocurre una degradación del mismo.

Para los fármacos que son inestables a un pH demasiado ácido se tiene la opción del empleo de disolventes orgánicos para desnaturalizar y precipitar proteínas, como es el caso del etanol, metanol y recientemente el acetonitrilo. Desde luego, el volumen de disolvente requerido para que ocurra una precipitación completa varía de un disolvente a otro, sin embargo como regla general se requieren de dos a tres volúmenes del disolvente por cada volumen de plasma o suero.

Otro método que últimamente ha adquirido un mayor uso es la desnaturalización de las proteínas empleando enzimas proteolíticas por ejemplo la enzima subtilisina, tripsina y papaína, la mayor ventaja de emplear este tipo de enzimas es que solo van a reconocer y a desnaturalizar moléculas con una estructura proteica, sin embargo las aplicaciones de esta técnica son hasta este momento un poco limitadas.

Aunque el plasma es un fluido muy complejo, puede ser alentador el hecho de que su composición es notablemente estable y con muy pocos cambios aún entre sujetos, además de que su pH siempre se encuentra entre 7.30 y 7.50 y las concentraciones de sales y de proteínas totales se encuentran controladas. Por otro lado, uno de los componentes cuya concentración y naturaleza puede variar considerablemente son los lípidos, ya que su concentración se ve ampliamente influenciada por la frecuencia y naturaleza de la dieta. En el caso de tratar con muestras plasmáticas con un elevado contenido de lípidos se requerirá el empleo de un paso de partición específico previo para removerlos.

Otro aspecto que se debe de considerar es el hecho de que la presencia de otros fármacos puede alterar significativamente las concentraciones plasmáticas del fármaco de interés.

En la tabla 4 se presentan los diversos métodos para la separación de las proteínas de los fluidos así como un comentario acerca de sus ventajas y sus desventajas.

Método	Eficiencia	Comentario
Calentamiento a 90 °C durante 5 – 15 min.	Limitada	Puede provocar la descomposición del analito.
Ciclos de congelación – descongelación	Limitada	Tiempo requerido muy elevado.
Saturación con sulfato de amonio (<i>salting out</i>)	Moderada	Sobrenadante con alta concentración de sales, pH final cercano a 7.0
Sulfato de Zinc / NaOH	Excelente	Precipitado fino con pH final cercano a 7.0, mejora la eficiencia si se realiza a bajas temperaturas.
Ácido metafosfórico	Excelente	El reactivo necesita ser mantenido a bajas temperaturas, pH final < 3.0 puede descomponer el analito.
Ácido Perclórico	Excelente	El reactivo necesita ser mantenido a bajas temperaturas, pH final < 3.0 puede descomponer el analito. La mayoría de los analitos básicos se extraen muy bien.
Ácido tricloroacético	Buena	El reactivo necesita ser mantenido a bajas temperaturas, pH final < 3.0 puede descomponer el analito, puede presentarse dificultad para separar el reactivo del analito.
Etanol – Metanol	----	Se requieren dos volúmenes del disolvente por cada volumen de fluido. Recomendable si el analito es ácido – sensible.
Acetonitrilo	----	Se requieren 1.5 volúmenes del disolvente por cada volumen de fluido. Recomendable si el analito es ácido – sensible. Precipitado pastoso minimiza la coprecipitación del analito
Cloruro de Aluminio	----	Mejor eficiente que el sulfato de amonio o ácido tungstico para compuestos básicos.

Tabla 4. Métodos empleados para desnaturizar proteínas séricas y plasmáticas.

2.4.3. Extracción Líquido – Líquido

Una técnica alternativa, para cuando no se quiere seguir la filosofía de la desnaturización de proteínas previamente a la extracción con disolventes orgánicos, es la extracción líquido – líquido. Aunque el fármaco a extraer tenga una alta afinidad por las proteínas plasmáticas, el enlace que lo une a ellas es de carácter reversible, por lo tanto, ubicando el medio de extracción a un pH adecuado, el fármaco puede ser extraído mediante disolventes orgánicos. Lo que se debe buscar en este caso es que la partición del fármaco, en su forma no ionizada hacia la fase orgánica, sea lo suficientemente alta para revertir el enlace del fármaco con las proteínas y así lograr extracciones eficientes. La estrategia a seguir es en primer lugar encontrar la solución amortiguadora adecuada para mantener el pH estable a lo largo de la extracción; en segundo lugar, encontrar el disolvente orgánico

apropiado que sea inmisible con la fase acuosa, en este caso el plasma, y en el cual el fármaco sea soluble; en tercer lugar se debe procurar mezclar un volumen de la solución amortiguadora por cada volumen de muestra y de dos a tres volúmenes del disolvente por cada volumen de muestra. Para llevar a cabo la extracción, se añade el disolvente extractor a la muestra acuosa, normalmente esto se lleva a cabo en un embudo de separación, el embudo se tapa y se agita vigorosamente para crear una emulsión momentánea. Esta emulsión consiste en diminutas gotas esféricas del líquido extractor suspendidas en la fase acuosa. El contacto entre las fases debe de ser grande para promover una rápida transferencia de masa del soluto a extraer de la fase acuosa a la fase orgánica.

El rendimiento de la extracción está directamente relacionado con el coeficiente de partición del compuesto de interés entre las dos fases, de ahí la importancia de elegir adecuadamente la solución amortiguadora y el disolvente de extracción; en la mayoría de los casos, el coeficiente de partición es dependiente del pH por lo que algunas veces es conveniente trazar graficas del coeficiente de partición vs. pH . Desde luego que existen compuestos que a cualquier pH su extracción se vuelve difícil. sobretodo los que son de carácter muy polar o de carácter anfótero; en estos casos, puede ser recomendable reducir el volumen de la muestra, o someterla a un ciclo de congelación-descongelación, otras soluciones consisten en saturar la extracción con una sal como NaCl o Na₂SO₄ anhidro y en otros casos es recomendable el empleo de diversos pasos de extracción con diferentes mezclas de disolventes.

Una variante importante de esta técnica es el empleo de "reactivos de par iónico", que al igual que en la Cromatografía de Par Iónico, se forma un complejo neutro y fácil de extraer con disolventes orgánicos. La ecuación que representa de manera sencilla esta técnica es la siguiente:



Sin embargo, la extracción líquido – líquido tiene sus desventajas, ya que para optimizar el rendimiento, el volumen del disolvente de extracción en ocasiones debe de ser bastante grande, lo que origina volúmenes que algunas veces son difíciles de manipular, además, se originan enormes volúmenes de desechos y largos tiempos de evaporación, sin mencionar que cuando el objetivo es el análisis de trazas, se corre el riesgo de que el fármaco quede adherido en las paredes del material.

2.1.4. Extracción en Fase Sólida

En los últimos años, los laboratorios analíticos cada vez se ven más preocupados por el hecho de proveer análisis mas rápidos y a un menor costo. Este aspecto recae sobre todo en la preparación de la muestra la cual, ocupa mas del 60% del tiempo del análisis, en comparación con el 7% que ocupa en realidad la medición de sus componentes.

En el pasado, la extracción líquido – líquido ocupó un papel importante en la limpieza de los fluidos biológicos y en la concentración de los analitos a medir. Sin embargo, el recobro de los analitos tiende a ser incompleto y la técnica en si tiende a ser lenta y laboriosa. Por estas razones, el uso y la popularidad de la extracción en fase sólida o EFS, (SPE, Solid Phase Extraction) ha ido creciendo rápidamente.

La EFS puede usarse de dos maneras en la preparación de muestras.

- En la primera, los analitos de interés se retienen en el material de relleno, y la muestra con la mayoría de los componentes no deseados, pasan por el relleno sin ser retenidos; los componentes no deseados retenidos en el relleno son eliminados selectivamente, mientras que los analitos de interés son eluidos con un pequeño volumen del disolvente apropiado.
- En la segunda manera, la muestra pasa por el medio de separación para la EFS y los analitos de interés pasan por el adsorbente, sin ser retenidos. Los contaminantes se quedan en el relleno y pueden ser desechados.

La segunda estrategia se elige cuando el componente de interés se presenta en altas concentraciones. Mientras que cuando el componente de interés presenta bajos niveles, o existen múltiples componentes que desean aislarse y presentan polaridades ampliamente diferentes, la primera estrategia es empleada. Esta manera también es empleada para el enriquecimiento de muestras que tienen de trazas de compuestos y para la concentración de muestras diluidas.

En cualquiera de los casos, el sorbente debe ser primero acondicionado con un solvente apropiado. Después del acondicionamiento, se pasa la muestra a través del sorbente y las impurezas (interferencias) son desorbidas con un solvente de lavado y finalmente, el analito se eluye con el solvente apropiado. De manera general para una extracción completa son necesarios 4 pasos:

1. Acondicionamiento de los cartuchos de extracción.

Acondicionamiento se refiere al tratamiento del material de soporte con un solvente orgánico, p. e. metanol o acetnitrilo. Esto hace que las cadenas de hidrocarburos de las fases modificadas se solvaten y permitan una superficie activa que sea accesible al analito y que este requiere para que sea reproducible la adsorción. El exceso del solvente orgánico se retira usando agua o alguna solución reguladora de pH.

2. Aplicación de la muestra.

La muestra en solución se hace pasar (con vacío, presión o por centrifugación) a través del cartucho de extracción. El analito se concentra en una zona muy delgada sobre el adsorbente. Ciertos componentes indeseables y más solubles que la matriz no son adsorbidos o pasan a los desechos.

3. Paso de limpieza (lavado)

Los otros componentes indeseables, se lavan del adsorbente usando un pequeño volumen de agua, tampón, o mezclas de agua metanol, tampón /metanol según sea el caso.

4. Elución y recuperación del analito preparado.

En el último paso de la extracción en fase sólida, el analito se eluye del adsorbente, empleando un disolvente adecuado, quedando de esta forma disponible para el análisis previa dilución o concentración. El disolvente se debe escoger de manera que la interacción analito-sorbente sea rota y haya transferencia de aquel al eluyente. Por tanto, enlaces muy fuertes ya sea de las interferentes o de los analitos con el sorbente, harán que ciertos compuestos permanezcan sobre éste. De manera que el detallado conocimiento que se tenga del analito, respecto a su solubilidad, polaridad y lipofilidad (coeficiente de distribución, etc) es la base para la selección del eluyente. La selección se hace más fácil utilizando "la

secuencia eluotrópica" de solventes, para estimar la fuerza de elución, de acuerdo con el analito que se va a extraer.

De acuerdo con sus características antes expuestas, la extracción en fase sólida (EFS) es una alternativa más fácil, económica y rápida que la extracción líquido - líquido, que es el método tradicional empleado para la concentración de muestras. Los métodos de EFS reducen significativamente el volumen necesario de solventes orgánicos clorados y no clorados comúnmente necesarios para la preparación de la muestra. Adicionalmente en el mercado se ofrecen diferentes alternativas de rellenos, que permiten un gran número de posibilidades de trabajo para cualquier sistema matriz / analito.

2.5. Generalidades sobre Validación de Métodos Analíticos (22 – 25)

La industria farmacéutica está especialmente interesada en la validación de métodos analíticos debido al gran incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requieren de métodos de análisis apropiados.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad.

La validación de un método analítico puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa en éste caso, en términos de parámetros analíticos.

El proceso de validación de un método analítico en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición.

Los criterios de validación que generalmente se consideran en la validación para cuantificar fármacos en fluidos biológicos son los siguientes:

- **Selectividad.** Es la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.
- **Recuperación absoluta.** Es la eficacia de un método analítico para extraer el o los compuestos por analizar en la muestra biológica
- **Linealidad.** Es la capacidad del método analítico (dentro de un rango dado) para obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra.
- **Precisión.** Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.
- **Repetibilidad.** Es la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.
- **Reproducibilidad.** Es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, días, equipos, etc.).
- **Exactitud.** Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

- **Rango.** Se refiere al intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.
- **Estabilidad.** Se refiere a la capacidad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.
- **Límite de cuantificación.** Es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.
- **Límite de detección.** Es la mínima concentración de un compuesto en una muestra, el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo condiciones de operación establecidas.

2.6. Métodos reportados para Diclofenaco (26 – 30)

En la tabla 5a, 5b, y 5c se encuentran descritos algunos de los métodos reportados en la literatura para la cuantificación de Diclofenaco en plasma humano.

EXTRACCIÓN LIQUIDO-LIQUIDO		
Ref.	Metodología de la Extracción	Sistema cromatográfico
27	1 mL Plasma + 4 mL de H ₃ PO ₄ 2.5 M Vortex por 10 seg. Añadir 5 mL de Hexano-IPA (alcohol isopropílico) (90:10) y agitar en vortex por 15 min. Centrifugar por 15 min. A 1250 r.p.m	Precolumna Guard-Pak ODS 10µm. Columna Zorbax ODS, 3µm de 80 * 6.2mm Fase Móvil: Buffer pH =7.1 (52%), ACN (23%), MeOH(25%)
29	0.25 mL Plasma + 0.5 mL de H ₃ PO ₄ 2.5 M Vortex por 10 seg. Añadir 1.5 mL de Hexano-IPA (alcohol isopropílico) (80:20) y agitar en vortex por 2.5 min. Centrifugar por 10 min. A 3000 r.p.m	Columna Spherisorb C18, 5µm de 250 * 4.6mm Fase Móvil: Buffer pH =6.3 (35%), ACN (65%)
30	0.5 mL Plasma + 0.6 mL de H ₃ PO ₄ 1M Vortex por 10 seg. Añadir 5 mL de Hexano-IPA (alcohol isopropílico) (95:5) y agitar en vortex por 1 min. Centrifugar por 10 min. A 3000 r.p.m	Precolumna Spherisorb S5 ODS1 de 10 * 4.6 mm Columna Spherisorb S5 ODS1 de 250 * 4.6mm Fase Móvil: Buffer pH =3.3 (37%), ACN (63%)

Los artículos que plantean una extracción líquido-líquido como tratamiento de la muestra, dejan abierta la posibilidad de poder concentrar el analito. Este es el caso de las metodologías arriba descritas porque en todas ellas, las muestras después de la extracción son evaporadas hasta sequedad y posteriormente son reconstituidas en un volumen menor de disolvente. Esto permite que se pueda mejorar el límite de cuantificación.

Sin embargo, estos métodos presentan algunas desventajas. Para optimizar el rendimiento, el volumen del disolvente de extracción generalmente es alto, lo que provoca volúmenes que son difíciles de manipular, además, se originan enormes volúmenes de desechos y largos tiempos de evaporación.

Por otro lado, en la metodología empleada por Millership y col. (30), aún cuando se cumplen los parámetros de validación, el intervalo lineal es de 1.0 mcg / ml a 5.0 mcg / ml y la concentración máxima que se espera cuantificar es justamente 1.0 mcg/ ml, las concentraciones inferiores ya no estarían dentro del intervalo lineal.

Tabla 5a. Métodos reportados en la bibliografía para la cuantificación de Diclofenaco en plasma por CLAR y extracción líquido-líquido.

EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA		
Ref.	Metodología de la Extracción	Sistema cromatográfico
30	0,5 mL Plasma + 0,6 mL de H ₃ PO ₄ 1M, Aplicar a cartuchos Oasis y lavar con 1 mL de metanol 5% en agua Eluir con 1 mL de Metanol	Columna Spherisorb C18, 5µm de 250 * 4,6mm Fase Móvil: Buffer pH =6.3 (35%), ACN (65%)
<p>Esta metodología también tiene la ventaja de poder concentrar el analito; además, se disminuye de manera importante el volumen de disolventes utilizados, sin embargo, el costo no deja de ser elevado y el procedimiento de extracción tedioso y aunque se reduce el tiempo del tratamiento de muestra con respecto a la extracción líquido-líquido, éste no deja de ser prolongado.</p> <p>Millership y col. (30) en el mismo artículo proponen además de una extracción líquido-líquido, una extracción en fase sólida, sin embargo, se tiene el mismo problema: el intervalo lineal 1.0 mcg / ml a 5.0 mcg / ml no contempla el rango de concentraciones que se esperan cuantificar.</p>		

Tabla 5b. Métodos reportados en la bibliografía para la cuantificación de Diclofenaco en plasma por CLAR y extracción en fase sólida.

EXTRACCIÓN EN LÍNEA		
Ref.	Metodología de la Extracción	Sistema cromatográfico
28	Injectar 100 µL de plasma prefiltrado por una membrana de 0.2 µm en una precolumna fenilo y posteriormente en una precolumna C18 con la fase móvil 1. Finalmente eluir con la fase móvil 2 hacia una columna fenil – hexil	Precolumna Capcell Pak MF Ph – 1 Precolumna Intermedia Capcell Pak C18. Columna analítica Fenil-hexil, C18 o C8, de 3µm, de 100 * 2 mm. Fase Móvil 1: Buffer pH = 7.0 (86%), ACN (14%) Fase Móvil 2: Buffer pH =7.0 (67%), ACN (33%)
26	1 mL Plasma + 4 mL de H ₃ PO ₄ 2 M Añadir 6 mL de Hexano-IPA (90:10) y agitar en vortex por 15 min. Centrifugar por 10 min. A 1500rpm	Precolumna C18, 10µm, de 35 * 4,6mm Columna C18, 10 µm, de 150 * 4,6mm Fase Móvil: Buffer pH =7.1 (52%), ACN (23%), MeOH (25%)
<p>En los métodos que emplean la técnica de cromatografía bidimensional, el tratamiento de la muestra está altamente automatizado, lo cual, en principio reduciría de manera importante el tiempo de análisis, no obstante, en la metodología desarrollada por Hye Suk y col. (28), el empleo de dos precolumnas previo a la separación en la columna analítica, aumenta el tiempo de análisis, aunado a que el diámetro de la columna es pequeño (2 mm), lo que obliga a utilizar velocidades de flujo bajas, lo cual, también repercute en el tiempo de análisis. Por otro lado, la ventaja inicial de inyectar directamente la muestra en el sistema cromatográfico, eventualmente puede tener algunos inconvenientes: no existe la posibilidad de concentrar la muestra, lo cual trata de contrarrestarse mediante la inyección de altos volúmenes, situación que también afecta la vida media de las precolumnas y columnas. Finalmente, de manera experimental obtuvimos que la inyección directa de la muestra en el sistema cromatográfico acarrea problemas de selectividad; en algunas muestras plasmáticas aparecían señales que interferían con la del Diclofenaco.</p>		

Tabla 5c. Métodos reportados en la bibliografía para la cuantificación de Diclofenaco en plasma por CLAR y extracción en línea.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desarrollar un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de Diclofenaco en plasma humano, donde el tratamiento de la muestra sea sencillo en términos de manipulación de la muestra y tiempo de ejecución y, al mismo tiempo proporcione parámetros cromatográficos adecuados de tal manera que sea factible el que se aplique eventualmente en un estudio de bioequivalencia.

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1. Sustancia de Referencia

Nombre	Diclofenaco, sal sódica
Marca	Sigma
Lote	12H0066

4.2. Reactivos y Equipo

En la tabla 6 se encuentran descritos los reactivos utilizados en el método desarrollado.

Reactivo	Grado	Marca
Agua	HPLC	Obtenida a partir de un equipo MilliQ
Acetonitrilo	HPLC	Fermont
Acido ortofosfórico	RA ACS	J. T. Baker
Fosfato Dibásico de Potasio	RA	J. T. Baker

Tabla 6. Reactivos utilizados.

El equipo de cromatografía líquida de alta resolución utilizado, así como los accesorios necesarios para implementar la metodología se encuentran indicados en la Tabla 7, aunque cabe señalar que el controlador automático de gradiente no se empleó para llevar acabo algún sistema de gradiente sino para controlar las acciones de la válvula intercambiadora de flujo.

Además del equipo mencionado, se empleó el equipo auxiliar descrito en la Tabla 8:

Equipo	Marca	Modelo
2 Bombas Isocráticas de doble pistón recíprocante	Waters	510
Automuestrador	Waters	717 Plus
Detector UV Dual	Waters	2487
Controlador automático de gradiente	Waters	680
Válvula intercambiadora de flujo de Seis Vías	Valco - VICI	-----
Columna analítica	Waters	X Terra RP 8, partículas esféricas de 5µm, 150 *3.9 mm DI
Guarda columna	Waters	X Terra RP18, partículas esféricas de 5µm, 25*3.9 mm DI
Programa de procesamiento de datos Millennium 32.	Waters	Versión 3.05.01

Tabla 7. Equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución empleado.

Equipo	Marca	Modelo
Balanza Analítica	Mettler	AE 260
Centrífuga	Sorvall Du Pont	RT 6000D
Potenciómetro	Beckman	45
Ultracongelador	Nuaire	UN / 6512GKI
Refrigerador	Revco	REC500+A18
Pipeta automática 5-50 µL	Finnpipette	-----
Pipeta automática 40-200 µL	Labsystems	Finnpipette Digital
Pipeta automática 200-1000 µL	Labsystems	Fisherbrand
Pipeta de descargas múltiples	Eppendorf	-----
Baño de agua con temperatura controlada	Science /Electronics Inc.	-----

Tabla 8. Equipo auxiliar empleado.

4.3. Desarrollo del Método

Para iniciar con el desarrollo del método partimos de las siguientes premisas:

- Objetivos de la separación: purificar, identificar, cuantificar.
- El método primero debe ser capaz de poder extraer el analito de la matriz biológica de manera cuantitativa y con un mínimo de interferencias, de tal modo que al inyectar las muestras en el sistema cromatográfico se tengan tiempos de retención reproducibles que permitan identificarlo y a la vez debe ser lo suficientemente sensible para poder cuantificarlo de manera exacta y precisa.

En cuanto a las características de la muestra:

- Debido a la naturaleza de la muestra, no se conocen químicamente todos los componentes de la mezcla sin embargo, es evidente que no es necesario resolverlos todos, pero, resulta conveniente implementar un método de extracción del analito antes de que la muestra sea inyectada.
El plasma es una matriz muy compleja que contiene un elevado contenido en proteínas que eventualmente pueden interferir en la determinación del analito y además pueden dañar la columna. Es por ello que resulta fundamental implementar una serie de pasos encaminados a evitar las interferencias o agentes no deseables disueltos o en suspensión para obtener una muestra lista para el análisis final.

En cuanto al intervalo de concentración a cuantificar.

- Se establece considerando la concentración plasmática máxima. El método debe ser capaz de cuantificar dicha concentración y la que se tenga al cabo de cuatro tiempos de vida media, de tal forma que se pueda caracterizar de manera adecuada el perfil farmacocinético. En este caso la concentración plasmática máxima del Diclofenaco cuando se administra un comprimido de 50 mg por vía oral es de 1.5 mcg/mL, entonces, el método debe ser capaz de cuantificar desde 1500 ng hasta 93.7 ng. Evidentemente que se debe ampliar razonablemente este intervalo para que se tenga la seguridad de que las muestras analizadas puedan ser cuantificadas.

Entonces podemos plantear los siguientes objetivos que debe cumplir el método en lo que se refiere a la extracción del analito de la muestra:

- Reducir el volumen de muestra a introducir en el sistema.
- Eliminar interferencias asociadas a la matriz y partículas insolubles.
- Concentrar los componentes de interés.
- Disolver la muestra en el medio más adecuado para el análisis.
- Mejorar la separación.
- Recuperaciones cuantitativas y reproducibles.

Con los elementos anteriores, se comenzó el desarrollo del método, para ello, en primera instancia se trabajó en el establecimiento del sistema cromatográfico, enseguida se efectuaron distintos ensayos para determinar la metodología más adecuada para la extracción de la muestra.

Planteamiento Del Sistema Cromatográfico.

En la mayoría de los artículos reportados para cuantificar Diclofenaco en plasma mediante Cromatografía de líquidos de alta resolución (ver punto 2.6 "Métodos reportados para Diclofenaco"), se utilizan sistemas en fase reversa que implican el uso de los siguientes elementos:

- **Columnas C18 o bien C8 y fases móviles con altas proporciones de fase orgánica.** Esto debido a que el analito posee características lipofílicas importantes a pH's menores que su pKa e incluso en su estado ionizado sus propiedades lipofílicas se mantienen. Esto también da la pauta para que no sea necesario el empleo de algún par iónico. Los disolventes orgánicos utilizados son acetonitrilo o metanol. En general se prefiere el acetonitrilo porque genera picos cromatográficos mejor definidos.
- **Detección UV.** La molécula de diclofenaco, presenta en su estructura química dobles enlaces conjugados, lo cual permite que pueda ser detectado a través de espectrofotometría UV sin necesidad de implementar reacciones de derivatización. Los máximos de absorción se presentan a 280 nm.

Ante ésta perspectiva, el problema se reduce a plantear un sistema cromatográfico en el cual la fase móvil tenga una proporción de disolvente orgánico y solución reguladora de fosfatos tales que proporcionen un factor de capacidad adecuado para el Diclofenaco.

El sistema cromatográfico con el cual se encontraron resultados adecuados fue el siguiente:

Fase Móvil:

Solución Reguladora de Fosfatos 0.1M pH = 6.5.....70%
Acetonitrilo.....30%

Condiciones Cromatográficas:

Columna X Terra RP 8.
Sistema de detección UV a 280 nm.
Flujo: 1 mL /min.

Con éstas condiciones, se tuvo un tiempo de retención para el Diclofenaco de alrededor de 5 minutos, y una señal cromatográfica bien definida cuando se analizaron estándares acuosos, lo cual se puede apreciar en la Figura 5:

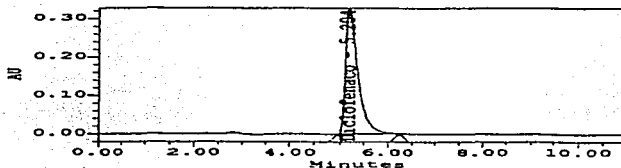


Figura 5. Cromatograma representativo de un estándar acuoso, desarrollado con el sistema cromatográfico propuesto.

Es importante plantear las siguientes consideraciones sobre el sistema cromatográfico:

- **pH.** El valor de pH que tiene la solución reguladora de fosfatos es de 6.5. Se eligió porque a este valor de pH, el grupo carboxilo del diclofenaco se encuentra ionizado lo que permite que el tiempo de retención no sea tan elevado, considerando que es sistema es de fase reversa.
- **Fuerza iónica.** La relativamente alta fuerza iónica es debida a la elevada concentración de fosfato de potasio dibásico de la solución amortiguadora de fosfatos, esto permite una prolongada estabilidad de la muestra al ser inyectada en el sistema cromatográfico. Favorece fundamentalmente el que proteínas todavía presentes en la muestra no precipiten debido a la estabilidad en el pH. Esto tiene como consecuencia que la vida de la columna aumente.

Planteamiento del Método de Extracción.

Con los elementos anteriores y con el sistema cromatográfico establecido se ensayaron distintos métodos de extracción del analito. Los tipos de extracción que se ensayaron fueron los siguientes:

- Precipitación selectiva.
- Extracción líquido / líquido.
- Extracción fase sólida.
- Cromatografía Bidimensional (Column Switching).

Las características de cada una de las técnicas se presentan a continuación, y en la sección 6 se presentan los resultados más representativos de cada una de las técnicas ensayadas, así como sus cromatogramas típicos.

- **Precipitación selectiva:**
 - Permite eliminar proteínas y otros componentes de elevado peso molecular de la muestra biológica.
 - Los agentes precipitantes utilizados fueron: Acetonitrilo y Ácido Tricloroacético al 10%.
 - Es una técnica sencilla y con un tiempo de ejecución relativamente corto.
- **Extracción líquido-líquido:**
 - Se da un fenómeno de partición de los componentes de la muestra entre dos disolventes inmiscibles.
 - Permite concentrar el analito ya que se pueden ajustar los volúmenes de cada disolvente y posteriormente secar.
 - Se puede controlar mediante ajustes de pH y/o fuerza iónica de la fase acuosa.

- **Extracción en Fase Sólida:**
 - Se presentan fenómenos de adsorción y partición entre la fase estacionaria.
 - Permite concentrar el analito de una manera más sencilla que la extracción líquido – líquido.
 - Además, se emplea menor cantidad de disolventes que en la extracción líquido – líquido.
- **Cromatografía Bidimensional (Column Switching) o extracción en línea:**
 - Implica una limpieza en línea que esencialmente es una extracción en fase sólida integrada al sistema CLAR.
 - Envía el analito de interés a la columna analítica libre de solutos que interfieran con el análisis o afecten la integridad de la columna y el detector.
 - Permite el análisis automatizado rápido, robusto, sensible, selectivo, exacto y preciso de muestras complejas.
 - Permite concentrar el analito de una manera muy simple y rápida.
 - En la sección de “Condiciones de Trabajo” (sección 4.4.3), se explica de manera detallada como opera el sistema de extracción en línea

Como se mostrará más adelante, se decidió implementar una metodología innovadora para la extracción de Diclofenaco en muestras plasmáticas.

La metodología que se desarrolló para la extracción del analito y su justificación es la siguiente:

1. Transferir 0.50 mL de la muestra a un tubo Eppendorf de plástico de 1.5 mL.
2. Adicionar 1 mL de Acetonitrilo. Agitar con agitador tipo vórtice durante 3 minutos. Esto permite eliminar una gran cantidad de proteínas y otros componentes de elevado peso molecular.
3. Calentar 5 minutos a 40° C. Esto con el objeto de mejorar la desnaturalización de las proteínas.
4. Centrifugar a 3500 r.p.m. durante 15 minutos, a 10°C. De ésta manera se separan los componentes precipitados y los que aún están en disolución.
5. Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf de plástico de 1.5 mL.
6. Evaporar a sequedad con corriente de nitrógeno suave a 40°C. Esto con la finalidad de poder concentrar el analito.
7. Reconstituir con 250 mcL de fase móvil, agitando en agitador tipo vórtice durante 2 minutos.
8. Inyectar 50 mcL al sistema cromatográfico. Inicialmente se había planteado inyectar un volumen pequeño de muestra en el sistema cromatográfico, sin embargo, éste problema se ve disminuido porque el Diclofenaco es retenido en la guardacolumna que funciona como una columna concentradora. La fase móvil de lavado contiene una proporción de 15% de acetonitrilo y 85% de solución reguladora de fosfatos lo cual tiene como consecuencia la retención del Diclofenaco en la guardacolumna y posteriormente con la fase móvil de elución la muestra pasa a la columna analítica donde propiamente ocurre la separación.

4.4. Descripción del Método

4.4.1. Reactivos, Soluciones y Equipo

4.1.1.1. Reactivos:

- Agua grado HPLC
- Acetonitrilo grado HPLC
- Ácido ortofosfórico RA ACS
- Fosfato de potasio dibásico RA ACS

4.1.1.2. Soluciones:

- **Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5**
Pesar 17.418g de fosfato dibásico de potasio y transferirlos a un matraz volumétrico de 1000mL, disolverlos en 900mL de agua HPLC, ajustar potenciométricamente el pH a 6.5 con ácido ortofosfórico y mezclar. Llevar a volumen con agua HPLC.
- **Fase móvil de lavado (FM1).**
Mezclar volúmenes de acetonitrilo y solución reguladora de fosfatos pH 6.5 para obtener una proporción 15:85 respectivamente. Filtrar a través de una membrana de 0.45 μm y desgasificar con vacío.
- **Fase móvil de elución (FM2).**
Mezclar volúmenes de acetonitrilo y solución reguladora de fosfatos para obtener una proporción 30:70 respectivamente. Filtrar a través de una membrana de 0.45 μm y desgasificar con vacío.
- **Solución de lavado de la columna.**
Mezclar volúmenes iguales de acetonitrilo y de agua. Filtrar a través de una membrana de 0.45 μm y desgasificar con vacío.
- **Blanco de reactivos (BR).**
Preparar igual que las muestras, utilizando agua en vez de muestra de plasma.
- **Blanco de plasma (BP).**
Preparar igual que las muestras, utilizando plasma blanco en vez de muestra de plasma.
- **Preparación de los puntos control (PC)**
Preparar igual que las muestras.
- **Solución de adecuación del sistema (SR)**
Transferir 0.15 mL de SD a un matraz volumétrico de 5 mL. Llevar a volumen con agua. Concentración final de Diclofenaco: 1200 ng/mL.

- **Solución concentrada de Diclofenaco (SD)**
Transferir el equivalente a 50 mg de Diclofenaco, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL. Disolver y llevar a volumen con metanol. Concentración final de Diclofenaco: 1000 mcg /mL
- **Solución A de Diclofenaco (SA)**
Transferir 0.4 mL de la solución SD a un matraz volumétrico de 10 mL. Llevar a volumen con agua HPLC. Concentración final de Diclofenaco: 40 mcg /mL
- **Solución B de Diclofenaco (SB)**
Transferir 0.625 mL de solución SA a un matraz volumétrico de 10 mL. Llevar a volumen con agua HPLC. Concentración final de Diclofenaco 2.5 mcg /mL
- **Preparación de la curva de calibración plasmática:**
Transferir a matraces volumétricos de 5-mL las alícuotas de las soluciones que se indican en la Tabla 9. Llevar a volumen con plasma. Procesar de la misma manera que las muestras.

Identificación	Solución	Alícuota (mL)	Concentración final de Diclofenaco (ng /mL)
C1	SA	0.25	2000
C2	SA	0.20	1600
C3	SA	0.15	1200
C4	SA	0.10	800
C5	SA	0.05	400
C6	SB	0.20	100
C7	SB	0.10	50
C8	SB	0.05	25

Tabla 9. Preparación de la curva de calibración

4.1.1.3. Equipo.

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución equipado con automuestreador y dos bombas isocráticas, acoplado a un detector UV, con capacidad de detectar a 280 nm. Se empleó una columna X Terra RP 8, rellena partículas esféricas de 5 µm, de 150 mm de longitud y 3.9 mm de diámetro interno, y una guarda columna X Terra RP 18, rellena de partículas de 5 µm, de 25 mm de longitud y 3.9 mm de diámetro interno. Además se empleó una válvula intercambiadora de flujo de 6 vías.

4.4.2. Metodología Analítica

- Transferir 0.50 mL de la muestra a un tubo Eppendorf de plástico de 1.5 mL.
- Adicionar 1 mL de Acetonitrilo. Agitar con agitador tipo vórtice durante 3 minutos.
- Calentar en baño de agua durante 5 minutos a 40° C.
- Centrifugar a 3500 r.p.m durante 15 minutos, a 10° C.
- Transferir cuidadosamente el sobrenadante a un tubo Eppendorf de plástico de 1.5 mL.
- Evaporar a sequedad con corriente de nitrógeno suave a 40° C.
- Reconstituir con 250 µL de fase móvil de lavado (FM1) y agitar en agitador tipo vórtice durante 2 minutos.
- Inyectar 50 µL al sistema cromatográfico.

4.4.3. Condiciones de Trabajo

El sistema cromatográfico debe de constar del equipo necesario para dar las siguientes condiciones:

Velocidad de flujo bomba 1 con fase móvil de lavado (FM1)	1.0 mL /min.
Velocidad de flujo bomba 2 con fase móvil de elución (FM2)	1.0 mL /min.
Volumen de Inyección	50 µL
Temperatura de la columna	Ambiente (20 – 25 ° C)
Respuesta	Área
Longitud de onda	280 nm
Tiempo de corrida	15 min.

Condiciones de la válvula intercambiadora de flujo:

- Se activó el switch 1 desde el inicio de la inyección de la muestra hasta el minuto cuatro. Durante este periodo, la muestra es inyectada en la guardacolumna a través de la cual fluye la Fase Móvil de Lavado (FM1), el analito de interés queda retenido en la guardacolumna mientras que los componentes del plasma que se desean eliminar salen hacia los desechos, en tanto que la columna analítica es acondicionada con la Fase Móvil de elución (FM 2). Esta acción se esquematiza en la Figura 6.
- A los cuatro minutos se activó el switch 2. Al activarlo, la FM 2 entra en la guardacolumna y eluye el analito hacia la columna analítica. Mientras, a través de la guardacolumna fluye la FM1, la cual la limpia y la acondiciona para la siguiente inyección. Esta acción se esquematiza en la Figura 7.

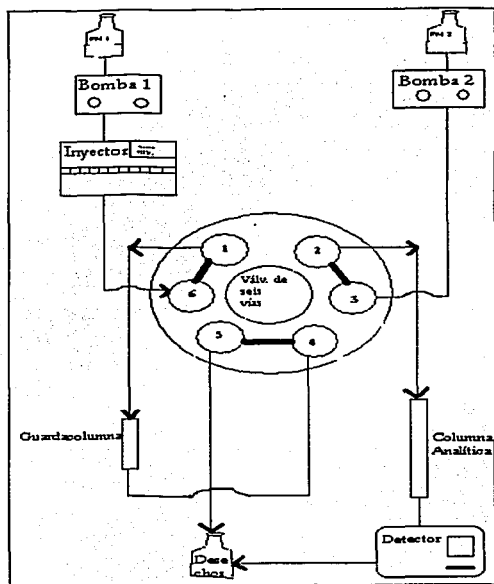


Figura 6. Diagrama representativo del equipo empleado configurado con el switch 1.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

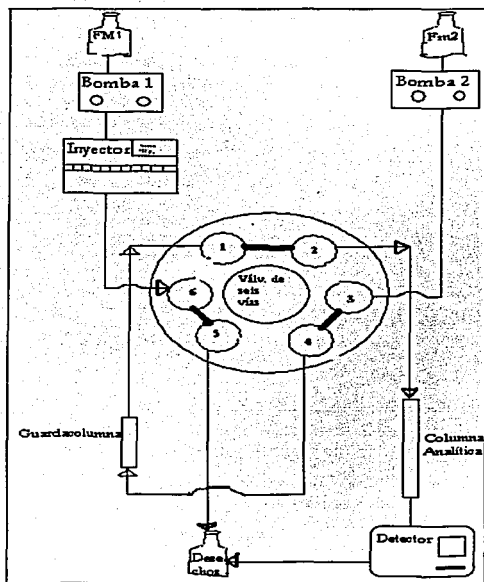


Figura 7. Diagrama representativo del equipo empleado configurado con el switch 2.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

4.5. Cálculos

Curva.

El intervalo que abarca la curva es de 25 a 2000 ng /mL. Realizar un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, empleando la concentración de Diclofenaco como variable independiente (x) y la respuesta del pico como variable dependiente (y). Obtener la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de determinación (r^2).

Muestras

Interpolar la respuesta de las muestras en la siguiente fórmula, y obtener la concentración de Diclofenaco en ng /mL en cada una de ellas:

$$\text{Concentración} = \frac{y - b}{m}$$

Donde: y = respuesta de la muestra.
 m = pendiente de la curva.
 b = ordenada al origen.

4.6. Criterios de Aceptación de la corrida Analítica.

- Las soluciones BR y BP no presentan señales que interfieran con la señal del compuesto de interés.
- La respuesta de 5 inyecciones consecutivas de la solución SR tiene un CV menor o igual a 2.0 %.
- El porcentaje de desviación absoluta de los puntos de la curva, con respecto a la concentración nominal, al interpolar la respuesta en la curva generada, no es mayor a 15% ni mayor a 20% para el punto más bajo de la curva (25 ng /mL).

5. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DETERMINADOS

5.1. Selectividad

Preparación de muestras.

Se prepararon blancos de plasma como indica como se indica en el punto 4.4.1 para la preparación de blancos de plasma (BP), de 6 lotes de plasma provenientes de diferentes sujetos.

Criterio de aceptación.

Ninguno de los 6 lotes probados debe presentar interferencias en el tiempo de retención del Diclofenaco sódico.

5.2. Recuperación Absoluta

Preparación de muestras.

Se prepararon muestras plasmáticas a las concentraciones de 40, 600 y 1800 ng /mL, y soluciones acuosas a concentraciones de 80, 1200 y 3600 ng /mL. Las concentraciones de las soluciones acuosas corresponden a las concentraciones teóricas de las muestras, después de ser procesadas. Las disoluciones acuosas se inyectan directamente en la columna analítica, sin el empleo de la válvula intercambiadora de flujo.

Cálculos

- Se obtuvo el promedio del área del pico del Diclofenaco para cada nivel de concentración de las muestras plasmáticas.

- Se obtuvo el porcentaje de recobro absoluto para Diclofenaco comparando la respuesta promedio del Diclofenaco en plasma con la respuesta correspondiente en solución acuosa.

- Se determinó el porcentaje de recobro para todas las concentraciones probadas, así como el promedio global.

Criterio de aceptación

- El promedio del porcentaje de recobro absoluto para Diclofenaco no debe variar $\pm 15 \%$ del promedio en todos los niveles.

5.3. Exactitud, Precisión y Linealidad

Preparación de muestras.

Se prepararon curvas a partir de pesadas independientes para cada día de análisis y muestras adicionadas con Diclofenaco, a concentraciones de 40, 600 y 1800 ng /mL. Las muestras y las curvas se almacenaron a $-40^{\circ} \pm 5^{\circ} \text{C}$.

Parte experimental

Se evaluaron conjuntamente la linealidad, exactitud y precisión del método durante un periodo de 3 días de la siguiente manera:

- Linealidad: Se analizó una curva por día de trabajo durante 3 días.
- Reproducibilidad: Se analizaron durante 2 de los 3 días las muestras adicionadas por triplicado.
- Repetibilidad: Se analizó durante un día, las muestras adicionadas por sextuplicado.

Cálculos:

Linealidad.

- Para las curvas generadas, se obtuvo la ecuación de la recta por el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, tomando la concentración como variable independiente (x) y la respuesta del pico de interés como variable dependiente (y).
- De la ecuación generada se obtuvo la ordenada al origen (b), la pendiente (m) y el coeficiente de determinación (r^2).
- Se estimó la calidad de ajuste, por el cálculo de la concentración de las muestras al interpolar la respuesta obtenida en la misma recta generada y por el porcentaje de diferencia relativa para cada concentración.

Criterios de aceptación.

En las curvas independientes, el porcentaje de diferencia relativa de las concentraciones interpoladas para cada punto con respecto al valor verdadero, debe ser menor o igual al 15 % a excepción del punto más bajo de la curva (25 ng/mL), que debe ser menor o igual al 20%.

Precisión.

- Con las concentraciones de las muestras interpoladas en la curva, durante los tres días de este experimento, se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (CV) para cada nivel probado.

Criterios de aceptación.

Cualquier valor de coeficiente de variación no debe ser mayor del 15 %.

Exactitud.

- En cada uno de los experimentos, se obtuvieron las concentraciones interpoladas de las muestras en la Curva.
- Se calculó el porcentaje de diferencia para cada muestra y el promedio para cada concentración probada con las concentraciones interpoladas en la curva, de las muestras adicionadas para los dos días de reproducibilidad.

- Se calculó el porcentaje de diferencia para cada muestra y el promedio para cada concentración probada con las concentraciones interpoladas en la curva, de las muestras adicionales para el día de repetibilidad.

Criterio de aceptación.

En todos los casos, la diferencia relativa del promedio no debe ser mayor al 15 % respecto al valor nominal.

5.4. Rango

Se consideró como el rango de este método analítico a aquel intervalo de concentraciones a lo largo del cual se demostró linealidad, precisión y exactitud.

5.5. Estabilidad de la Muestra en el Disolvente de Inyección

Parte experimental

Se procesaron y analizaron muestras plasmáticas adicionadas de Diclofenaco sódico (tiempo cero); las muestras procesadas se mantuvieron en el automuestreador a temperatura ambiente y se reinyectaron después de 48 horas. Las respuestas de las muestras se interpolaron en una curva procesada y analizada el día de análisis correspondiente a las 48 horas.

Criterios de aceptación

Se consideró que la muestra procesada es estable durante 48 horas si el promedio de las concentraciones obtenidas no difería en $\pm 15\%$, del promedio de las concentraciones obtenidas al tiempo cero, y si el coeficiente de variación no era mayor al 15% en los niveles probados.

5.6. Estabilidad de la Muestra a ciclos de Congelación-Descongelación

Parte experimental

Las muestras se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación (-40°C -- temperatura ambiente). Una vez terminados los ciclos, se procesaron por triplicado y se interpolaron en una curva recién preparada.

Criterios de aceptación

Se consideró que la muestra es estable a ciclos de congelación descongelación si la concentración interpolada no difería en $\pm 15\%$, de la concentración adicionada, además de cumplir con los criterios de precisión.

5.7. Límite de Detección

Preparación de muestras.

Se preparó una solución de Diclofenaco sódico en plasma a una concentración de 15 ng /mL y se procesó por triplicado.

Cálculos

Se obtuvieron los cromatogramas y se calculó la relación señal / ruido para el pico de Diclofenaco sódico.

Criterio de aceptación

Se consideró que 15 ng /mL era el límite de detección si la relación señal / ruido se encontraba entre 2:1 a 4:1

5.8. Límite de Cuantificación

Parte experimental

Se analizó por sextuplicado la concentración de 25 ng /mL.

Cálculos

Se calculó la concentración de Diclofenaco en las cinco réplicas y se determinó la exactitud y precisión para esta concentración.

Criterio de aceptación

La diferencia del promedio de la concentración interpolada no es mayor del 20% respecto a la concentración adicionada y el coeficiente de variación es menor o igual al 20%.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Resultados del Desarrollo del Método

6.1.1. Resultados de la Precipitación Selectiva

En las figuras 8 y 9 se presentan los cromatogramas representativos de la precipitación con Acetonitrilo y con Ácido Tricloroacético, respectivamente.

TRATAMIENTO DE MUESTRA PLASMÁTICA	FASE MÓVIL	RESULTADOS
Precipitación de Proteínas		
500µL plasma + 2mL ACN Vortex 10' y centrifugación a 3000 r.p.m. 10' Separar sobrenadante, evaporar y reconstituir en fase móvil	MeOH.....70% Buffer pH=2.5.....30%	<ul style="list-style-type: none"> - Se presentan demasiadas señales que interfieren con la señal del Diclofenaco. - En los blancos plasmáticos se registra demasiada interferencia. Los recobros oscilaron alrededor del 90 %.
500µL plasma + 250 µL TCA 10% Vortex 10' y centrifugación a 3000 r.p.m. 10' Inyectar una alícuota del sobrenadante	MeOH.....70% Buffer pH=2.5.....30%	<ul style="list-style-type: none"> - Las señales que interfieren en los blancos de plasma disminuyeron notablemente, y en los blancos acuosos no se registran interferencias. - Sin embargo los recobros de los estándares plasmáticos son menores al 10%.

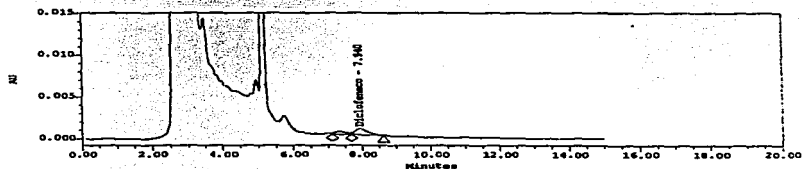


Figura 8. Cromatograma representativo de una muestra plasmática adicionada de Diclofenaco (2000ng/mL), tratada con Acetonitrilo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

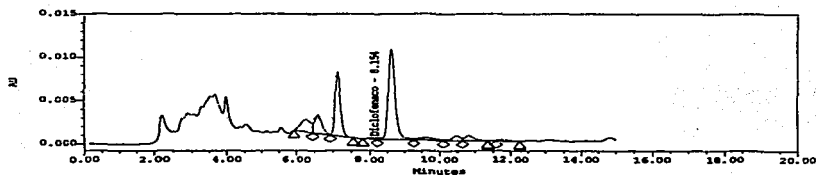


Figura 9. Cromatograma representativo de una muestra plasmática adicionada de Diclofenaco (2000ng/mL), tratada con ácido Tricloroacético al 10%.

6.1.2. Resultados de la Extracción Líquido-Líquido

En la figura 10 se presenta un cromatograma típico de una muestra plasmática adicionada de Diclofenaco (2000 ng /mL) que fue tratada mediante una extracción líquido-líquido.

TRATAMIENTO DE MUESTRA PLASMÁTICA	FASE ACUOSA	RESULTADOS
Extracción Líquido - Líquido		
500 µL plasma + 600 µL H ₃ PO ₄ 1M Mezclar en vórtex por 10 seg. y añadir 5 mL de la solución de Extracción (hexano-alcohol isopropilico 95:5 v/v). Mezclar en vórtex por 1'. Centrifugar a 3000 r.p.m. por 10', tomar 4 mL de la fase orgánica y evaporar.	MeOH.....70% Bufier pH=2.5...30%	Los cromatogramas de los blancos acuosos y de los estándares acuosos presentan líneas bases muy estables y libres de interferencias, pero las muestras plasmáticas presentan demasiadas señales que interfieren con la señal del Diclofenaco

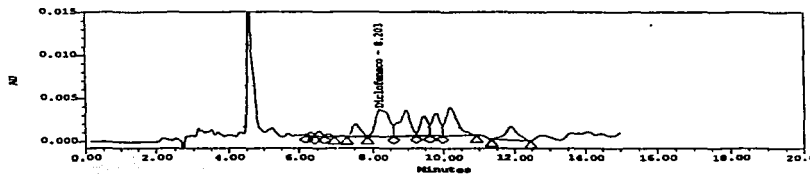


Figura 10. Cromatograma representativo de una muestra plasmática adicionada de Diclofenaco (2000ng/mL), tratada mediante una extracción líquido-líquido.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

6.1.3. Resultados de la Extracción en Fase Sólida

En la figura 11 se presenta un cromatograma representativo de una muestra plasmática adicionada de Diclofenaco (2000 ng/mL), que fue tratada mediante Extracción en Fase Sólida con Cartuchos de extracción Sep Pak Vac.

TRATAMIENTO DE MUESTRA PLASMÁTICA	FASE MÓVIL	RESULTADOS
Extracción en Fase Sólida		
<p>Cartuchos OASIS, Sep-Pak Vac y Bakerbond</p> <p>Acondicionar cartuchos con 1mL de MeOH y 1mL de Agua</p> <p>Cargar 500 µL de plasma acidificado con 600 µL de H₃PO₄ 1M</p> <p>Lavar con suficiente cantidad de MeOH 5% acuoso</p> <p>Eluir con MeOH puro, evaporar a sequedad</p> <p>Reconstituir con Fase Móvil</p>	<p>MeOH.....70% Buffer pH=2.5.....30%</p>	<p>Con los cartuchos OASIS, se obtuvieron recobros hasta del 80% en estándares acuosos.</p> <p>Con los cartuchos Sep Pak Vac, igualmente se obtuvieron recobros alrededor del 70 - 80% para estándares acuosos y para los estándares plasmáticos los recobros son muy bajos.</p> <p>Con los cartuchos Bakerbond, los recobros alcanzaron el 100% para los estándares acuosos y para los estándares plasmáticos se alcanzaron recobros del 68%, además de muy buenas limpiezas del plasma.</p>

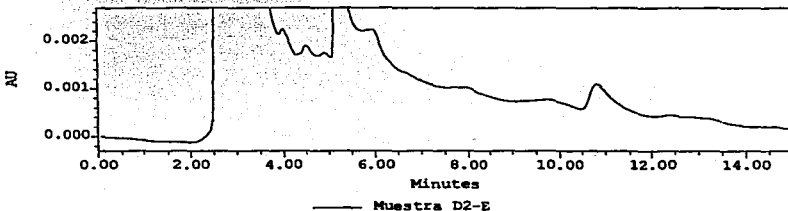


Figura 11. Cromatograma de una muestra plasmática adicionada de Diclofenaco (2000ng/mL), tratada mediante una Extracción en Fase Sólida, en la que el recobro del Diclofenaco fue nulo.

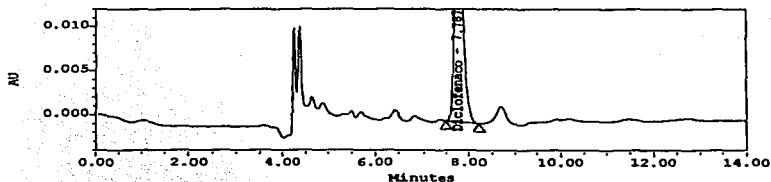
**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

6.1.4. Resultados de la Extracción en Línea

En la figura 12 se presenta un cromatograma representativo de una muestra plasmática adicionada de Diclofenaco a 2000 ng /mL., tratada con una extracción en línea.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA PLASMÁTICA		FASE MOVIL LAVADO	RESULTADOS
Extracción en Línea			
Precolumna	Tratamiento de muestra	Fase de Lavado	Resultados
Waters μ Bondapak C18	Ninguno	MeOH acuoso al 5%	El Diclofenaco tuvo un $t_r = 3$ min., mientras que las interferencias plasmáticas provenientes de un blanco eluyeron hasta los 2 min. Sin embargo la eficiencia de la precolumna disminuye notablemente al incrementarse el número de inyecciones. El pico presenta cierto grado de "coleo".
	Acidificar 500 μ L de plasma con 600 μ L de H_3PO_4 1M Centrifugar a 3000 r.p.m por 15'	MeOH acuoso al 5%, 2% y 0%	
Waters Nova-Pak C8	No se trató plasma	MeOH acuoso al 20%	Los blancos acuosos no presentan interferencia alguna con la señal del Diclofenaco, sin embargo el factor de asimetría de las señales es alto, los recobros son bajos y el factor de capacidad muy bajo.
Symmetry C18	No se trató plasma	ACN.....15% Buffer pH=6.5.....85%	Con el uso del ACN en lugar del MeOH, el coleo disminuyó notablemente, sin embargo el factor de capacidad es muy bajo, la limpieza de la muestra no es muy buena ya que existen interferencias con la señal del diclofenaco.
Pinkerton GFF II	No se trató plasma	ACN.....10% Buffer pH=7.0.....90%	El pico se parte pronunciadamente, no hay reproducibilidad.
X Terra C18	No se trató	ACN.....15% Buffer pH = 6.5..85%	Picos bien definidos y recobros, prácticamente del 100%, sin embargo existen algunas interferencias. El coleo encontrado es mínimo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Muestra I-A3 Vial 13 Inj 1 Fecha de Adquisición Jun 09, 2002 4:03:36 PM

Figura 12. Cromatograma representativo de una muestra plasmática adicionada de Diclofenaco (2000ng/mL), tratada mediante una Extracción en línea (Precolumna X Terra C 18).

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos plantear las siguientes consideraciones:

- La precipitación selectiva es un método sumamente sencillo y rápido, sin embargo, la limpieza no es muy efectiva cuando se utiliza acetonitrilo como agente precipitante, pues existen señales que interfieren con el pico del diclofenaco. La limpieza se ve notablemente mejorada cuando se utiliza ácido tricloroacético al 10%, pero disminuye considerablemente el recobro.
- En la extracción líquido-líquido se utiliza una gran cantidad de disolventes, el procedimiento es considerablemente más laborioso y la limpieza de la muestra no muy eficiente, pues existen picos que interfieren con el de diclofenaco.
- La extracción en fase sólida aún cuando proporciona buenos resultados en cuanto a limpieza de la muestra y recobros obtenidos, es un procedimiento muy prolongado y su costo es considerablemente mayor a los anteriores.
- La extracción en línea implica una extracción en fase sólida integrada al sistema CLAR. Envía el analito de interés a la columna analítica prácticamente libre de solutos que interfieran con el análisis o afecten la integridad de la columna y el detector. Permite el análisis automatizado rápido, robusto, sensible, selectivo, exacto y preciso de muestras complejas, aunque, particularmente en éste caso la limpieza de la muestra no fue la mejor, ya que eventualmente aparecían picos que interfieran con el del diclofenaco.

Con estos elementos, resultó conveniente el plantear una metodología de extracción en la que se combinaran dos técnicas. Por ejemplo la precipitación selectiva con acetonitrilo y la extracción en línea.

De esta manera se combinan las ventajas de ambas técnicas, lo cual trajo como consecuencia que por un lado se obtuviera un método sencillo y rápido de desproteínización de la muestra con acetonitrilo seguido de una limpieza en línea utilizando un precolumna XTerra C18 la cual mejora considerablemente la limpieza de la muestra.

Debido a que prácticamente la limpieza de la muestra es automatizada, no fue necesario el empleo de un estándar interno pues los resultados como se discutirá más adelante son lineales, exactos y precisos.

6.2. Resultados de los Parámetros de Validación Determinados

6.2.1. Selectividad

En la Figura 13 se muestra el cromatograma que corresponde a uno de los 6 lotes diferentes de plasma probados. En esta figura se puede apreciar que no se presentan interferencias al tiempo de retención del Diclofenaco sódico, cuando se realiza la lectura a una longitud de onda de 280 nm.

En la figura 14 se presenta el cromatograma típico de una muestra plasmática adicionada de Diclofenaco sódico a una concentración de 1200 ng / mL.

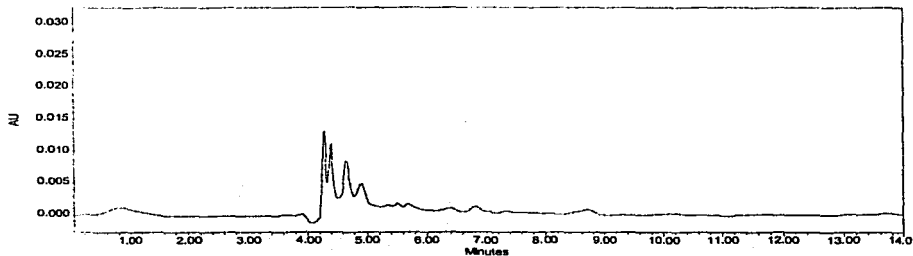


Figura 13. Cromatograma de un blanco de plasma

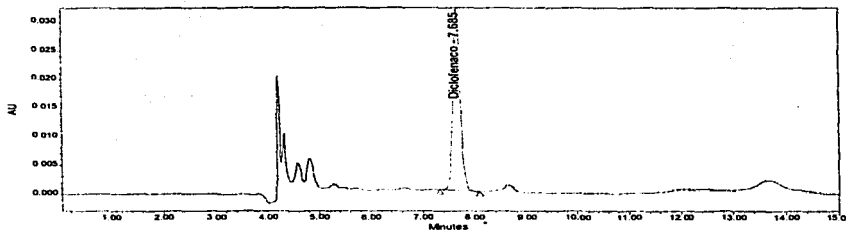


Figura 14. Cromatograma típico de una muestra plasmática adicionada de Diclofenaco sódico a una concentración de 1200 ng / mL

6.2.2. Recuperación Absoluta

En la Tabla 10 se presentan los resultados del experimento de recuperación absoluta. En esta tabla se puede observar que el promedio del porcentaje de recobro para Diclofenaco es de aproximadamente 96%. También se puede observar que el porcentaje de recobro absoluto para Diclofenaco no varía ± 15 % del promedio en todos los niveles.

CONCENTRACIÓN DE DICLOFENACO (ng /mL)	% RECOBRO	% DIFERENCIA RESPECTO AL PROMEDIO
40.00	91.04	-5.8
600.00	92.97	-3.7
1200.00	105.5	8.7
PROMEDIO	96.6	

Tabla 10. Resultados para la Recuperación Absoluta

6.2.3. Linealidad, Precisión y Exactitud

Linealidad

En la tabla 11 se muestra un resumen de los resultados de la linealidad del método y en la tabla 12 se resumen los estadísticos de regresión de las curvas obtenidas durante los tres días de análisis.

DÍA	IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS	CONCENTRACIÓN TEÓRICA (ng/mL)	RESPUESTA	CONCENTRACIÓN INTERPOLADA (ng/mL)	% DE DIFERENCIA
1	C1	2000	418428	2007.8	0.4
	C2	1600	332054	1591.8	-0.5
	C3	1200	247750	1185.7	-1.2
	C4	800	170667	814.4	1.8
	C5	400	86675	409.8	2.5
	C6	100	20819	92.6	-7.4
	C7	50	11787	49.1	-1.8
	C8	25	6531	23.8	-4.9
2	C1	2000	400973	1980.2	-1.0
	C2	1600	326824	1613.2	0.8
	C3	1200	245608	1211.2	0.9
	C4	800	163993	807.2	0.9
	C5	400	81802	400.3	0.1
	C6	100	20358	96.2	-3.8
	C7	50	9915	44.5	-11.1
	C8	25	5450	22.4	-10.5
3*	C1	2000	374883	2014.1	0.7
	C3	1200	218055	1170.9	-2.4
	C4	800	148395	796.4	-0.5
	C5	400	79534	426.1	6.5
	C6	100	17400	92.1	-7.9
	C7	50	9944	52.0	3.9
	C8	25	4654	23.5	-5.9

Tabla 11. Linealidad del método.

*La muestra C2 en el día tres, se perdió durante su tratamiento por lo que se anula de la tabla.

Día	Ecuación de la recta	r ²
1	$y = 207.6 x + 1595.6$	0.9998
2	$y = 202.0 x + 931.6$	0.9998
3	$y = 186.0 x + 277.1$	0.9995

Tabla 12. Resumen de estadísticos de regresión

En estas tablas se puede observar que en los tres días de análisis, el porcentaje de diferencia relativa para cada punto con respecto al valor verdadero fue no mayor al 15 % y no mayor al 20% para el punto más bajo de la curva, cuya concentración es de 25 ng/mL.

Exactitud.

En la tabla 13 se muestran los resultados de los experimentos de exactitud. Se puede observar que tanto en los resultados globales como en los tres días de análisis, para los tres niveles de concentración evaluados, la diferencia del promedio no es más del 15 % respecto a la concentración adicionada de Diclofenaco.

Precisión

En la tabla 13 se muestran los resultados de los experimentos de precisión. Se puede observar que tanto en los resultados globales como en los tres días de análisis, para los tres niveles de concentración evaluados, el coeficiente de variación de la concentración de Diclofenaco no es mayor a 15%.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

	CONCENTRACIÓN ADICIONADA DE DICLOFENACO (ng/ml.)		
	1800	600	40
DIA DE ANÁLISIS	CONCENTRACIÓN INTERPOLADA DE DICLOFENACO (ng/mL)		
1	1685.7	599.0	39.6
	1768.3	616.9	38.1
	1877.2	591.8	38.1
	<i>PROMEDIO</i>	<i>1777.1</i>	<i>602.6</i>
	<i>DES. EST.</i>	<i>96.0</i>	<i>12.9</i>
	<i>% C.V.</i>	<i>5.4</i>	<i>2.3</i>
	<i>% DE DIFERENCIA</i>	<i>-1.3</i>	<i>-3.5</i>
2	1809.9	525.0	42.0
	1727.1	640.9	40.9
	1901.5	602.2	35.8
	<i>PROMEDIO</i>	<i>1812.9</i>	<i>589.4</i>
	<i>DES. EST.</i>	<i>87.2</i>	<i>3.3</i>
	<i>% C.V.</i>	<i>4.8</i>	<i>8.4</i>
	<i>% DE DIFERENCIA</i>	<i>0.7</i>	<i>-1.1</i>
3	1710.1	554.6	34.5
	1533.2	588.1	37.6
	1616.6	583.3	39.8
	1658.9	607.9	44.9
	1686.1	651.9	36.9
	1635.6	574.1	33.0
	<i>PROMEDIO</i>	<i>1620.0</i>	<i>593.3</i>
	<i>DES. EST.</i>	<i>62.3</i>	<i>33.6</i>
	<i>% C.V.</i>	<i>3.8</i>	<i>5.7</i>
	<i>% DE DIFERENCIA</i>	<i>-10.0</i>	<i>-1.1</i>
RESULTADOS GLOBALES			
	<i>PROMEDIO</i>	<i>1717.5</i>	<i>594.6</i>
	<i>DES. ESTANDAR</i>	<i>107.4</i>	<i>34.7</i>
	<i>C.V.</i>	<i>6.3</i>	<i>5.8</i>
	<i>% DE DIFERENCIA</i>	<i>-3.5</i>	<i>-0.8</i>

Tabla 13. Resultados de Precisión y Exactitud del método desarrollado

6.2.4. Rango

Se estableció como rango para este método analítico, de 25 a 2000 ng /mL de Diclofenaco ya que se demostró que en este intervalo de concentraciones el método es lineal, exacto y preciso.

6.2.5. Estabilidad de la Muestra en el Disolvente de Inyección

Los resultados de la estabilidad de la muestra en el disolvente de inyección se muestran en la Tabla 14. En esta tabla se puede apreciar que las muestras procesadas son estables durante 48 horas ya que el promedio de las concentraciones obtenidas a las 48 horas no difiere en $\pm 15\%$, del promedio de las concentraciones obtenidas al tiempo cero, y el coeficiente de variación de la concentración interpolada no fue mayor al 15% en los niveles probados.

	CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE DICLOFENACO AL TIEMPO CERO (ng /mL)		
	1777.1	602.6	38.6
	CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE DICLOFENACO A LAS 48 HRS (ng /mL)		
	1768.2	651.6	42.0
	1793.0	645.3	34.0
	1831.1	611.9	39.9
<i>PROMEDIO</i>	<i>1797.4</i>	<i>636.2</i>	<i>38.6</i>
<i>DESV. ESTANDAR</i>	<i>31.7</i>	<i>21.3</i>	<i>4.1</i>
<i>C.V.</i>	<i>1.8</i>	<i>3.4</i>	<i>10.7</i>
<i>% DE DIFERENCIA</i>	<i>1.1</i>	<i>5.6</i>	<i>0.1</i>

Tabla 14. Resultados de la Estabilidad de la muestra en el disolvente de inyección.

6.2.6. Estabilidad de la Muestra a ciclos de Congelación-Descongelación

Los resultados de la evaluación de la estabilidad de las muestras a ciclos de congelación – descongelación (-40 °C – temperatura ambiente) se muestran en la Tabla 15.

	CONCENTRACIÓN ADICIONADA DE DICLOFENACO (ng /mL)		
	1800	600	40
	CONCENTRACIÓN CUANTIFICADA DE DICLOFENACO DESPUÉS DE 3 CICLOS DE CONGELACIÓN /DESCONGELACION (ng /mL)		
<i>PROMEDIO</i>	1804.1	601.4	34.6
<i>DESV. ESTANDAR</i>	87.9	77.6	1.7
<i>C.V.</i>	4.9	12.9	4.9
<i>% DE DIFERENCIA</i>	0.2	0.2	-13.6

Tabla 15. Resultados de Estabilidad a ciclos de congelación – descongelación.

En esta tabla se puede apreciar que las muestras son estables a tres ciclos de congelación-descongelación ya que el promedio de las concentraciones obtenidas no difiere en $\pm 15\%$ del promedio de las concentraciones adicionadas, y el coeficiente de variación de la concentración interpolada no fue mayor al 15% en los niveles probados.

6.2.7. Límite de Detección

En la figura 15 se muestra el cromatograma de una solución de Diclofenaco en plasma a una concentración de 15 ng/mL. En esta figura se puede observar que la señal de Diclofenaco presenta una relación con respecto al ruido entre 1:2 y 1:4. Dado lo anterior, puede considerarse 15 ng/mL como el límite de detección para este método.

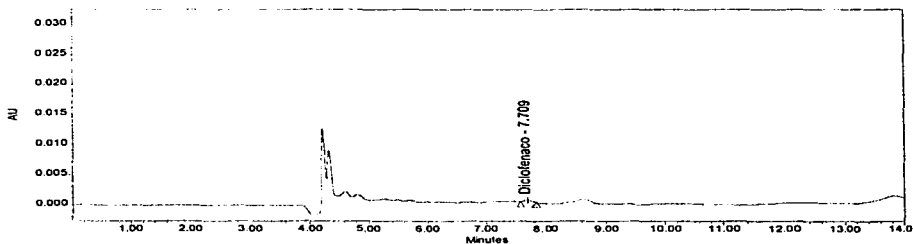


Figura 15. Cromatograma de plasma adicionado de Diclofenaco a una concentración de 15 ng/mL.

6.2.8. Límite de Cuantificación

En la tabla 16 se muestran los resultados de la evaluación del límite de cuantificación.

	CONCENTRACIÓN ADICIONADA DE DICLOFENACO (ng /mL)
	25.0
Réplica 1 Réplica 2 Réplica 3 Réplica 4 Réplica 5 Réplica 6	CONCENTRACIÓN INTERPOLADA DE DICLOFENACO (ng /mL)
	24.3
	25.7
	22.8
	23.4
	23.0
22.3	
<i>PROMEDIO</i>	23.6
<i>DESV. ESTANDAR</i>	1.2
<i>C.V.</i>	5.2
<i>% DE DIFERENCIA</i>	-5.7

Tabla 16. Resultados de la determinación del límite de cuantificación.

En esta tabla se puede apreciar que la diferencia del promedio de la concentración interpolada no es mayor del 20 % respecto a la concentración adicionada de Diclofenaco (25 ng /mL) y que el coeficiente de variación de las 5 réplicas analizadas no es mayor a 20%.

En la figura 16 se muestra un cromatograma correspondiente a una de las réplicas analizadas para determinar el límite de cuantificación en muestras plasmáticas.

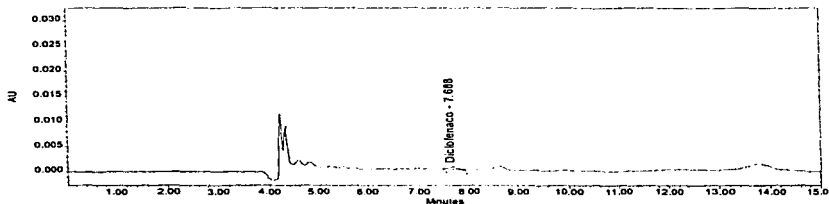


Figura 16. Cromatograma de plasma adicionado de Diclofenaco a una concentración de 25 ng /mL.

Con base en los resultados anteriores se establece como límite de cuantificación para este método la concentración de 25 ng /mL.

7. CONCLUSIONES

- Se establecieron las condiciones experimentales necesarias para cuantificar diclofenaco en plasma humano mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, en un intervalo de concentraciones de 2000 ng / mL a 25 ng / mL.
- El tratamiento de la muestra propuesto es sencillo en términos de manipulación y tiempo de ejecución.
- El sistema de cromatografía empleado proporciona parámetros cromatográficos adecuados, lo cual trae como consecuencia que los criterios de validación determinados muestren que el método desarrollado cumple con los requerimientos de sensibilidad, exactitud y precisión, para ser empleado en el análisis de muestras de estudios de bioequivalencia.
- El método permite detectar de manera confiable hasta 15 ng / mL de Diclofenaco en plasma.
- Las muestras una vez procesadas, son estables hasta por 48 horas a temperatura ambiente.
- Para que el método pueda emplearse en estudios de biodisponibilidad o bioequivalencia se requiere completar la validación realizada.

8. REFERENCIAS

1. Naranjo CA. 1986. A Clinical Pharmacologic Perspective on the Detection and Assessment of Adverse Drug Reactions. *Drug Inf. J.*, 20: 387-393.
2. Naranjo CA, Janecek E. 1989. Drug Development and Regulations. En: Kalant H, Whe Roschlau, (eds.), *Principles of Medical Pharmacology*, Fifth edition, B. C. Decker Inc, Toronto, pp. 723-730.
3. A Survey of Pharmaceuticals. *Molecules and Markets. The Economist*, February 7th, 1987.
4. Welling Peter, Tse Francis, Dighe Shrikant. 1991. Pharmaceutical Bioequivalence Marcel Dekker Inc, New York., pp.1-17.
5. Goodman and Gilman. 1996. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, Novena edición, Mc Graw Hill Interamericana, México DF, vol. 1, pp. 661-704.
6. Florey Klaus, Al-Badr A., Wozniak T. 1990. *Analytical Profiles of Drug Substances*. Academic Press Inc., USA, vol. 19, pp. 123 - 144.
7. José Castell, Roque Bort, Katherine Macé, *et al.* 1999. Hepatic Metabolism of Diclofenac: Role of human CYP in the Minor Oxidative Pathways. *Biochemical Pharmacology*, 58: 787-796.
8. Cárdenas Rodríguez, H. L., Cortés Arroyo, A. R. 1996. Aspectos Biofarmacéuticos de la evaluación de Medicamentos. 1ª ed. UAM, México DF, pp. 20-42.
9. FDA. August 2000. Guidance for Industry: Waiver of in Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System.
10. Burriel Martí, F. Lucena Conde, F. Aribas Jimeno, S. Hernández Méndez J. 1998. *Química Analítica Cualitativa*, 16ª ed. Paraninfo, Madrid, España. pp. 289-371.
11. Jonsson Jan Ake. 1987. *Chromatographic Theory and Basic Principles*. Marcel Dekker, New York, pp. 1-22.
12. Snyder Lloyd R. 1988. *Practical HPLC Method Development*. John Wiley and Sons, USA.
13. Harvey M. C. and Stearns D., 1984. *Liquid Chromatography in Environmental Analysis*. Humana Press, New Jersey, pp. 301-340.
14. Ravindranath B., 1989. *Principles and Practice of Chromatography*. John Wiley and Sons, pp. 354-358.
15. Engelhardt, H. 1986. *Practice of High Performance Liquid Chromatography*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, pp. 4 - 64, 143 - 178.
16. Martin, M., Kraak, J. C. and Guiochon, G. 1978. *Instrumentation for high-performance liquid chromatography*, J. F. K. Huber ed., Elsevier, Amsterdam.
17. Majors, R. E. Boos, K. S. Grimm, C. H. 1996. *Practical Guidelines for HPLC Integrated Sample Preparation Using Column Switching*. LC-GC. 7: 555-560.
18. Henk A. Claessens. 1999. Characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography: column testing, classification and chemical stability. *Eindhoven: Technische Universiteit Eindhoven*, pp. 7 -14.
19. Harvey M. C. and Stearns D. 1983. *HPLC Column Selection Using Valves*. *Liquid Chromatography*, 1(3).
20. Harvey M. C. and Stearns D. May, 1982. *HPLC Injection and column switching*. *Am. Lab.*

21. Chamberlain, Joseph. 1985. Analysis of Drugs in Biological Fluids. CRC Press, pp.25 – 49.
22. NOM-177-SSA-1997. Establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable .Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
23. Weed, D. H. Una aproximación Estadísticamente integrada a la Validación del Método Analítico. *Pharmaceutical Technology*, 4(1): 10-19.
24. ICH. November, 1996.Guidance for Industry Validation of Analytical Procedures.
25. USP 23/NF .1995.United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, M. D.
26. R. Brent Miller. 1993. High-performance liquid chromatographic determination of Diclofenac in human plasma using automated column switching. *Journal of Chromatography*, 616: 283-290.
27. Linda a. Brunner and Richard C. Luders. 1991. An Automated Method for the Determination of Diclofenac Sodium in Human Plasma. *Journal of Chromatographic Science*, 29: 287-291.
28. Hye Suk Lee, Chang Kyun Jeong, Sung Jin Choi, *et al.* 2000. Simultaneous determination of Aceclofenac and Diclofenac in human plasma by narrow bore HPLC using column-switching. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23: 775–781.
29. S.L. Morganton's, Giagoudakis. 1998. An alternative high-performance liquid-chromatographic method for the determination of Diclofenac and Flurbiprofen in plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17: 897–901.
30. J.S. Millership, L.G. Hare, *et al.* 2001. The use of hydrophilic lipophilic balanced (HLB) copolymer SPE cartridges for the extraction of Diclofenaco from small volume paedriatic plasma samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25: 871–879.