

50524
15



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**DETERMINACIÓN DE ANÁLOGOS DE
DOPAMINAS (LEVODOPA Y
CARBIDOPA) POR CROMATOGRFÍA
DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
JOSÉ JESÚS BORBÓN BALTAZAR

ASESOR: M. EN. C. VICENTE HERNÁNDEZ ABA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FEBRERO DEL 20



A



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.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

AL MAESTRO VICENTE HERNANDEZ ABAD POR SER MI CONSEJERO, GUIA,
MAESTRO Y AMIGO.

A LA Q.F.B. AURA N. ARMAS SALAS POR SER MI CONEXION A TIERRA
DESDE QUE TENGO MEMORIA.

A MI FAMILIA MAS CERCANA POR SU ETERNO APOYO, EN ESPECIAL A
LUIS (I Y 2) Y NELLY WELBANKS, ESTHELA Y ED RANGER Y ESPERANZA
BALTAZAR.

A MIS FAMILIARES DE OAXACA Y SONORA.

A MI TIO ENRIQUE Y MI ABUELA THAYDE POR CUIDARME DESDE EL
CIELO.

A MIS ABUELOS JOSE Y ESTHELA BORBON.

A TODOS LOS MAESTROS Y COMPAÑEROS DE LA SECUNDARIA IIS
GENERACION 89-92.

A MIS AMIGOS DE LA FACULTAD: RICARDO MEDINA, HECTOR FLORES,
JUAN HERNANDEZ Y MARIO MENDOZA.

A LOS PROFESORES ANGEL ZAMORANO, JOSE PONCE, MAURO ARRIETA Y
ESTHELA VALENCIA.

A MI ALMA MATER, LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO POR FORMARME EN TODO SENTIDO.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE MSD, EN ESPECIAL A HCS, LEA, LHR,
IAA, APM, GPG, CMP, EDIC, MISC, ACC, Y CIARO, A JVO.

A DON CANO GODINEZ POR ESTAR SIEMPRE CONMIGO.

A PER & MARIE POR MANTENERME A FLOTE DESDE LOS 11 AÑOS.

A MAMA ROSA POR SU AMOR Y HE NO TENGO PALABRAS PARA
EXPRISAR MI AGRADECIMIENTO Y CARINO.

A MI PADRE, DR. JOSE J. BORBON POR SU APOYO Y CARINO.

A DIOS POR PACIENTEMENTE MOSTRARME EL CAMINO.

FINALMENTE, DEDICO ESTE TRABAJO Y LA CARRERA ENTERA A MI
MADRE, QUIEN HA ESTADO CONMIGO DESDE EL PRINCIPIO Y NUNCA
HA DEJADO DE TENERME EN MI. GRACIAS, TE QUIERO MUCHO.

B

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Marco teórico.....	3
3.1 Objetivos.....	7
3.2 Dopamina y análogos.....	8
3.3 Técnicas de detección-cuantificación.....	15
3.4. Técnica analítica para determinar levodopa/carbidopa en fluidos biológicos por cromatografía de líquidos de alta resolución.....	26
3.5. Validación del método cromatográfico.....	42
4. Conclusiones.....	47
5. Referencias bibliográficas.....	48

1. RESUMEN

A partir de una revisión bibliográfica, se propone una técnica analítica mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, para la determinación y cuantificación de análogos de dopamina (carbidopa y levodopa) en fluidos biológicos (orina y sangre), ofreciendo además costos que derivan de dicha técnica y comparándolos con un presupuesto para el mismo análisis por la técnica de cromatografía de gases.

Dicha técnica posee un carácter de protocolo de investigación teórico y no fue aplicada de forma experimental, sin embargo, a partir de ella se establece que la cromatografía de líquidos de alta resolución es más económica que la cromatografía de gases en el análisis de análogos de dopaminas, además de ser eficaz y similar en cuanto a sensibilidad se refiere. La técnica propuesta abarca desde la extracción de analitos a partir de muestras biológicas hasta su cuantificación por HPLC y su aplicación resulta en la reducción del costo preestablecido para la detección y cuantificación rutinaria de análogos de dopamina. Por otro lado, ofrece parámetros que orientan a la validación del método, listo para su ejecución.



2. INTRODUCCIÓN

Dentro de las especialidades de la Química Legal, la toxicología es quizás una de las más importantes.

La determinación de la presencia de sustancias ajenas a un organismo y su implicación en presuntos hechos delictivos, es la razón que origina que cientos de técnicas analíticas sean creadas y validadas año tras año, con el objetivo de optimizar la capacidad de detección de dichas sustancias, así como su efectividad, tiempo de estudio, etc.

Dentro de estas técnicas, se encuentra la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en la cual se propone el análisis de cientos de sustancias con un gran margen de detección, poco tiempo de análisis, bajo costo relativo de operación y mantenimiento.

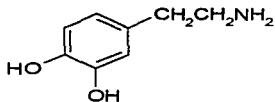
Sin embargo, dentro del ámbito legal, esta técnica no ha sido aplicada en toda la extensión de su capacidad, debido a la falta de métodos validados de detección de sustancias tóxicas o ajenas al organismo.

Por lo tanto, se propone un método, basado en la técnica de HPLC, que permita determinar análogos de dopamina, y dado que en la actualidad la presencia de estos compuestos se determina por cromatografía de gases, se pretende demostrar que la HPLC es una técnica más eficaz, económica en operación, mantenimiento, además de la sensibilidad que presenta con respecto a la cromatografía de gases.

3. MARCO TEÓRICO¹⁻³

DOPAMINA.

La dopamina o 4-(2-Aminometil)-pirocatecol es una base libre, que se encuentra por lo general en forma de prismas altamente sensibles al oxígeno, que se decolora rápidamente al contacto con dicho gas, es muy soluble en agua, volátil (con un punto de fusión ~200°C) y se cataloga como un compuesto adrenérgico.



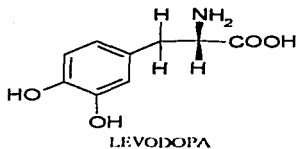
DOPAMINA

Sin embargo, la base del presente estudio no es la dopamina propiamente, ya que su uso se encuentra restringido y no es tan común como el de sus análogos, carbidopa y levodopa.

LEVODOPA.

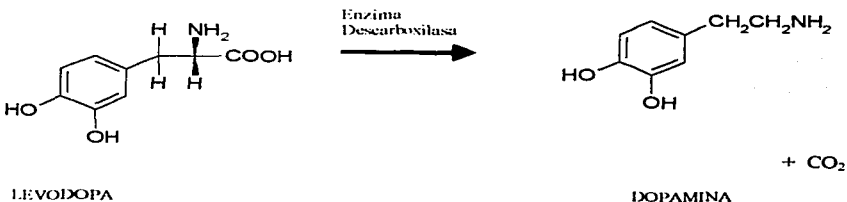
La levodopa o L-dopa se encuentra naturalmente en forma de dopa, es decir, como el precursor biológico de las catecolaminas. Es un polvo blanco o incoloro, sin olor, ni sabor. Es soluble en agua, volátil y muy soluble en soluciones ácidas, e insoluble en soluciones alcohólicas.

Su uso comercial es como anticolinérgico o como agente de tratamiento contra el mal de Parkinson.

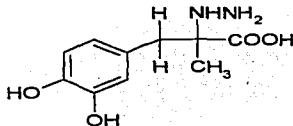


La levodopa administrada por vía oral por si sola, sufre una rápida descomposición (descarboxilación).

REACCIÓN DE DESCARBOXILACIÓN DE LEVODOPA



Es por ello, que la administración combinada de levodopa con carbidopa resulta en una mayor estabilidad y por lo tanto en una efectividad superior.



CARBIDOPA

Ambos análogos de la dopamina, la carbidopa y levodopa, se cuantifican con la finalidad de determinar su implicación en presuntos hechos delictivos por la técnica de cromatografía de gases, en la cual, uno de los requisitos principales que debe poseer el analito a ser analizado, es que sea volátil, propiedad que presentan los compuestos antes mencionados.

La cromatografía de gases es una técnica de separación cuyo sistema consta, básicamente de una fase móvil en forma de gas inerte y una fase estacionaria, siendo ésta, generalmente un sólido o un líquido que recubre a un sólido. La interacción del analito con ambas fases es lo que determina la capacidad de la técnica para separar al compuesto de interés y cuantificarlo, si es necesario.

En la cromatografía de gases, la fase móvil o acarreadora es un gas, y por ello, necesariamente la muestra a analizar por esta técnica debe de ser volátil y estable a altas temperaturas.

La cromatografía de líquidos de alta resolución, presenta más diferencias respecto a cromatografía de gases. Una de estas diferencias, es el uso de una fase móvil líquida.

El uso de la cromatografía de líquidos de alta resolución es tan común como la cromatografía de gases en otras áreas e incluso mayor, debido a su alta sensibilidad y capacidad de detección de diversos compuestos; sin embargo, su uso en el ámbito legal no es tan extenso debido a la falta de técnicas validadas de detección de analitos de naturaleza ilegal.

En el ámbito de Química legal, específicamente en el área de la toxicología, el interés de estudio de los análogos de dopamina radica en que si se emplean dichos compuestos de forma irresponsable y fuera del marco legal, lo cual puede llevar a la realización de hechos delictivos.

Así mismo, se pretende demostrar que la cromatografía de líquidos ofrece una sensibilidad comparable a la de cromatografía de gases, aunque a un costo reducido en términos económicos, humanos, técnicos y de tiempo, manteniendo en todo momento la perspectiva que ofrece el ámbito legal rodeando este tipo de determinaciones.

3.1. OBJETIVOS

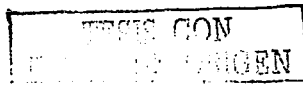
- Realizar un estudio bibliográfico comparativo de las distintas técnicas cromatográficas para la cuantificación de análogos de dopaminas.
- Proponer una técnica cromatográfica (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución) la cual permita detectar y cuantificar levodopa y carbidopa en fluidos biológicos, para confirmar presuntos hechos delictivos.
- Establecer los parámetros para la posible validación de la técnica propuesta y su posterior aplicación.

3.2. DOPAMINA Y ANÁLOGOS³⁻⁸

El sistema nervioso central contiene sistemas neuronales separados que utilizan tres diferentes tipos de catecolaminas: dopamina, noradrenalina y adrenalina. Cada sistema, así como cada tipo de catecolamina posee diferentes mecanismos y sistemas de enervación.

La dopamina en un principio fue clasificada solamente como un precursor de la noradrenalina sin función alguna. Después se determinó que la mitad del contenido de catecolaminas en el sistema nervioso central son dopaminas.

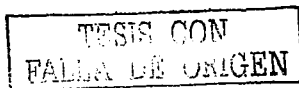
Como mensajero bioquímico, la dopamina es similar a la adrenalina; afecta procesos cerebrales que controlan el movimiento, respuesta emocional y habilidad para experimentar placer y dolor. La regulación de la dopamina juega un papel crucial en la salud física y mental de las personas. Las neuronas que contienen al neurotransmisor dopamina se encuentran en una región en el mesencéfalo llamada sustancia negra. En el mal de Parkinson, las neuronas transmisoras de dopamina ubicadas en esta área mueren. Como consecuencia, los pacientes con este mal no producen dopamina. Este problema puede, en algunos casos remediarse administrando levodopa, fármaco que puede convertirse en dopamina. Estructuralmente, la dopamina es un precursor inmediato metabólico de la noradrenalina y adrenalina. Se sintetiza en las terminales de las neuronas dopaminérgicas a partir de la tirosina; el paso limitante en esta reacción es la conversión de L-tirosina a L-dopa, catalizada por la enzima tirosina-descarboxilasa presente en dichas neuronas.



Así mismo, la L-dopa se convierte rápidamente en dopamina gracias a la L-aminoácido-hidroxilasa. La liberación de la dopamina se produce por exocitosis de las vesículas presinápticas y farmacológicamente, este compuesto es útil en el tratamiento de algunos tipos de trauma.

Algunos fármacos son conocidos como agonistas de dopamina. Estos, se unen a los receptores dopaminérgicos y los estimulan para incrementar la cantidad de dopamina en las neuronas transmisoras. En contraste, los antagonistas de dopamina, son fármacos que se unen a los receptores dopaminérgicos sin estimularlos. Estos fármacos tienen como función principal reducir la cantidad excretada de dopamina, resultando esto sumamente útil en enfermedades como la esquizofrenia.

Los efectos fisiológicos de la dopamina son dosis-dependientes. La dopamina estimula los receptores renales D-1 produciendo una vasodilatación renal con aumento del flujo renal glomerular, excreción de sodio y diuresis. Un aumento en la dosis (aproximadamente a 3-10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) puede producir estimulación de los receptores β -1, produciendo un aumento del gasto cardíaco, presión arterial y resistencia vascular. Este aumento de la presión arterial puede conllevar a la vasoconstricción renal extrema con las consecuencias que esto acarrea.



El estudio de la dopamina exógena, derivó en estudios acerca de su análogo, la levodopa o L-dopa, mismos que hacia la década de los 60's indicaban que la L-dopa reducía significativamente los síntomas del mal de Parkinson por la transformación de la misma en dopamina.

La levodopa alivia los síntomas de la enfermedad de Parkinson, al ser transformada en dopamina en el cerebro por descarboxilación.

La carbidopa, que no atraviesa la barrera hematoencefálica, inhibe la descarboxilación inmediata de la levodopa en el intestino, dejando así una mayor cantidad de levodopa para ser transportada al cerebro y ser transformada posteriormente en dopamina.

La levodopa se absorbe rápidamente en el conducto gastrointestinal y se metaboliza ampliamente. Aunque se pueden formar más de 30 metabolitos, se convierte principalmente en dopamina, adrenalina y noradrenalina. En el plasma y líquido cefalorraquídeo aparece 3-O-metildopa, cuya función se desconoce.

Las reacciones secundarias de la administración de levodopa con carbidopa son hipotensión, somnolencia, vómito, mareo, confusión, alucinaciones, ansiedad, agitación, debilidad, desmayos y fatiga.

La dosificación máxima recomendada de levodopa es 30 mg/kg de peso.

La concentración mínima esperada en cada uno de los fluidos biológicos puede ser determinada siguiendo los parámetros farmacocinéticos de la levodopa, realizando un estudio bibliográfico y con la revisión de las investigaciones en las cuales se basa el presente.

Los parámetros farmacocinéticos para la levodopa son:

Biodisponibilidad (oral) (%): 41 ± 16

Excreción urinaria (%): < 1

Depuración ($\text{mL} \times \text{min}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$): 23 ± 4

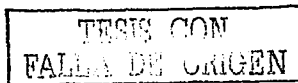
Volumen de distribución (litros/kg): 1.7 ± 0.4

Vida media (hrs): 1.4 ± 0.4

Concentración efectiva: $8 \pm 3 \text{ nmol/mL}$

La levodopa, como se dijo con anterioridad, se administra vía oral en conjunción con carbidopa. El medicamento líder que ofrece ambos compuestos es Sinemet® y se presenta en dosis de 250/25 mg (levodopa: carbidopa 250: 25), dosis que se empleó como referencia para inicial la investigación.

Así, las concentraciones esperadas en muestras de fluidos biológicos después de una administración de Sinemet® 250/25 mg en pacientes con mal de Parkinson bajo tratamiento son de 75 ng/mL para la levodopa y 2 ng/mL de carbidopa. Los datos anteriores, son altamente similares a los obtenidos por Titus⁹, por lo que se presume que los análogos de dopamina serán ampliamente cuantificables, basándose en la dosificación establecida.



Si bien la Ley General de Salud Mexicana, en su capítulo VI, artículo 245, cataloga a la levodopa y a la carbidopa como psicotrópicos con amplios usos terapéuticos, constituyendo un problema menor de salud pública, no se puede pasar por alto el Código Penal Mexicano, el cual en su Título séptimo –Delitos contra la salud- Capítulo I, Artículo 193, estipula que “Se consideran narcóticos a los estupefacientes, psicotrópicos y demás sustancias o vegetales que determinen la Ley General de Salud...”, así mismo, “Los narcóticos empleados en la comisión de los delitos a que se refiere este capítulo, se pondrán a disposición de la autoridad sanitaria federal, la que procederá de acuerdo con las disposiciones o leyes de la materia a su aprovechamiento lícito o a su destrucción.”. Mientras que en su Artículo 194, se hace mención de que “Se impondrá prisión de diez a veinticinco años y de cien hasta quinientos días multa al que:

I. Produzca, transporte, trafique, comercie, suministre aún gratuitamente o prescriba alguno de los narcóticos señalados en el artículo anterior, sin la autorización correspondiente a que se refiere la Ley General de Salud...” y, “Para los efectos de esta fracción, por producir se entiende: manufacturar, fabricar, elaborar, preparar o acondicionar algún narcótico, y por comerciar: vender, comprar, adquirir o enajenar algún narcótico.”. Finalmente, dicho Código en su Artículo 195 cita: “Se impondrá de cinco a quince años de prisión y de cien a trescientos cincuenta días de multa, al que posea alguno de los narcóticos señalados en el artículo 193, sin la autorización correspondiente a que se refiere la Ley General de Salud.



Siempre y cuando esa posesión sea con la finalidad de realizar alguna de las conductas previstas en el artículo 194."

Con base a lo anterior, se puede definir a la levodopa/carbidopa como sustancias de abuso bajo ciertas circunstancias y posibles fármacos a utilizar en presuntos hechos delictivos, como se describirá a continuación:

Partiendo del hecho que la levodopa es un compuesto incoloro, insípido y sin olor característico, además de soluble en agua, es fácil disolverlo en alguna bebida para ofrecerla a determinado individuo, que al sufrir los efectos de dicho fármaco, sucumbirá a un estado de sueño profundo (posible reacción adversa), en el cual será presa fácil del victimario o puede sufrir estragos a nivel cardíaco que resulten en la muerte del individuo o bien, pueden presentarse otras conductas delictivas. Así lo demuestran algunos casos denunciados en el periodo de 1993-1997, estudiados para el presente trabajo. En un caso denunciado en el año de 1993, un hombre de 65 años de edad, bajo la influencia del fármaco levodopa presentó un cuadro de hipersexualidad, que condujo a la violación de una menor. En otro caso, reportado en 1997, un hombre de 73 años de edad fue víctima de homicidio por sobredosis de levodopa al presentar síndrome neuroléptico maligno, mismo que responde a una reacción hipermetabólica a los agonistas de la dopamina. Los signos característicos de este síndrome son rigidez muscular, taquicardia, hipertensión, alteraciones del estado mental y disfunción del sistema nervioso autónomo. Las anomalías de laboratorio son acidosis respiratoria y metabólica y leucocitosis. La mortalidad ronda el 30%, presentándose concretamente en este caso.

Otro tipo de uso, aunque menos frecuente para este fármaco, es su administración previa a una competencia deportiva, misma que ayudará al atleta a obtener un estado de relajación necesario para maximizar su desempeño.

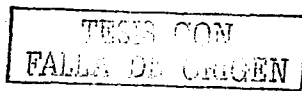
Debido a que las situaciones expuestas, concuerdan con la definición de uso "fuera del marco legal" para levodopa y carbidopa según el Código penal mexicano, el papel del perito correspondiente es determinar la presencia de dichos compuestos en los individuos y proceder según lo establezca la Ley.

Para determinar la presencia de levodopa y/o carbidopa, se utilizan pruebas presuntivas y confirmativas, mismas que utilizan técnicas de detección descritas en el siguiente apartado.

3.3. TÉCNICAS DE DETECCIÓN-CUANTIFICACIÓN DE DOPAMINA Y SUS ANÁLOGOS^{2,8}

Generalmente, al definirse los signos o síntomas de una posible intoxicación por catecolaminas (levodopa / carbidopa), se puede realizar un rápido análisis presuntivo o *screening* para la detección o determinación de presencia de este tipo de compuestos en fluidos biológicos. Estas pruebas se realizan de forma rápida y sencilla con el único fin de determinar si cierto tipo de compuestos se encuentra presente en un sistema. Generalmente, éstas son pruebas colorimétricas o de inmunoensayo. La variable de respuesta en cada una de ellas, no es un porcentaje o cantidad específica de compuesto presente, sino un color o una reacción de aglutinación, tal como se observa en las determinaciones antígeno-anticuerpo. Cabe señalar que estas pruebas son presuntivas y no confirmativas, ya que su función es detectar un cierto grupo funcional, mismo que puede estar presente en diversos compuestos. Una vez que se ha determinado que el grupo funcional se encuentra presente, se puede realizar una prueba confirmativa que demuestre fehacientemente que un individuo ha consumido un fármaco que contenga dopamina o alguno de sus análogos. Para lograr lo anterior, se utiliza generalmente la técnica de cromatografía de gases - masas.

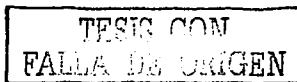
La cromatografía, como prueba confirmativa, es una técnica desarrollada a principios del siglo XX que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla.



En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual, los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil, siendo ésta un gas o líquido y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido. De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, la cromatografía se divide en cromatografía de partición, de adsorción, de intercambio iónico y de exclusión.

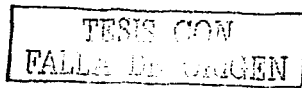
La cromatografía de gases, a su vez, se subdivide en cromatografía gas-líquido (partición) y gas-sólido (adsorción). En la cromatografía de gases, la fase móvil es un gas y la estacionaria es un sólido o un líquido no volátil. En la primera, el proceso de separación se lleva a cabo por adsorción entre el gas que transporta al soluto y el soporte, que puede ser alúmina, sílica gel, carbón, etc. y en la segunda, la partición se realiza entre una fase estacionaria líquida que cubre a un sólido inerte y el gas que transporta al soluto. Cuando se introduce una sustancia en la corriente del gas, ésta se volatiliza por la elevada temperatura y de esta manera es transportada por el gas acarreador a lo largo de la columna donde se distribuye entre las fases sólida y líquida. Este proceso de partición entre ambas fases está definido como el factor de capacidad, establecido, bien sea por la cantidad o por el tiempo de residencia de la sustancia en cuestión entre las fases respectivas.

El aparato básico para la cromatografía de gases (Figura 1) es relativamente simple.



El gas transportador, generalmente está disponible en cilindros que tienen una válvula para regular la presión del gas, el cual es conducido hacia un medidor, mismo que permite el control adecuado de la velocidad de flujo del gas requerida para el análisis de una mezcla en particular.

Los gases más utilizados como transportadores son el helio, nitrógeno y otros gases inertes, dependiendo su elección de las características del detector con que cuenta el aparato. Las muestras se inyectan con una jeringa a través de un sello de hule o silicón que se encuentra en el puerto de inyección. La columna generalmente es de vidrio o metal y está localizada en un horno que se mantiene a una temperatura seleccionada, la cual determina el tiempo de retención y en cierta manera la resolución y la eficacia de la separación. Un componente que programe y regule la temperatura permite una elución eficiente de los compuestos sobre un amplio rango de presión de vapor. Cuando los componentes salen individualmente de la columna, pasan a través del detector, el cual indica la cantidad de cada uno de ellos. El uso de un determinado detector depende de cada sustancia y se especifica en la monografía individual. Las señales del detector pasan a través de un amplificador, electrómetro o transductor que está conectado a un aparato automático que grafica la señal; esta gráfica resultante es el cromatograma, el cual se emplea para determinar la identidad y concentración de cada componente en una mezcla. Los detectores más comúnmente utilizados en cromatografía de gases son los de conductividad térmica, ionización a la flama, captura de electrones y espectrometría de masas.

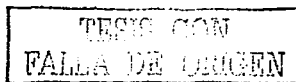


A menos que se defina el uso de otro tipo, el uso del detector de ionización a la flama es lo más recomendado, ya que dicho detector es sensible a todos los compuestos de carbono y tiene un rango amplio y dinámico. El detector de captura de electrones es también selectivo mostrando respuesta pequeña a los hidrocarburos y respuestas extremadamente altas a algunos compuestos como aquellos que contienen halógenos o cetonas.

La velocidad de flujo del gas transportador es aquella con la que el gas sale de la columna, y es expresada usualmente en mililitros por minuto a la presión atmosférica y temperatura ambiente. Por lo general, una velocidad de flujo de entre 30 y 60 mL/min es recomendable para la mayoría de los compuestos.

En cuanto a columnas se refiere, en cromatografía de gases se emplean columnas empacadas y la manera en que se ha llevado a cabo el empaque tiene influencia en el movimiento relativo de los solutos a través del sistema. Generalmente son de vidrio y de dimensiones de 0.6 a 1.8 metros de longitud y de 2 a 4 mm de diámetro interno. Las fases líquidas de empaque son, por lo general polímeros y los soportes sólidos internos, derivados de tierra diatomea calcinada y lavada con ácido.

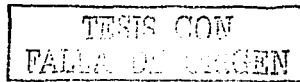
La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) es la técnica de separación que involucra la interacción entre la fase móvil líquida y la fase estacionaria generalmente sólida. La migración diferencial en la CLAR es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil.



Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta son acarreados por la fase móvil y en el orden en el que emergieron son detectados y registradas sus áreas y tiempos de retención en la columna. El cromatograma resultante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico, por lo que este tiempo puede bien emplearse para identificar el compuesto. Este tiempo de retención se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma.

En la cromatografía de partición en columna, la adsorción se lleva a cabo en la superficie del sólido polar con el cual es empacada la columna, mientras que en la partición de fases inversa, el adsorbente polar se transforma en no polar por silanización u otros medios, como tratamiento con parafinas, mientras que la fase fija adsorbida es menos polar que la fase móvil. En la cromatografía de partición de fases inversa, la elución selectiva de los componentes de una mezcla puede hacerse a menudo mediante cambios sucesivos de la fase móvil o modificando el pH de la misma, consistente en una solución de un ácido o una base adecuados en un disolvente orgánico.

La cromatografía de intercambio iónico se puede considerar como una forma especial de cromatografía en la que la fase sólida contiene un material cambiador de iones, generalmente llamado resina de intercambio iónico. El intercambio de iones consiste en el intercambio reversible del ion presente en la solución como un ion del polímero resinoso, celulosa modificada o soporte de gel de sílice.



La elección de las resinas dependerá en gran parte del pH en el cual deba realizarse el intercambio y de que cationes o aniones haya que intercambiar. El coeficiente de selectividad indica la preferencia con que una resina de intercambio iónico fija dos o más iones de una solución. En general, la resina fijará de preferencia iones bivalentes (o multivalentes) que iones monovalentes.

Esencialmente, un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Figura 2) consta de las siguientes partes:

- a) Sistema de bombeo. Tiene por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna y debe cumplir ciertas especificaciones de reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo constante.
- b) Sistema de inyección. Un factor muy importante para obtener una buena resolución en la separación es la adecuada introducción de la muestra en el sistema. Existen varios mecanismos de inyección. El más sencillo consiste en introducir la muestra como en la cromatografía de gases, es decir mediante una jeringa, misma que tiene que soportar la presión del sistema, aunque hay dispositivos que desvían o suspenden el flujo del disolvente mientras se introduce la muestra reanudándolo posterior a la inyección mediante un sistema de válvulas. Un sistema que reduce errores en la introducción de la muestra consiste en un inyector automático, mismo que ayuda a mantener la reproducibilidad entre inyecciones y elimina el error en la medición del volumen a inyectar.

c) **Detector.** Puede ser de dos tipos: aquellos que miden alguna propiedad del soluto y la fase móvil como por ejemplo, índice de refracción y aquellos que miden alguna propiedad del soluto únicamente, como absorción al ultravioleta o fluorescencia. La selección del detector estará basada en las propiedades del o los solutos que se deseen analizar. Los detectores más empleados son: ultravioleta, de índice de refracción, electroquímico, infrarrojo, fluorescencia y radioactividad.

d) **Columna.** Se considera a la columna como la parte fundamental de la cromatografía ya que es en ésta donde se lleva a cabo la separación. El material de empaque seleccionado dependerá básicamente de la separación que se desee hacer. Las dimensiones de la columna dependerán también del proceso de separación.

Al aumentar la longitud aumenta el número de platos teóricos o puntos de equilibrio donde se lleva a cabo la separación y por lo tanto, se obtiene una mayor resolución.

e) **Registrador de señales.** El uso de integradores electrónicos que registran el ancho y altura de los picos en un cromatograma evita errores en la medición de áreas formadas por dichos picos.

Para ambos tipos de cromatografía, los parámetros que definen la posible identificación o separación de un compuesto en un cromatograma, son los siguientes:

Tiempo de retención. Se define como el tiempo en que tarda en aparecer la señal del compuesto a determinar a partir de su inyección al equipo.

Platos teóricos. Es una representación de equilibrios o puntos de extracción establecidos en el interior de una columna. Se determinan mediante la fórmula:

$$N = 16 (t^2 / W)$$

Donde N representa el número de platos teóricos, t es el tiempo de retención del compuesto y W es el ancho de la base del pico obtenido extrapolando los lados del pico hasta la línea base.

Resolución. Es la medida de la eficiencia de separación de dos componentes en una mezcla. Se determina mediante:

$$R = 2 ((t_2 - t_1) / (W_2 - W_1))$$

Donde t son los tiempos de retención de los compuestos y W, sus anchos de pico.

Factor de capacidad. Es el proceso de partición entre fases estacionaria y móvil. Se determina por:

K_D = Cantidad de sustancia en fase estacionaria / Cantidad de sustancia en fase móvil

Las diferencias entre ambas técnicas, como se señaló, además del uso de una fase móvil diferente, es el tipo de sistema empleado para cada una.

La cromatografía de gases debido a la necesidad de vaporizar la muestra para su análisis, requiere de un horno que alcance temperaturas superiores a los 100 o 200°C. El tipo de columna que contiene a la fase estacionaria también difiere.

La cromatografía de gases anteriormente utilizaba columnas empacadas con una fase sólida antes de utilizar un líquido dentro de dicha columna que alcanza dimensiones, en algunas ocasiones, superiores a los 5 o 10 metros. El tipo de detector en gases es, ocasionalmente, algún sistema acoplado al cromatógrafo. Para determinaciones de análogos de dopamina, específicamente, se utiliza de manera general un espectro de masas.

En la cromatografía de líquidos, el horno que rodea a la columna no llega a rebasar los 100°C, generalmente. La columna está empacada con algún tipo de sílice, es decir, fase sólida empacada. Las dimensiones de la misma son en centímetros, mientras que el detector es una lámpara de UV o en el caso de catecolaminas, un detector electroquímico.

Los costos también varían de técnica a técnica. Por mencionar algunos, la fase móvil en gases puede costar de dos a cinco veces más que en líquidos. Un caso similar es el tipo de columna empleada.

En gases, la columna puede llegar a costar en promedio miles de dólares, mientras que en cromatografía de líquidos las columnas empacadas no rebasan algunos cientos de dólares. Los equipos cromatográficos en general son costosos, sin embargo, este costo puede verse duplicado, triplicado o multiplicado varias veces dependiendo de la sensibilidad de detección deseada.

Si bien la sensibilidad se ve seriamente aumentada en los equipos de gases con sistemas acoplados (como masas) hasta llegar incluso a la detección de partes por trillón de analito en casos especiales, como el presente, donde la dosis máxima diaria recomendada es de 30 mg de levodopa por kg de peso, podemos suponer concentraciones en fluidos biológicos de magnitudes de partes por millón o billón, es decir, la máxima sensibilidad de detección no es necesaria.

Como parte final, a continuación se muestran diagramas generales de la estructuración de equipos cromatográficos de gases y líquidos (Figuras 1 y 2).

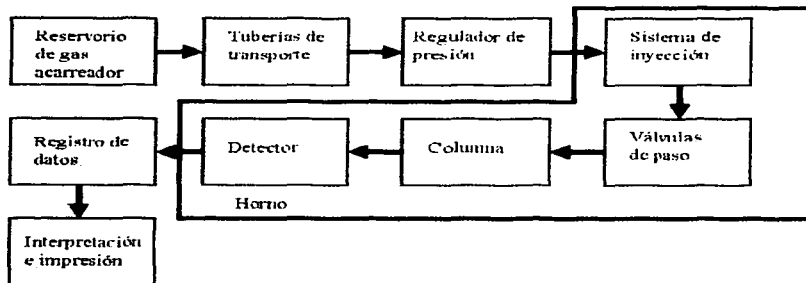


FIGURA 1. ESTRUCTURA GENERAL DE UN CROMATÓGRAFO DE GASES.

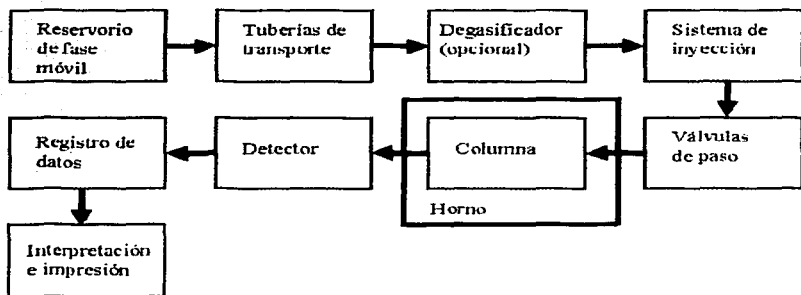


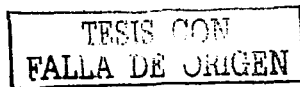
FIGURA 2. ESTRUCTURA GENERAL DE UN CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.

3.4. TÉCNICA ANALÍTICA PARA DETERMINAR LEVODOPA / CARBIDOPA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

El estudio de las catecolaminas no es nuevo, su estudio analítico se comienza a desarrollar desde finales de los 70's, con la introducción y gran difusión del cromatógrafo de gases y el uso terapéutico de la levodopa. Los primeros registros muestran estudios burdos con técnicas de extracción que exhiben niveles de recobro por debajo del 60%, con una técnica de extracción obsoleta.

Hacia finales de los 80's, la técnica de HPLC fue adquiriendo gran aceptación gracias a su facilidad de manejo de reactivos y sensibilidad de detección.

Las comparaciones en este sentido son inevitables, basta estudiar de cerca el caso analizado por Boutagy¹⁰. En su trabajo, publicado en 1978, se da una introducción a la cromatografía de gases utilizando una fase estacionaria líquida. Propone una técnica sumamente escasa en cuanto a resultados efectivos y poder analítico. El autor propone básicamente un protocolo de investigación que sería retomado años después por otros científicos, con el afán de explorar la posibilidad de determinar la presencia de catecolaminas en fluidos biológicos por algún método cromatográfico. El estudio de Boutagy presenta problemas de extracción, mismos que serían resueltos años después con el uso de alúmina; también se enfrenta a la alta inestabilidad de la muestra, a puntualizar la presión requerida en el equipo de cromatografía de gases y aún bajo recobro de la muestra.



En 1987, Mefford¹¹, investigó la extracción de catecolaminas de fluidos biológicos utilizando alúmina en dichas extracciones. Su estudio se basa en la detección y cuantificación amperométrica de las catecolaminas con el uso de estándar interno, esta técnica sería empleada en repetidas ocasiones en el futuro, siendo la base para nuestro estudio. El principio de la extracción con alúmina persiste hasta nuestros días cuando se determinan catecolaminas en fluidos biológicos. Esta investigación trata a la vez, fluido cefalorraquídeo, orina, plasma y tejido cerebral, además de utilizar la resina experimental Igepon T-77 para enriquecer la muestra y obtener una mayor respuesta analítica. La investigación aplica principios que se utilizarán de forma rutinaria hacia 1998, tales como la detección electroquímica en HPLC y es así, como Koch¹², He¹³, entre otros, deciden optimizar técnicas de extracción o análisis para la determinación de catecolaminas en fluidos biológicos. Recientemente, en cromatografía de líquidos de alta resolución, se estudia el uso de resinas orgánicas para empacar columnas, reduciendo así, los tiempos de análisis. Tal es el caso de Prauda¹⁴, quien en su estudio reduce tiempos de corrida de 40 a 14 minutos, manteniendo los parámetros analíticos de los demás estudios, tales como detección electroquímica, extracción con alúmina y puntualización de pH de fase móvil. Si bien significa esto una reducción en tiempos de análisis, horas-hombre y recursos, la columna empacada con el correcto tipo de resina logra equilibrar costos e incluso incrementarlos.

Sin embargo, la mayoría de los avances tecnológicos como el uso de resinas, o técnicas automatizadas de extracción involucran un mayor costo de operación al momento de determinar catecolaminas en fluidos biológicos.

Para realizar un estudio comparativo de las técnicas que no involucran grandes avances tecnológicos, se deben investigar los requerimientos básicos para llevar a cabo el análisis, sin prescindir de la sensibilidad de la técnica, que si bien se ve incrementada con recursos de mayor capacidad, esto puede aumentar las horas-hombre involucradas en el análisis, el presupuesto determinado para llevar a cabo la determinación o el requerimiento de equipo especializado para ello.

Es por lo anterior, que se presenta el cuadro 1 acerca de las técnicas analíticas con características cromatográficas similares.

Cuadro 1. Comparación de técnicas cromatográficas (CLAR) para la determinación de catecolaminas en fluidos biológicos

ESTUDIO		PROPIEDADES DE EQUIPO HPLC		OBSERVACIONES	
		DETECTOR	COLUMNA	FASE MÓVIL	
Huabing ¹⁵		Electroquímico	C ₁₈	Amortiguadora de fosfatos: Acetonitrilo (98: 2)	Límite de detección de 12 pg/mL gracias a extracción con alúmina. Muestra: plasma.
Pastoris ¹⁶		Electroquímico	C ₁₈	Amortiguadora de acetatos: Metanol: Agua (88: 11: 1)	Tratamiento rápido de la muestra, extracción con compuesto bórico. Límite de detección: 250 pg/mL.
He ¹³		Electroquímico	C ₁₈	Amortiguadora de acetatos o fosfatos, metanol, agua y acetonitrilo; distintas proporciones	La fase móvil que permite la mejor resolución y cuantificación es solución amortiguadora de acetatos y acetonitrilo, con proporción no definida.
Dethy ¹⁷		Electroquímico	C ₁₈	Amortiguadora de fosfatos: metanol (80: 20)	Límite de detección 0.4 nM/mL, gracias a extracción por microdiálisis.
Van Hoorn ¹⁸	der	Fluorométrico, electroquímico (comparación entre ambos)	C ₁₈	Amortiguadora de fosfatos: Acetonitrilo: Metanol (50: 40: 10)	Límite de detección 3 pg/mL por detección fluorométrica, 10 pg/mL por detección electroquímica Compleja extracción de más de 24 horas de proceso.
Ganhao ¹⁹		Electroquímico	ODS	Solución amortiguadora de fosfatos	Límites de detección por arriba de los 100 ng/mL gracias a extracción sencilla y poco eficiente. Muestra: plasma.
Dutton ²⁰		Electroquímico	C ₁₈	Solución amortiguadora de fosfatos	Límite de detección: 50 ng/mL. Extracción sencilla con alúmina con tiempo de proceso de 25 minutos Muestras plasmáticas y urinarias.

Observando el cuadro anterior, las similitudes entre técnicas radican en las condiciones cromatográficas (columna, detector, fase móvil, etc.), mientras que la sensibilidad del método estará determinada por la calidad de la extracción del analito a partir de la matriz propuesta. Es notable el uso de solución amortiguadora de fosfatos o acetatos con acetonitrilo o metanol como fase móvil en la mayoría de los estudios. Esta fase móvil provee la polaridad requerida para la elución de los componentes en la muestra. Así mismo, se hace notar los bajos límites de detección derivados de una apropiada extracción sin la necesidad de utilizar derivados orgánicos alternos, resinas, o procesos o equipos especiales.

El uso de los más recientes avances en la tecnología no siempre son de utilidad para el análisis rutinario.

A continuación se muestra el cuadro 2, donde este hecho se hace notar.

Cuadro 2. Impacto de avances tecnológicos en aspectos analíticos rutinarios de la determinación de catecolaminas en fluidos biológicos.		
ESTUDIO	AVANCE TECNOLÓGICO	IMPACTO ANALÍTICO
Wong ²¹	Uso de inmunoensayo enzimático reemplazando a la técnica de HPLC.	Reducción dramática de tiempos de análisis. Interferencia de diversas sustancias que pueden conllevar a falsos positivos. Solo detecta algunos tipos de catecolaminas.
Prauda ¹⁴	Uso de resina orgánica para incrementar sensibilidad de método.	La resina posee un costo aproximado de 2000 USD la onza.
Mefford ¹¹	Uso de reactivo de intercambio iónico (Igepon-77) para mejorar extracción.	El reactivo no presenta eficacia en muestras cerebrales, además de ser sumamente costoso.
Sanchis ²² , Shakulashvili ²³	Emplean técnicas avanzadas de detección (cromatografía micelar y lentes térmicos).	Se aumenta la sensibilidad; el costo de análisis se eleva hasta 6 veces más.

Así, si bien una técnica para determinar catecolaminas en fluidos biológicos es eficaz en cuanto a capacidad de detección y tiempo de análisis, el costo que esto conlleva muestra que es preferible buscar técnicas alternativas.

Siendo el objetivo del presente trabajo, el proponer una técnica para la determinación de levodopa y carbidopa en fluidos por la técnica de CLAR, la relación que existe entre los métodos para cuantificar catecolaminas y dichos compuestos en fluidos biológicos es ciertamente estrecha.

En la actualidad, existen varias técnicas publicadas, en las cuales se reporta la determinación de levodopa en plasma, sin embargo, las concentraciones detectadas superan por mucho la cantidad esperada de levodopa después de una ingestión promedio en un paciente bajo tratamiento utilizando este fármaco, además de presentar problemas de extracción de muestra y estabilidad de la misma.

Por ejemplo, Rodelli²⁴, determina concentraciones plasmáticas mediante la técnica de HPLC del orden de 20 ng/mL, siendo éste su límite de detección y cuantificación.

Estudiando la farmacocinética de la levodopa, se observa que su concentración plasmática mínima observada en pacientes con el mal de Parkinson y bajo tratamiento con éste compuesto es de 2 ng/mL. Si se considera esta concentración como el límite de cuantificación, la cantidad determinada por Rondelli resultaría consecuencia de una sobredosis.

Así mismo, De Saint²⁵ reporta problemas con la preparación de la fase móvil, al necesitar ajustar el pH de la misma en forma puntual y desecharla al día siguiente o de lo contrario se pondría en juego la estabilidad de la muestra, debido a que los constituyentes ácidos de la muestra se ven afectados por el pH y por la concentración de par iónico adicionado a la fase móvil para mejorar la resolución. Ejemplos de estos pares iónicos son sales de octanosulfonato o ácido sulfanílico. De la misma forma, la mayoría de los autores de estudios similares reportan problemas al conseguir la estabilización de la muestra. Algunos, incluso no consiguen cuantificar carbidopa debido a que las catecolaminas son sumamente propensas a oxidarse y por ello, es necesario prevenir esta descomposición previa al tratamiento de la muestra.

Por lo anterior, se propondrá una técnica que conjunte las cualidades necesarias y evite en lo posible de caer en fallas como las antes mencionadas.

El primer punto a cubrir es el tipo de detector a utilizar.

La mayoría de los autores manejan el detector electroquímico al cubrir éste las necesidades analíticas en comparación del UV o el detector de fluorescencia, que requieren de una alta concentración de analito a cuantificar en nuestro caso específico.

Ciertos reportes indican gran sensibilidad al utilizar una técnica de microdiálisis aplicada a la muestra previa al análisis de la misma o utilizando dos detectores de forma simultanea como el detector electroquímico y un coulombimétrico.

Sin embargo, como se indicó anteriormente, uno de los propósitos es realizar el análisis de la manera menos costosa posible, así entonces, se recomienda el detector electroquímico con potenciales de +0.25 V para el primer electrodo y -0.30 V para el segundo, con sensibilidad de 1.7 y 0.5 nA para cada electrodo respectivamente, ya que el estudio bibliográfico indica que un sistema de estas características ofrece la mayor sensibilidad y amplio margen de respuesta para nuestro análisis. Dicho detector aplica para muestras plasmáticas, ya que es de uso general para este tipo de muestras. En el caso de muestras de orina, se recomienda un detector electroquímico amperométrico de celda única a 0.54 V con un rango de 50nA, mismo que dará la mayor sensibilidad en el análisis. La razón primordial del uso de este tipo de detector es la concentración electrolítica presente en la muestra. Adicionalmente, el detector electroquímico se utiliza por la presencia de par iónico en la fase móvil y la ionización en solución de los compuestos a determinar.

El segundo punto a discutir es el uso de una precolumna.

La precolumna se utiliza en ciertos análisis de HPLC en donde es necesario enriquecer la muestra, donde se manejan trazas de analito o donde la muestra necesita de una limpieza previa al análisis si ésta contiene determinada cantidad de impurezas.

La precolumna, como su nombre lo indica se ubica en un equipo cromatográfico antes de la columna y es la parte extractiva que tiene el primer contacto con la muestra.

Algunos autores, como Cedarbaum²⁶, utilizan la precolumna, Rondelli indica tener problemas utilizando una precolumna y reporta igual sensibilidad y recobro al no utilizarla.

El uso de precolumna involucra mayor tiempo y costo de análisis, y no en todos los casos se obtiene una ganancia de ello.

Por lo anterior, se determina que la precolumna es necesaria independientemente del tipo de muestra a analizar. Así, es posible utilizar una precolumna de tipo C_{18} con tamaño de partícula de 5 μm con dimensiones de 46 mm de longitud por 4.6 mm de diámetro interno, siendo ésta la más común para este tipo de análisis, ya que como se menciona posteriormente, el tipo de columna a emplear es, también C_{18} , con tamaño de partícula de 5 μm , y que la mayoría de los proveedores posee en las dimensiones requeridas.

La columna cromatográfica depende de las características de la molécula analítica a determinar.

Dadas las características en las catecolaminas (compuestos orgánicos, bajo peso molecular, etc.) y basándose en los estudios realizados, se establece que la columna más apropiada para el análisis puede ser de fase reversa, de empaque C_{18} de dimensiones 250 mm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 5 μm , ya que dichas dimensiones, indicadas incluso por proveedores de columnas para HPLC, como Alltech, proporcionan los parámetros cromatográficos analíticos como platos teóricos, resolución, etc.

La siguiente cuestión es el uso de estándar interno.

El estándar interno es aquel compuesto que se añade a la muestra en cantidad o concentración conocida para ofrecer una respuesta analítica prevista, la cual se utiliza como punto de referencia para determinar la cantidad de analito presente en la muestra.

En este caso, se pueden utilizar varios estándares internos. Compuestos que ofrecen respuesta bajo las mismas condiciones cromatográficas, poseen características químicas o estructurales similares al analito y además no interfieren con el análisis. Algunos de estos compuestos son la dihidroxibencilamina, tiramina, y el recomendado en este caso: la N-metil dopamina por las razones expuestas.

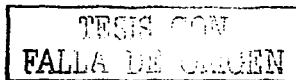
La fase móvil a emplear es el próximo tópico a tratar.

Como un ejemplo, Titus utiliza una mezcla de metanol al 22.5% con 20 milimoles de ácido cítrico, 20 milimoles de fosfato monobásico de sodio (Na_2HPO_4), 4 milimoles de octanosulfonato de sodio y 0.05 milimoles de EDTA disódico, ajustando el pH a 2.74 ± 0.01 con ácido cítrico 2 M para sus determinaciones en muestra de orina.

En comparación, al tratarse de muestras plasmáticas, existen varios reportes donde se utilizan variadas fases móviles, aunque similares en su polaridad.

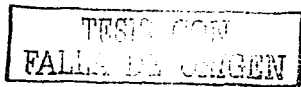
Las similitudes en polaridad entre fases utilizadas para muestras plasmáticas y urinarias radican en el uso de metanol con un pH amortiguado y regulado mediante la adición de una solución amortiguadora de pH, generalmente de citratos o fosfatos y/o acetónitrilo. Lo único que varía de estudio a estudio es la proporción de cada uno de los componentes a utilizar.

El pH de la fase es también crítico para el análisis a realizar, el cual debe mantenerse a lo largo de la corrida cromatográfica, ya que de ello depende la estabilidad de las muestras.



Un factor más que influye en las determinaciones es el método y tiempo de degasificación de la fase, ya que en revisiones realizadas se observa que de ello depende en gran parte la relación señal – ruido. Por lo anterior, se recomienda el método de agitación con vacío, el cual no es agresivo para la fase y es altamente eficiente por tiempos prolongados (de una hora o más). Reuniendo todas las características mencionadas, se establece el uso de una mezcla de ácido ortofosfórico (20 milimoles) y octanosulfonato de sodio (4 milimoles) en solución al 25% con metanol ajustada con NaOH al 50% (w/w) a $\text{pH } 2.8 \pm 0.05$ para ambos tipos de muestras. La razón de esta elección radica en el hecho de que el metanol y la solución de fosfatos proporcionan de forma teórica la polaridad necesaria para llevar a cabo el análisis; por otro lado, la retención de aminas polares como las catecolaminas se ve selectivamente afectada por la concentración del par iónico (sales de octanosulfonato de sodio), el pH de la fase y la variación en concentración de ambos. Es por ello, que el pH debe ser estrictamente controlado, ya que la optimización de la resolución se obtiene al variar estos tres parámetros. El uso de dicha fase cumple con los criterios de polaridad necesarios para hacer eluir la muestra y de estabilidad para conservarla durante el análisis.

El siguiente tópico es el volumen de inyección. Por generalidad y conveniencia, la gran mayoría de las técnicas revisadas utilizan un alto volumen de inyección para obtener una mayor concentración y respuesta analítica. Es así, que se recomienda utilizar un volumen de 50 μL , mismos que contienen la cantidad mínima necesaria para realizar la cuantificación. Lo anterior deriva de los cálculos provenientes de los parámetros farmacocinéticos de los activos.



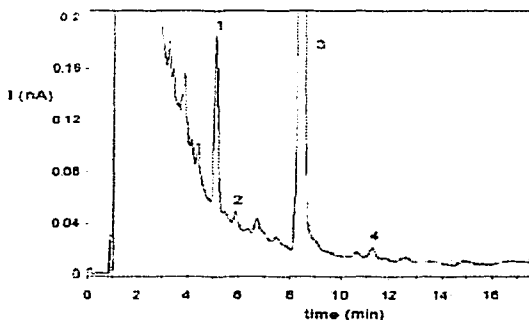
El flujo de fase móvil a través de la columna se mantiene bajo en todas las investigaciones revisadas. Un flujo de 1.0 ± 0.5 mL/minuto es recomendable para evitar corridas cromatográficas prolongadas, y se espera que se realice la elución de los componentes.

A continuación se propone una técnica para la obtención y preparación de las muestras biológicas (sanguíneas y urinarias), resultado de varias investigaciones documentadas:

Se extraen de 3 a 5 mL de sangre del individuo por punción, o se le pide al paciente una muestra de orina (aproximadamente 50 mL). 2 mL de sangre o 100 μ L de orina, se depositan en un tubo o microtubo, según el caso, conteniendo 100 μ L de glutatión reducido con EDTA y centrifugado las muestras tan pronto como sea posible a 3000 rpm por 5 minutos.

El glutatión con EDTA cumplirá una triple función, ya que se utiliza como antioxidante, anticoagulante y estabilizador, debido a que las catecolaminas son sumamente propensas a la oxidación y dicho reactivo es útil para evitar este fenómeno. Una vez separados los componentes en la centrifugación, se toma el sobrenadante y se lleva a otro tubo o microtubo. Para muestras sanguíneas, la desproteínización se realiza con tres extracciones con metanol: ácido perclórico 0.5 M 98: 2. Al resultado de las extracciones o al sobrenadante de las muestras centrifugadas de orina, se le agregan 50 μ L de solución de estándar interno (estándar interno de N-metildopamina a una concentración de 80 ng/mL). A la mezcla se añade 1 mL de solución amortiguadora de pH Tris-HCl 2M (esta solución amortiguadora estabilizará el pH de las muestras) y se agita con ayuda de un vórtex por 5 minutos.

Los analitos se extraen de la solución, mezclando con 400 μ L de ácido perclórico 0.2 M + 11 milimoles de EDTA disódico, agitando en un vórtex por 3 minutos, seguido por centrifugación a 3000 rpm por 5 minutos. Del sobrenadante final se toman 50 μ L, mismos que servirán como muestra para inyectar al equipo HPLC. Dado que los tiempos de retención varían dependiendo del flujo de fase móvil, el pH de la misma, etc. no se puede ofrecer un tiempo definido en el cual aparecerán los picos de interés en cada caso. Estos deberán ser determinados basándose en el estudio sistemático de los cromatogramas obtenidos. Los tiempos de retención teóricos para levodopa y carbidopa son de aproximadamente 6 y 11 minutos, respectivamente, considerando de antemano las condiciones descritas. Como



referencia, se presenta el siguiente cromatograma⁵:

Donde el pico 1 es el correspondiente a norepinefrina, el pico 2 es levodopa, el tercer pico es el estándar interno de N-metildopamina y el pico 4 es carbidopa.

Los límites de detección para las técnicas estudiadas varían dependiendo del tipo de muestra, el tratamiento de la misma, etc., sin embargo, si se aplican las variables planteadas anteriormente se presume que el límite de detección para muestras plasmáticas se encuentra entre 0.5 ± 0.1 ng/mL, mientras que para muestras de orina, el límite es de 25 ± 5 ng/mL.

Los límites establecidos provienen de un estudio estadístico de un conjunto de técnicas donde se aplican variables sumamente similares a las presentadas aquí. El valor presentado es el promedio de los límites de detección establecidos para dichas técnicas al igual que el grado de incertidumbre.

El último punto de esta parte es determinar los costos reales de la técnica descrita y compararlos con un presupuesto determinado para realizar la misma prueba de detección por cromatografía de gases.

Los costos de los reactivos para HPLC son los siguientes:

Material o reactivo	Unidad medida	de	Venta realizada por	Precio Dólares US
AGUA HPLC	L		4 L	15.00
METANOL HPLC	L		4 L	21.62
ACETONITRILLO HPLC	L		4 L	24.58
ACIDO PERCLORICO	L		2 L	25.32
*EDTA DISODICO	g		250 g	21.54
*OCTANOSULFONATO DE SODIO	g		100 g	15.44
ACIDO O-FOSFORICO	L		1 L	16.43
ACIDO CITRICO	L		1 L	55.38
PRECOLUMNA C ₁₈ , 46x4.6mm, 5µm	PIEZA		1 pieza	170.44
COLUMNA Nucleosil C ₁₈ , 250x4.6mm, 5µm	PIEZA		1 pieza	225.61
JERINGAS 10mL	PIEZA		100 piezas	33.16
MEMBRANA MILLIPORE 0.45	UNIDADES		50 unidades	63.66
VIALES WATERS	UNIDADES		250 unidades	37.76

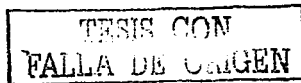
* Reactivos sólidos con suficiente contenido para realizar varias determinaciones.

Nota: Los reactivos líquidos están calculados para utilizarse en el análisis de una serie de cinco determinaciones, a comparación de los reactivos sólidos y consumibles de HPLC, cuya cantidad se establece para múltiples análisis. Los precios pueden variar según el proveedor. Aquellos reactivos y estándares no indicados aquí, no se encuentran en listas de proveedores regulares. Precios obtenidos el 12 de Agosto de 2002.

Fuente: Merck Sharp & Dohme de México.

En cuanto a las horas-hombre se refiere, los tiempos de análisis varían dependiendo de los recursos humanos y técnicos de los que se disponga.

La técnica analítica propuesta y los costos que involucra la misma están contemplados para realizarse desde la preparación de reactivos hasta el reporte de resultados en una jornada de 6 a 8 horas diarias. Añadiendo costos por electricidad (aproximadamente 150 dólares mensuales), agua potable y/o purificada para lavado de material u otros (50 dólares al mes), detergente (50 dólares por mes), etc., el presupuesto para realizar el análisis no rebasaría los 350 dólares, estableciendo el estudio de aproximadamente 25 a 30 muestras semanales por un mes o hasta que se hayan consumido el 75% de los reactivos, suponiendo que un reactivo sólido o de uso múltiple como una columna cromatográfica puede ser útil para examinar aproximadamente 50 muestras o más, al igual que el EDTA, sales octanosulfónicas de sodio, etc. Así, si se considera el total de gastos en reactivos, horas-hombre, consumibles, recursos, más algunos extras no previstos, el presupuesto total no sobrepasaría los 1500 a 2000 dólares, mismo que es bastante reducido comparado con el ofrecido por laboratorios privados para la detección de dichos compuestos por la técnica de cromatografía de gases, mismo que se sitúa sobre los 5000 dólares, por la misma cantidad de muestras o tiempo. (Fuente: Laboratorios Clínicos Azteca)



3.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO⁸

La técnica antes mencionada por ser conjunción de varios métodos documentados no se encuentra validada.

Si se desea que la técnica descrita sea utilizada para detectar presencia de análogos de dopaminas en sangre y/u orina, se requiere la validación de la misma. La validación de la técnica se describe a continuación:

Limites de detección y cuantificación.

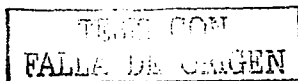
A pesar de contar con un límite teórico de detección, es necesario determinarlo experimentalmente, así mismo el límite de cuantificación es indispensable para realizar la validación.

El límite de detección se considera como la mínima cantidad de analito que produce una señal, es decir que puede ser detectada, más no cuantificada, mientras que el límite de cuantificación es la mínima cantidad que puede ser cuantificada con exactitud y precisión.

Linealidad.

Este parámetro establece la relación cantidad de analito – respuesta obtenida. En otras palabras, determina que a mayor concentración de analito en la muestra, mayor debe ser la respuesta analítica.

La linealidad se determina con curvas de calibración, es decir, preparando soluciones de analito a diversas concentraciones (mínimo 5 niveles de concentración) y observando la respuesta obtenida, misma que aumentar proporcionalmente a la concentración.



Precisión.

Este parámetro nos indica la repetibilidad y reproducibilidad del método.

La repetibilidad del método se determina bajo las mismas condiciones experimentales y puede ser observada al cuantificar la cantidad de analito en una sola muestra con inyecciones repetidas o con cierto número de inyecciones de varias muestras preparadas bajo el mismo tratamiento y conteniendo la misma concentración de analito.

La reproducibilidad se determina en forma similar a la repetibilidad, variando las condiciones en las cuales se desarrolla la investigación, tales como presión atmosférica, humedad, etc. y por lo general, se determina entre laboratorios que llevan a cabo la misma técnica.

Se analizan tres niveles de concentración de analito en muestras y al menos cinco determinaciones por nivel. Se busca que la respuesta obtenida no varíe drásticamente en un mismo nivel. Adicionalmente se varían condiciones como analistas, condiciones, equipos, etc.

Rango.

Este parámetro nos indica en que rango de concentraciones es valido el método, es decir, ofrece una respuesta exacta, precisa y lineal.

Para ello se requiere preparar soluciones de analito a distintas concentraciones ampliando más el rango que con aquellas curvas preparadas anteriormente.

Robustez.

La robustez es determinada observando los cambios en la respuesta analítica variando en mínima proporción los parámetros técnicos tales como flujo, temperatura, pH, etc.

Especificidad o selectividad.

Este parámetro establece la facilidad de detectar el analito a cuantificar en forma específica y excluir cualquier otro compuesto que intervenga en el análisis. En nuestro caso, existen varias sustancias que intervienen analíticamente. Al tratar con catecolaminas no se puede excluir a todos los degradados de las mismas, sustancias ajenas (ejemplo: 3-O-metildopa) y compuestos con características similares, entre ellos la dopamina, adrenalina, noradrenalina, etc.

Cabe mencionar que a pesar de que la técnica propuesta es selectiva y determina de forma separada levodopa, carbidopa y otros compuestos, ésta no es específica, ya que se observarán en el cromatograma una serie de picos pertenecientes a compuestos ya mencionados o similares estructurales.

System suitability o adecuabilidad del sistema.

Aquí, se deben considerar varios subparámetros que establecen que el equipo cromatográfico es apto y está listo para realizar las determinaciones analíticas.

Los subparámetros son:

Factor de capacidad. Es el tiempo que tarda en aparecer en el cromatograma el o los picos de interés con respecto al tiempo muerto, es decir el paso del frente de la fase móvil por el detector.

Repetibilidad de inyección. La capacidad que posee el equipo de ofrecer un resultado analítico idéntico de varias inyecciones de la misma muestra.

Resolución. La capacidad de separar dos o más picos adyacentes en el mismo cromatograma.

Factor de coeio. Es la simetría con la cual se presenta un pico determinado o de interés en el cromatograma obtenido.

Platos teóricos. Es la cantidad de equilibrios o puntos de extracción teóricos establecidos en el interior de la columna cromatográfica.

Curva de calibración.

Aquí se realiza una curva de calibración con muestras con distintas concentraciones de analito. Éstas se pueden obtener al agregar a la matriz (sangre u orina) cantidades conocidas de fármaco en forma directa.

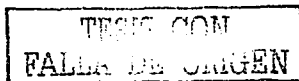
Utilizando esta curva de calibración se establecerán la linealidad y el límite de cuantificación como se explica en la parte cromatográfica de la validación.

Exactitud.

Este parámetro es la medida de la cercanía entre un valor experimental obtenido y el valor verdadero.

De nuevo se manejan cinco determinaciones por cada nivel de concentración y tres niveles de concentración.

Lo que se busca es comparar la cantidad agregada ala matriz con la cantidad cuantificada finalmente.



Recobro o recuperación.

Se expresa como la cantidad cuantificada comparada contra la cantidad real que contiene una muestra.

Se determina aplicando determinada cantidad de analito a una muestra y observando la cantidad finalmente cuantificada.

Se manejan las mismas condiciones que en el parámetro de exactitud.

Muestras de control.

En este parámetro se obtienen y conservan:

1. Una curva de calibración utilizando al menos un blanco (matriz sin agregar analito) y cinco muestras con distintas concentraciones de analito.
2. Una muestra de límite de cuantificación.
3. Muestras con bajo, medio y alto nivel de concentración de analito, basado en el límite de cuantificación.
4. Una muestra con estándar de referencia.

Estabilidad.

Establecida al analizar muestras sometidas a condiciones cíclicas de congelamiento-descongelamiento a temperatura ambiente, a condiciones ambiente, a condiciones ambiente por largo plazo, etc. Adicionalmente se establece la estabilidad de muestras en un automuestreador de un equipo cromatográfico.

Ésta se establece con un estudio de respuesta - tiempo transcurrido de toma o preparación de muestra.

Cabe mencionar que todo resultado obtenido debe documentarse, ya que la validación del método estará basada en esta documentación que demuestra que el método analítico realiza las determinaciones para las cuales está diseñada.

4. CONCLUSIONES

El método analítico de cromatografía de líquidos de alta resolución es una excelente técnica de cuantificación de levodopa y carbidopa, comparándola con la técnica de cabecera para análisis de este tipo: la cromatografía de gases.

Los bajos costos que poseen los reactivos y consumibles de la técnica de HPLC en este tipo de determinaciones a comparación de su competencia es una de las razones por las que la cromatografía de líquidos es una alternativa viable para reemplazar a la cromatografía de gases para determinación de análogos de dopamina en fluidos biológicos.

La técnica analítica propuesta reúne todas las condiciones cromatográficas necesarias para realizar de forma inmediata el análisis de presencia y/o cuantificación de levodopa y carbidopa.

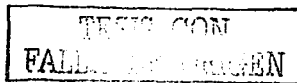
Adicionalmente se ofrecen parámetros que orientan a aquellos interesados en validar la técnica propuesta.

Tanto la técnica de preparación de muestras plasmáticas y urinarias, como la técnica analítica y sus variables están basadas en investigaciones documentadas y fundamentadas en las características físicas y químicas de los analitos a determinar.

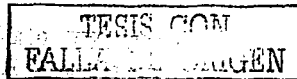
Así, la cromatografía de líquidos de alta resolución es mucho más económica que la cromatografía de gases para la determinación y cuantificación de levodopa y carbidopa en muestras plasmáticas y urinarias e igual de efectiva y sensible.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

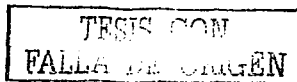
1. Windholz M *et al* (Editores). The Merck Index. 10ª edición. New Jersey: Merck & Co., 1983: 341, 457, 769, 789.
2. Remington A. Remington's Pharmaceutical Sciences. 17ª Edición. Pennsylvania: Mack Publishing Co. , 1980. Cap. 31.
3. Goodman A. Goodman & Gilman's Pharmacological basis of therapeutics. 9ª Edición. New York: McGraw-Hill, 1996. Capítulos 12 y 22.
4. Secretaría de Gobierno. Código penal para el Distrito Federal. Edición 2002. México: Sista, 2002: 59-63.
5. <http://www.catecholamine.org/> Responsable: The Foundation for Catecholamine Research. Fecha de consulta: 21 de Agosto de 2002. Fecha de última actualización: 5 de Noviembre de 1999.
6. <http://www.ssa.gob.mx/> Responsable: Secretaria de Salud y Asistencia (México). Fecha de consulta: 21 de Agosto de 2002. Fecha de última actualización: Mayo de 2002.
7. <http://www.pgr.gob.mx/> Responsable: Procuraduría General de la República (México). Fecha de consulta: 21 de Agosto de 2002. Fecha de última actualización: 21 de Agosto de 2002.
8. <http://www.fda.gov/> Responsable: Food and Drug Administration (Estados Unidos de América). Fecha de consulta: 22 de Agosto de 2002. Fecha de última actualización: Agosto de 2002.



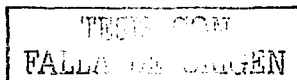
9. Titus D, August T, Yeh K, Eisenhandler R *et al.* Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of carbidopa, levodopa and 3-O-metyldopa in plasma and carbidopa, levodopa and dopamine in urine using electrochemical detection. *Journal of Chromatography*. 534 (1990) 87-100.
10. Boutagy J. Catecholamine determination by gas-liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 151 (1978) 263-264.
11. Mefford I, Garipey K. Application of a novel cation-exchange reagent, Igepon T-77 (N-methyl oleoyl taurate), to microbore separations of alumina extracts of catecholamines from cerebrospinal fluid, plasma, urine and brain tissue with amperometric detection. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*. 420 (1987) 241-251.
12. Koch D, Wurtman R. Effect of sample preparation and liquid chromatography column choice on selectivity and precision of plasma catecholamine determination. *Journal of Chromatography*. 386 (1987) 19-24.
13. He H, Jeon H, Nohta K. Optimization of high-performance liquid chromatographic assay for catecholamines: Determination of optimal mobile phase composition and elimination of species-dependent differences in extraction recovery of 3,4-dihydroxybenzylamine. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*. 574 (1992) 213-218.
14. Prauda M, Ketter R, Zurcher G, Schaffner R *et al.* Study of a new solid carbon paste tyrosinase-modified amperometric biosensor for the determination of catecholamines by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 727 (1996) 47-54.



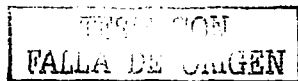
15. Huaibing H, Fujita K, Maruta K. Determination of catecholamines in sheep plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: comparison of deoxyepinephrine and 3,4-dihydroxybenzylamine as internal standard. *Journal of Chromatography B*. 701 (1997) 115-119.
16. Pastoris A, Martin R, Bailey B. Automated analysis of urinary catecholamines by high-performance chromatography and on-line sample pretreatment. *Journal of Chromatography B*. 664 (1995) 287-293.
17. Dethy S, Laute M, Van Berclom N, Damhaut P *et al.* Microdialysis-HPLC for plasma levodopa and metabolites monitoring in parkinsonian patients. *Clinical Chemistry*. 43 (1997) 740-744.
18. Van der Hoorn F, Boomsa F, Man A. Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography: comparison between a new method with fluorescence detection and an established method with electrochemical detection. *Journal of Chromatography*. 487 (1989) 17-28.
19. Ganhao M, Hattingh J, Hurwitz M, Pitts N. Evaluation of a simple plasma catecholamine extraction procedure prior to high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. *Journal of Chromatography*. 564 (1991) 55-66.
20. Dutton J, Copeland, L. Playfer J, Roberts N. Measuring L-dopa in plasma and urine to monitor therapy of elderly patients with Parkinson disease treated with L-dopa and a dopa decarboxylase inhibitor. *Clinical Chemistry*. 39 (1993) 629-634.



21. Wong T, Kato T, Ito S, Hirose S *et al.* Single, rapid and sensitive determination of epinephrine and norepinephrine in urine and plasma by non-competitive enzyme immunoassay compared with HPLC method. *Clinical Laboratory*. 48 (2000) 61-71.
22. Sanchis J, Villanueva R, Torres J, Ramis G. Determination of catecholamines as aminochromes by micellar liquid chromatography with thermal lens spectrophotometric detection. *Chromatographia*. 38 (1994) 365-372.
23. Shakulashvili N, Chopineau J. Separation of catecholamines and serotonin by micellar electrokinetic chromatography with UV detection. *Chromatographia*. 47 (1998) 89-92.
24. Rondelli I, Acerbi D, Mariotti F, Ventura P. Simultaneous determination of levodopa methyl ester, levodopa, 3-O-methyldopa and dopamine in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*. 653 (1994) 17-23.
25. De Saint Blanquat G, Lamboeuf Y, Fritsch P. Determination of catecholamines in biological tissues. *Journal of Chromatography*. 415 (1987) 388-392.
26. Cederbaum J, Williamson R, Kutt H. Simultaneous determination of levodopa, its metabolites and carbidopa in clinical samples. *Journal of chromatography*. 415 (1987) 393-399.
27. Betto P, Lucarelli C, Ricciarello M, Gruggeri S *et al.* Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of adenosine and dopamine in rat striatal tissue with combined ultraviolet absorbance and electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*. 662 (1994) 21-25.



28. Lucarelli C, Betto P, Ricciarello G. High-performance liquid chromatographic determination of L-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-methylalanine (α -methyl-dopa) in human urine and plasma. *Journal of Chromatography*. 541 (1991) 285-296.
29. Lucarelli C, Betto P, Ricciarello G, Giambenedetti M *et al.* Simultaneous measurement of L-DOPA, its metabolites and carbidopa in plasma of Parkinsonian patients by improved sample pretreatment and high-performance liquid chromatographic determination. *Journal of Chromatography*. 511 (1990) 167-176.
30. Wang H, Fice D, Yeung P. Determination of catecholamines as their N-hydroxy-succinimidyl-3-indoylacetate derivatives by pre-column derivatization HPLC separation and fluorescent detection. *Journal of Analytical Chemistry*. 365 (1999) 682-684.
31. Kamimori G, Ridl W, Kleinand G, Preindl S *et al.* Effect of three caffeine doses on plasma catecholamines and alertness during prolonged wakefulness. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 56 (2000) 537-544.
32. Hollenbach E, Schultz C, Lehnert H. Rapid and sensitive determination of catecholamines and the metabolite 3-methoxy-4-hydroxyphen-ethylenglycol using HPLC following novel extraction procedures. *Life Sciences*. 69 (1998) 737-750.
33. Saunders W, Bellmaker R. Flow injection amperometric determination of L-dopa, epinephrine or dopamine in pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 15 (1997) 845-849.



34. Boomsa F, Van der Hoorn F, Man A. Breakdown of 3,4-dihydroxybenzylamine and dopamine in plasma of various animal species by semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*. 621 (1993) 82-88.
35. Rudolphi A, Boos K, Seidel D. Coupled-column HPLC analysis of free urinary catecholamines using restricted access affinity precolumn and MICRO-particulate nonporous silica analytical column. *Chromatographia*. 41 (1995) 645-650.
36. Engelhardt H, Gremeau I, Chamard I, Satou V *et al.* Separation of catecholamines using MECC with ultra-violet detection for their qualitative and quantitative analysis. *Bulletin of the Georgian Academy of Sciences*. 157 (1998) 73-76.
37. Boomsa F, Alberts G, Van der hoorn F, Man A *et al.* Simultaneous determination of free catecholamines and epinine and estimation of total epinine and dopamine in plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography*. 574 (1992) 109-117.
38. Hay M, Mormede P. Determination of catecholamines and methoxycatecholamines excretion patterns in pig and rat urine by ion-exchange liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography*. 703 (1997) 15-23.
39. Said R, Robinet D, Barbier C, Sartre J, Huguet C. Fully automated high-performance liquid chromatographic assay for the analysis of free catecholamines in urine. *Journal of Chromatography*. 530 (1990) 11-18.

40. Van der Hoorn F, Boomsa F, Man A, Schalekamp M. Improved measurement of urinary catecholamines by liquid-liquid extraction, derivatization and high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. Journal of Chromatography. 563 (1991) 348-355.

TESIS CONT
FALLA DE ORIGEN